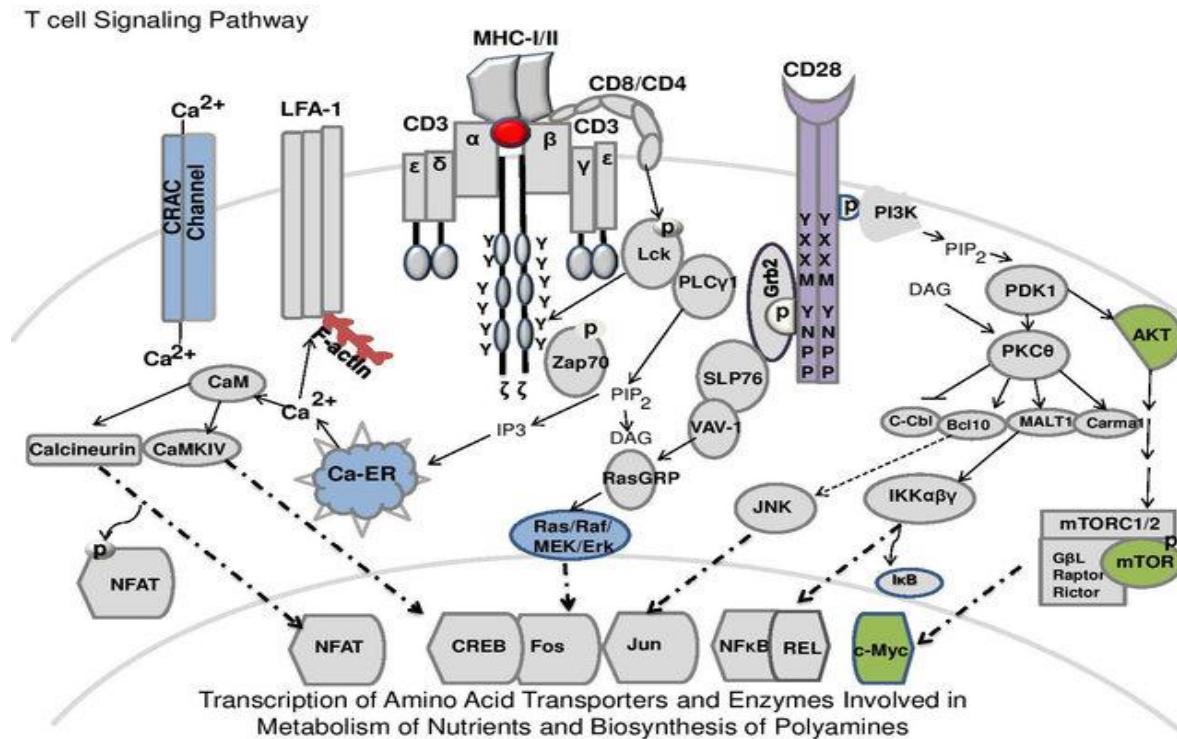


Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

