

PCR quantitative (qPCR) (Real time PCR) (PCR en temps réel)

La PCR quantitative (qPCR), ou PCR en temps réel, est une application de la PCR. Elle permet de suivre en continu (en temps réel) le processus d'amplification en détectant la fluorescence émise par les produits de PCR néo formés. Elle est un outil puissant pour l'analyse en biologie moléculaire et en biotechnologies. Elle utilise principalement l'ARNm pour étudier l'activité d'un système vivant.

PCR inverse ou Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR)

Principe

-L'acronyme **RT-PCR** signifie *Reverse Transcriptase (ou transcription) PCR*, soit une PCR après **transcription inverse** d'un acide ribonucléique (**ARN**) en ADN complémentaire (**ADNc**).

-Il s'agit d'une PCR "classique" réalisée sur un ADNc, qui est une copie d'un ARN obtenue par une transcription inverse.

-Dans une RT-PCR les ARN sont utilisés comme **matrice d'amplification**.

-Elle est certainement la méthode la plus sensible pour détecter (et éventuellement quantifier), les ARN messagers au niveau d'un organe, d'un tissu ou d'une cellule.

-L'une des difficultés de cette méthode concerne la préparation des ARN qui peuvent être très facilement dégradés et contaminés par l'ADN génomique.

Procédure

1) Pour réaliser une RT-PCR, il faut commencer par extraire les ARN et les recopier *in vitro* en ADNc.

La synthèse d'ADNc est catalysée par des transcriptases inverses. Ces enzymes sont des ADN polymérases ARN dépendantes, capables d'utiliser un brin d'ARN comme matrice pour catalyser la synthèse du brin d'ADN complémentaire. Cela correspond effectivement à l'*«inverse»* d'une réaction de transcription de l'ADN en ARN (consulter le chapitre 1 pour voir le mécanisme en détails).

2) la PCR est effectué dans un deuxième temps par la Taq polymérase.

RT-PCR quantitative (Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR) (qRT-PCR)

Dans la recherche scientifique, la technique de qRT-PCR, est fréquemment utilisée. Celle-ci permet de **quantifier un type d'ARN** initialement présent dans un échantillon. Elle est par exemple utilisée pour connaître le **niveau d'expression d'un gène** dans une condition donnée. Plus un gène est exprimé, plus le nombre de molécules d'ARN synthétisées sera grand. Grâce à la qRT-PCR, les chercheurs peuvent donc comparer le niveau d'expression d'un gène donné dans deux conditions différentes.

La qRT-PCR peut se faire dans un thermocycleur particulier qui permet de détecter en temps réel la synthèse des fragments d'ADN. La détection peut se faire à l'aide des molécules fluorescentes, qui se fixent sur l'ADN comme **SYBR green**, ou de **sondes fluorescentes** comme Taqman. La fluorescence de l'échantillon augmente proportionnellement au nombre de molécules d'ADN.



Principe du SYBR Green I

Le SYBR Green est **un intercalant de l'ADN non spécifique** qui s'insère dans le petit sillon de l'ADN double brin.

Cette molécule émet très peu de fluorescence à l'état libre, tandis qu'une fois incorporée dans l'ADN il émet fortement à 520 nm. Cette capacité de se fixer à l'ADN bicaténaire conduit à la limite de cette méthode car il y a un risque de détecter des dimères d'amorces ou une amplification non spécifique. La fluorescence est mesurée à la fin de chaque étape d'élongation de chaque cycle, l'augmentation de fluorescence traduit donc la formation d'amplicons (figures 1 et 2).