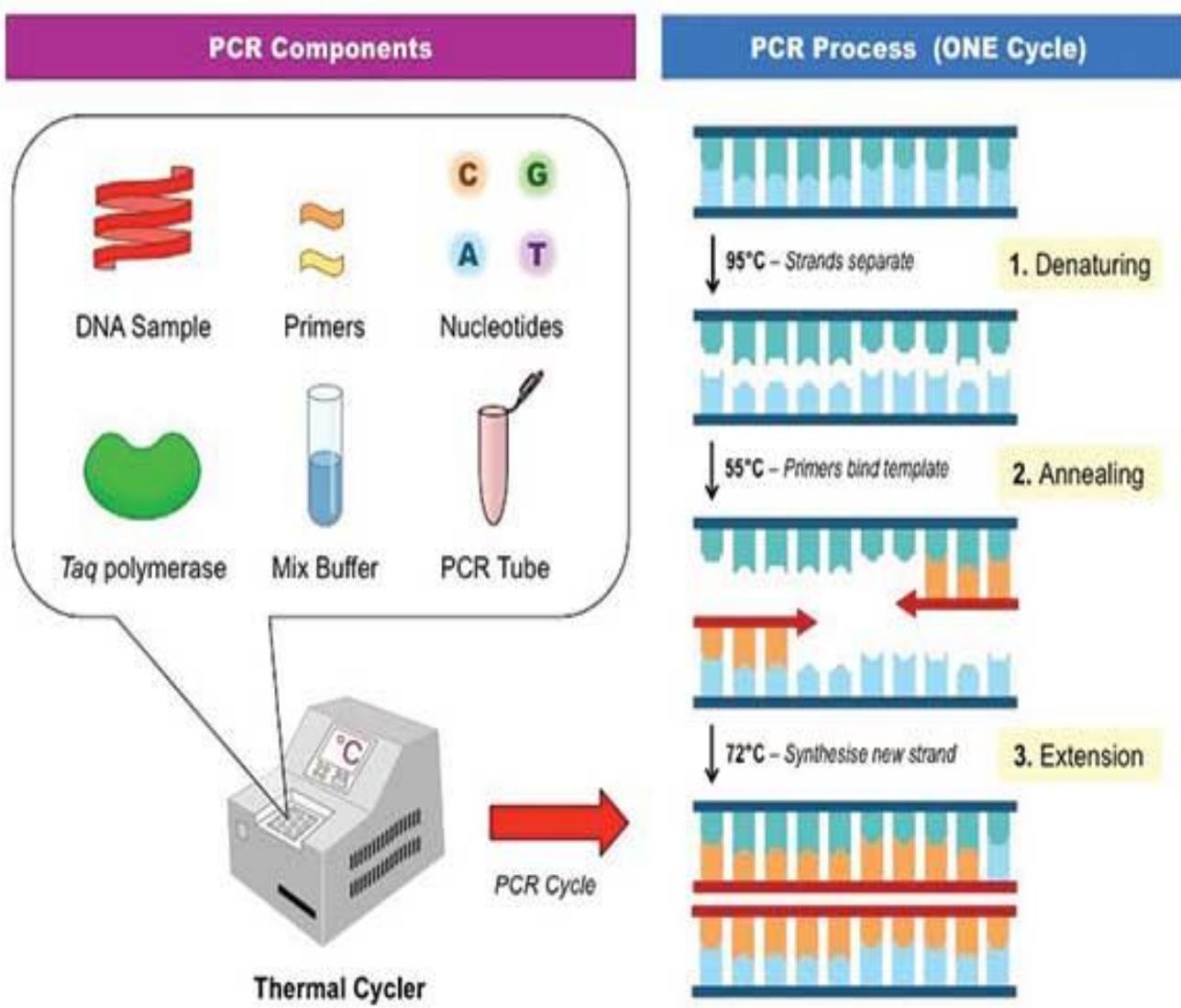
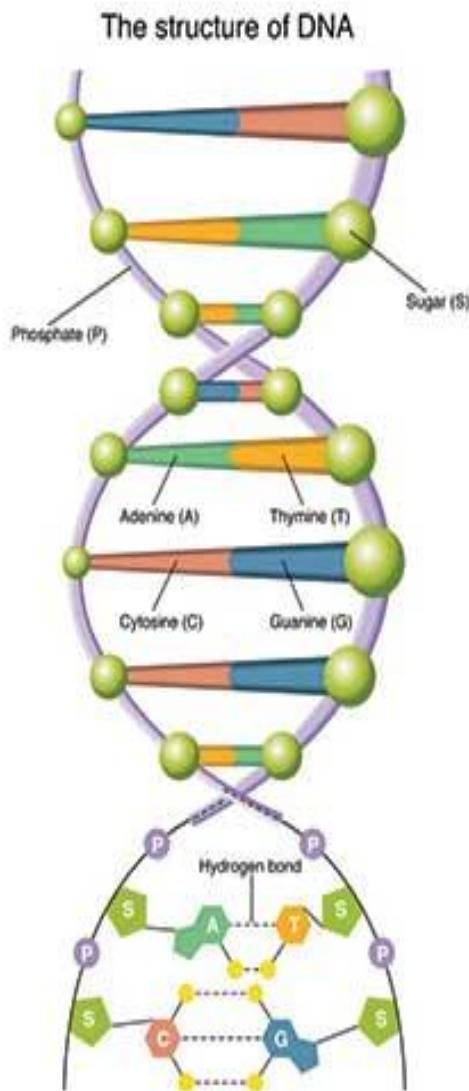
Master 1 Sciences Pharmacologiques

Module : CVSC (Communication et Voies de Signalisation Cellulaire)

Real time PCR



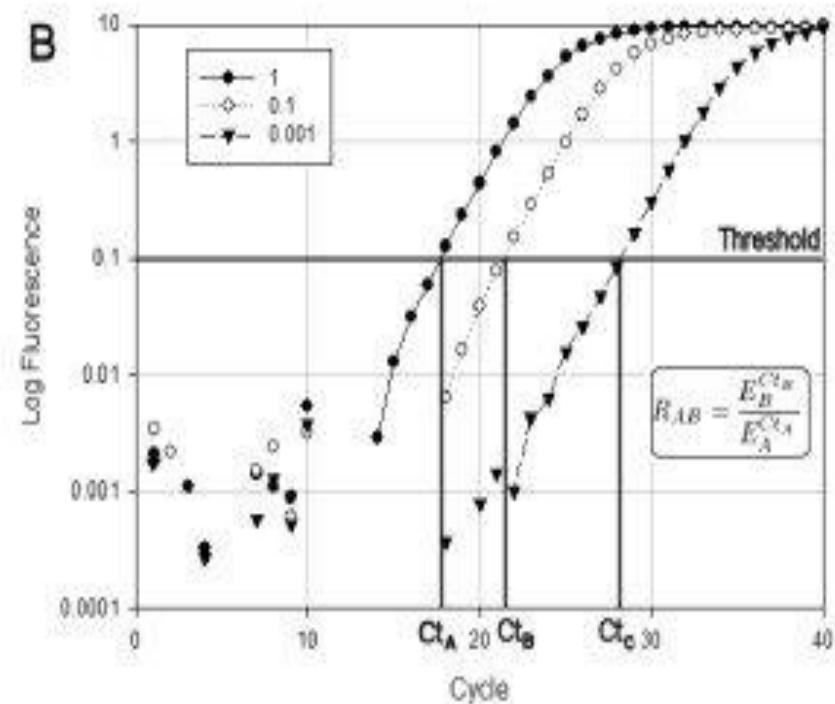
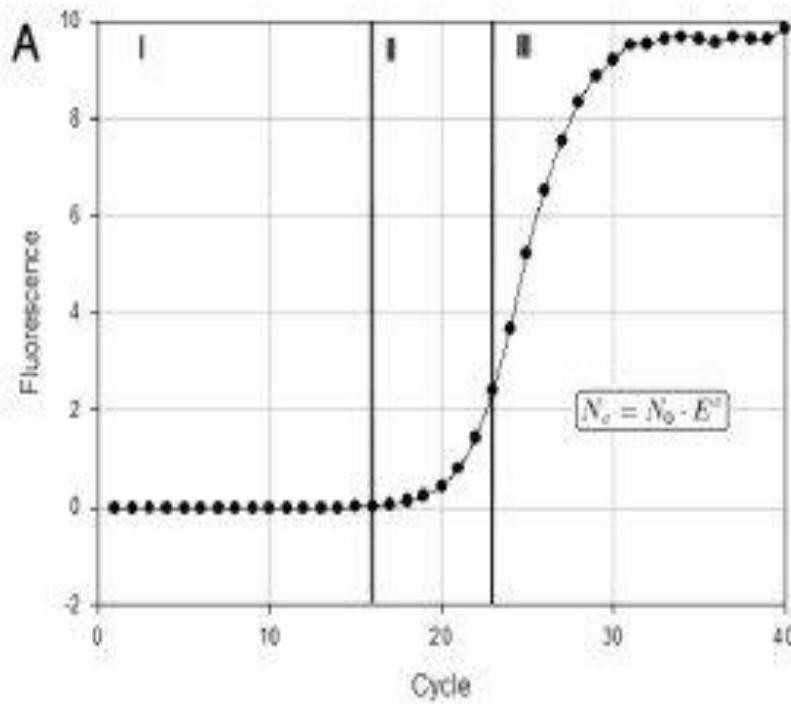
PCR :