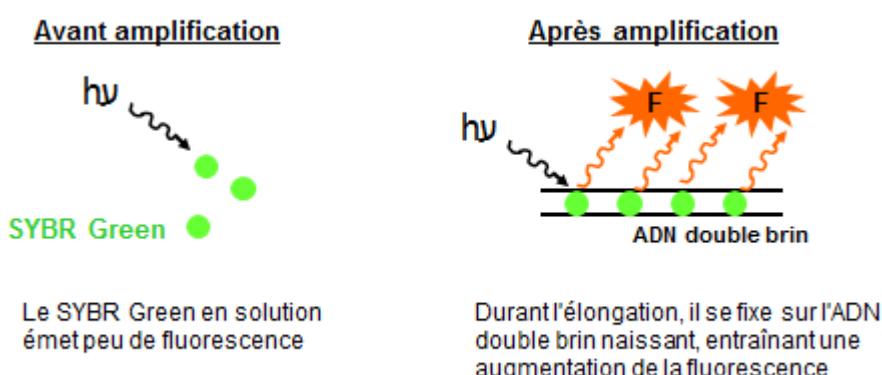


Figure 1 : caractéristiques du SYBR Green I.

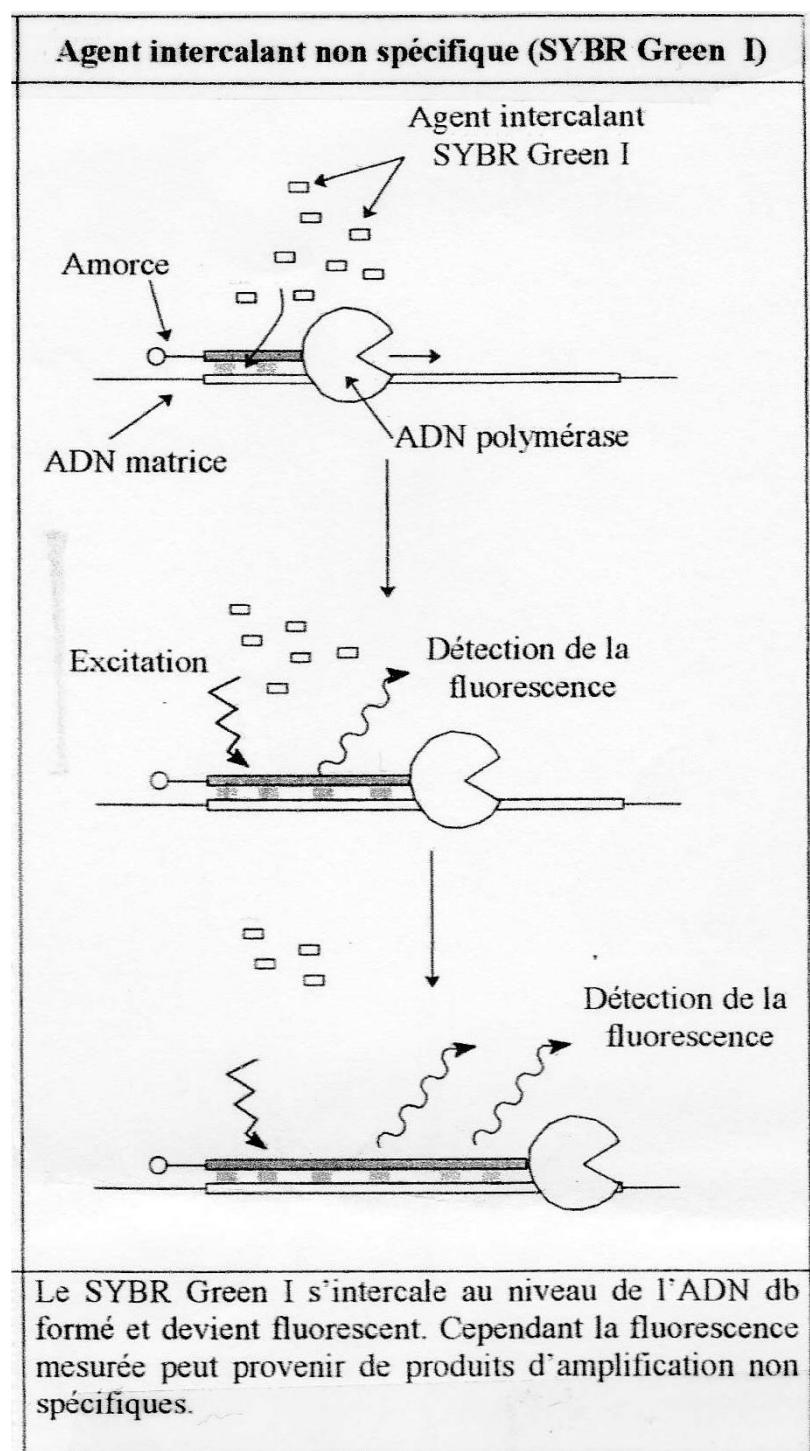


Figure 2 : principe du SYBR Green I.