qPCR :

C'est une application de la PCR. Elle permet de suivre en continu (en temps réel) l'amplification PCR en détectant la fluorescence émise par les produits de PCR néo-synthétisés.

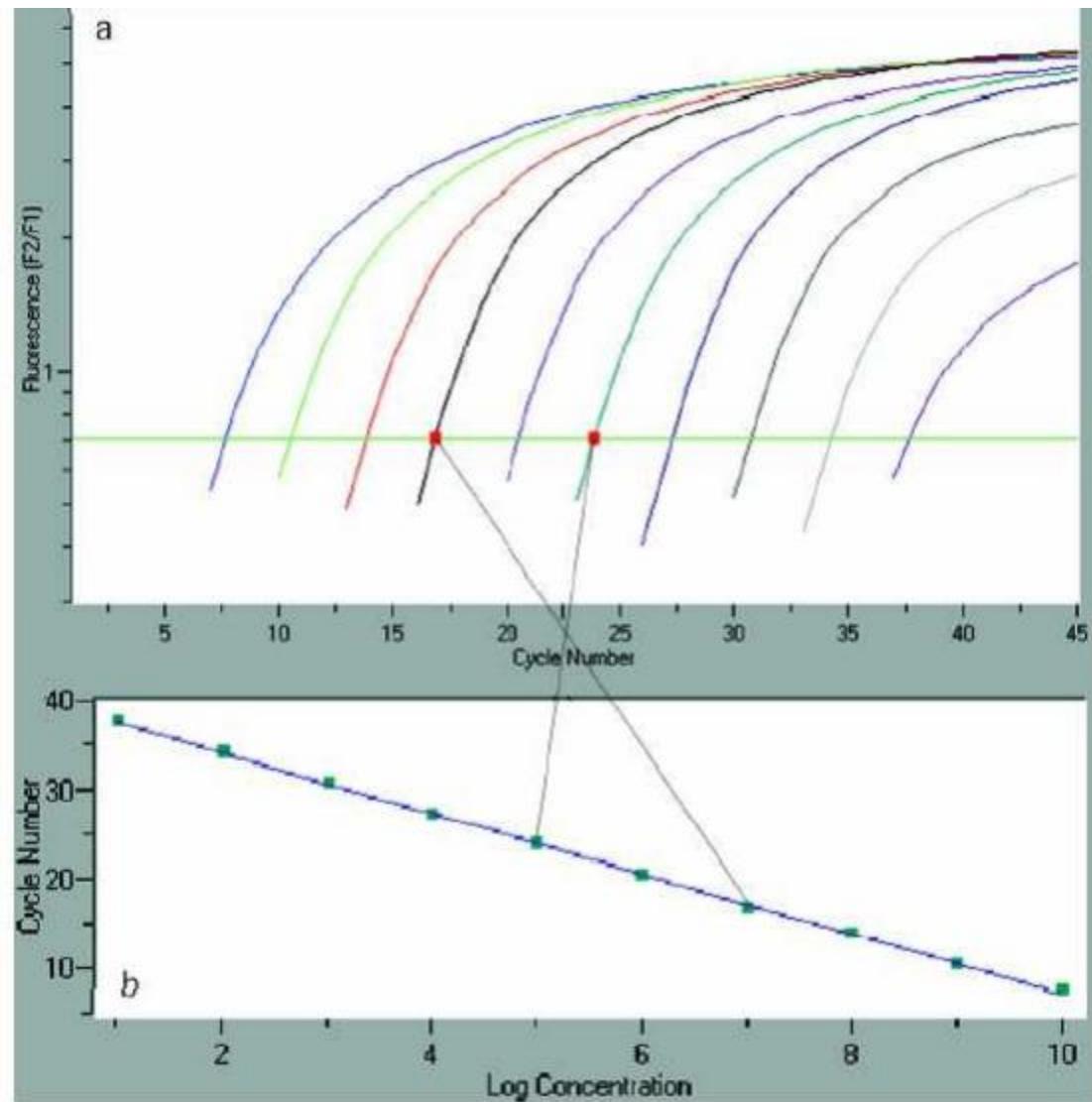
qPCR :



Le point de départ de la phase exponentielle, est appelé cycle seuil optique, symbolisé par les lettres Ct (threshold cycle) ou Cp (crossing point).

Les Ct (points rouges) sont représentés par les points de croisements entre chaque profil PCR et la ligne verte (représentant la valeur seuil de détection de fluorescence).

Droite Ct et le log base 10 des concentrations initiales - -> quantification des échantillons de concentration inconnue.



Les gènes ménagers (HouseKeeping Gene HKG) :

Sont des gènes de référence: ne devraient en théorie pas varier dans les tissus étudiés.

Exp :

- Gènes codants pour le cytosquelette (Beta actine, alpha tubuline)
- Gènes codants pour le Complexe Majeur d'Histocompatibilité de type I (Beta microglobuline).
- Pour des enzymes de la voie du glucose (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogénase, GAPDH).

Normalisation avec des gènes de référence:

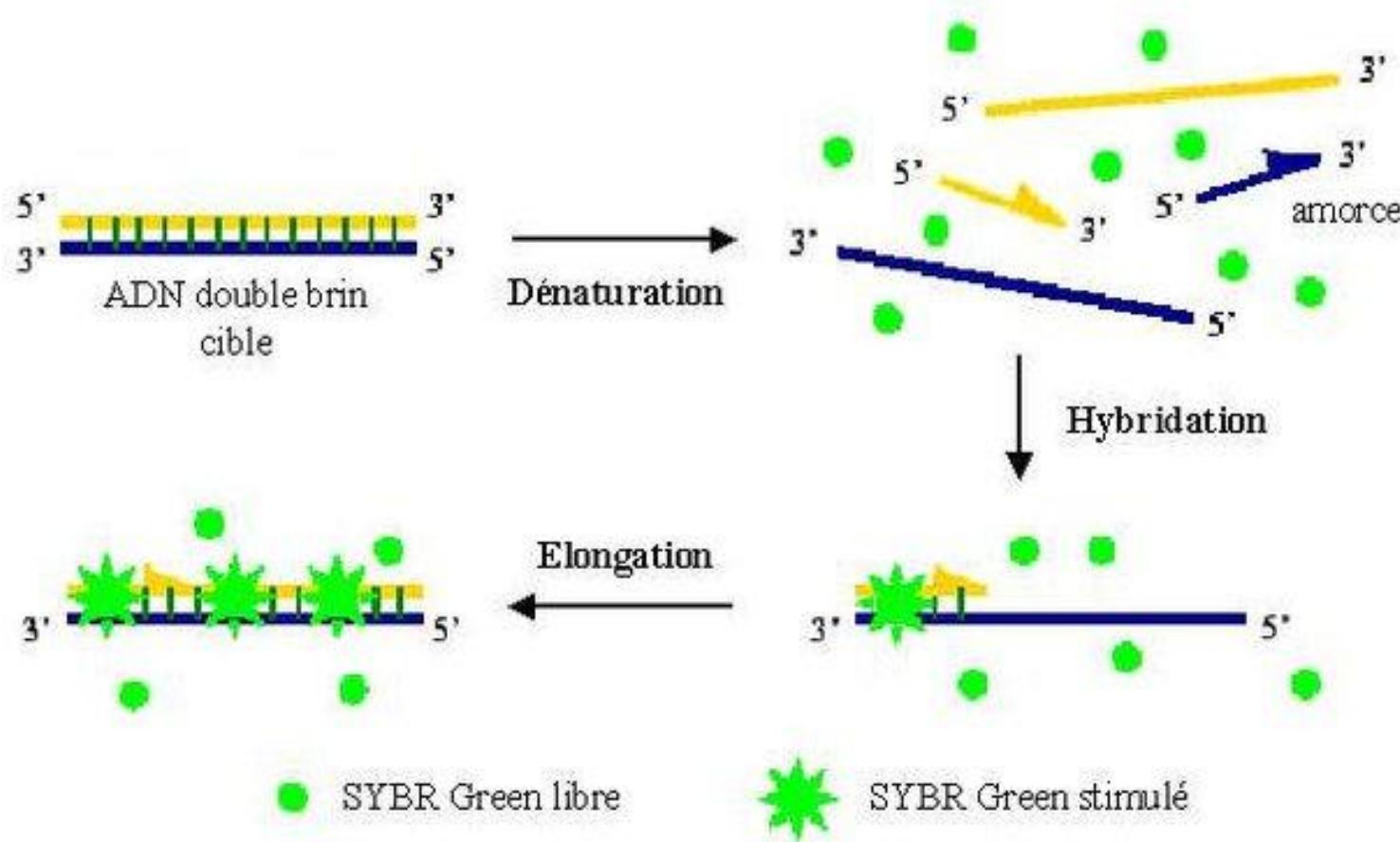
Conversion de tous les CT en ratio d'expression normalisé.

L'expression normalisée d'un gène d'intérêt :

$$R = \frac{\text{Quantité relative du gène d'intérêt}}{\text{Quantité relative du gène de référence}}$$

Technologies de détection :

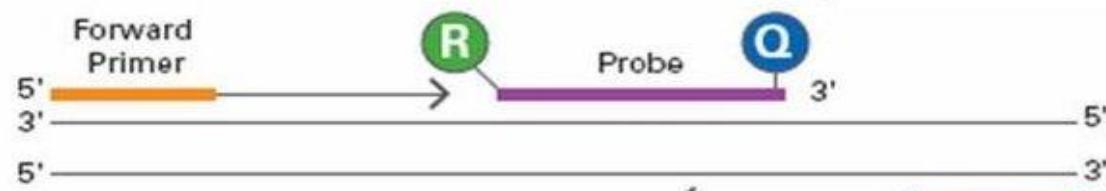
Deux principes généraux de détection : les agents qui se lient à l'ADN double brin (SYBR Green I) et les sondes fluorescentes (Taqman assay).