Une réaction de PCR se déroule en 3 étapes :

- une première étape (**phase d'initiation**) : la quantité de fragment amplifié est insuffisante pour générer un signal fluorescent supérieur au bruit de fond.
- une seconde étape **de phase exponentielle** : la quantité de fragment amplifié génère un signal fluorescent supérieur au seuil de détection de l'appareil, puis le nombre de produits amplifiés double à chaque cycle. En coordonnées logarithmiques, cette phase est représentée par une droite.
- une dernière étape **de phase de plateau** : certains composants de la réaction (et en particulier le nombre de molécules de Taq disponibles) deviennent limitants. Le système ne permet plus une amplification exponentielle (figure 3).

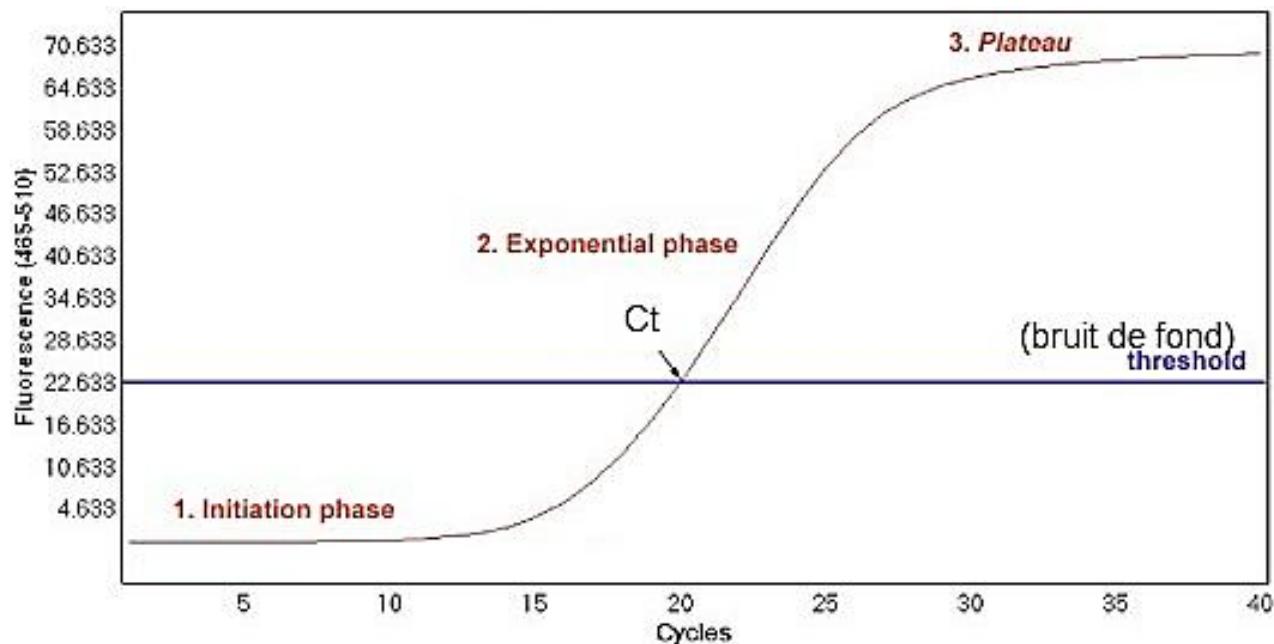


Figure 3 : les phases d'une PCR quantitative (courbe d'amplification).

Ct= cycle threshold, le cycle où commence la phase exponentielle. La valeur Ct est déterminée dans la phase exponentielle, à l'intersection de la ligne de bruit de fond avec la courbe de fluorescence.