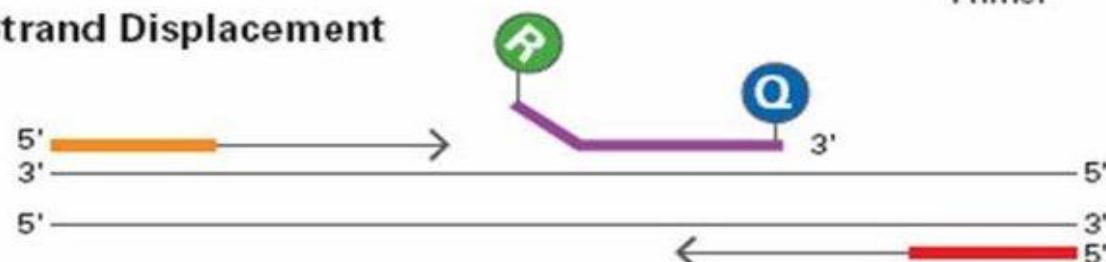
Utilisation du **SYBR Green I** en PCR en temps réel. Le SYBR Green I est un agent intercalant, dont l'émission de fluorescence augmente lorsqu'il se lie de façon non spécifique à l'ADN double brin. Au cours de la phase d'élargissement de chaque cycle d'amplification, l'intensité du signal fluorescent augmente, suite à la fixation, au double brin d'ADN naissant, d'un nombre croissant de molécules de SYBR Green I au fur et à mesure de la progression de l'ADN polymérase (Bouladoux, 2003).

Polymerization

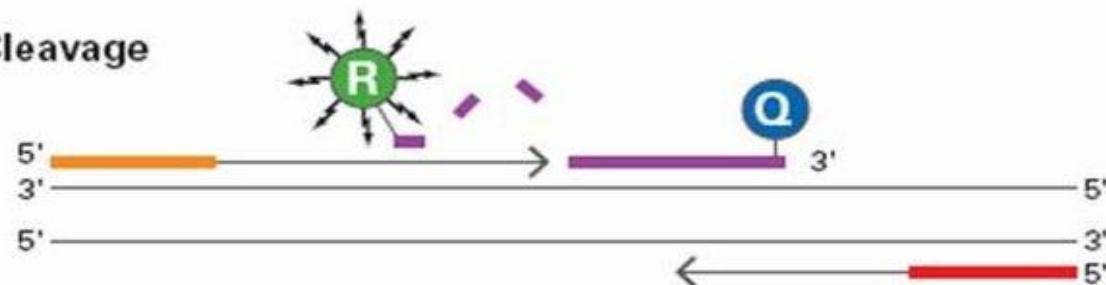
R = Reporter
Q = Quencher



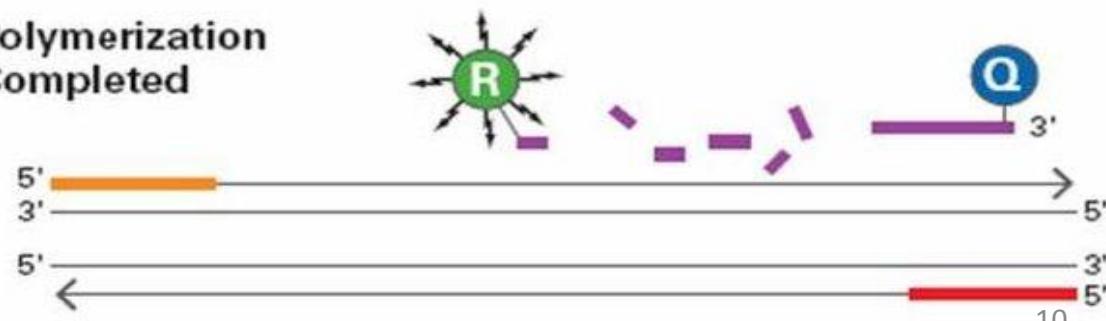
Strand Displacement



Cleavage



Polymerization Completed



Principe de détection des produits de PCR par la méthode **Taqman** :

La séquence oligonucléotidique complémentaire de l'ADNc à amplifier présente un fluorochrome à son extrémité 5' dont la fluorescence est absorbée par un «quencher» présent à l'extrémité 3' de celle-ci. Au cours de la phase d'hybridation, cette séquence d'oligonucléotides s'hybride à l'ADN simple brin correspondant. La phase d'elongation conduit alors à la destruction de cette séquence, de part l'activité exonucléase de la polymérase, séparant alors le fluorochrome du «quencher» qui émet alors une fluorescence mesurable (Piquereau, 2001).