Objectif :

* Faire synthétiser une enzyme par un autre organisme pour, par exemple, étudier ses effets.
* Réaliser des copies d’une séquence d’ADN.

## Amplification en chaîne par polymérase ACP (ou PCR en anglais)

L’amplification en chaîne polymérase permet de dupliquer un grand nombre de fois des séquences d’ADN ou d’ARN à partir d'une faible quantité. Cela peut servir aussi bien dans les enquêtes criminelles ou pour obtenir le génome de momies ou de mammouths.

Il faut une amorce pour la séquence à amplifier. La méthode consiste à répéter un grand nombre de fois les étapes suivantes :

1. Dénaturer en chauffant. L’ADN est dénaturé en étant soumis à une température de 95°C.
2. Hybridation avec la sonde. Reformation des liaisons d’hydrogène avec une amorce pour chaque brin par une baisse de la température qui correspond à la température de fusion -2°C.
3. Réplication. On ajout l’amorce avec des polymérases et des nucléotides pour que l’élongation est lieu. L’ADN polymérase utilisée est résistante à la chaleur. Elle est issue d’une bactérie vivant dans des sources chaudes. L’élongation a lieu à la température de 72°C et à la vitesse de 1 Kb/min.

Sonde séquence d’ADN courte et complémentaire du monobrin d’intérêt.

Les résultats de la PCR doivent être vérifiés par des contrôles :

* Positif, pas la polymérase.
* Négatif, pas l’ARNm (donc de l’ADNc) de la protéine d’intérêt.

Les résultats de la PCR sont vérifiés par migration sur gel (électrophorèse).

Choix des amorces

Lors du choix des amorces, il est important de vérifier :

* Le repliement de l'ADN générer entre les deux amorces.
* La spécificité avec la séquence. Attention aux amorces qui ont des séquences complémentaires opposés et proches dans des chromosomes.
* Si c'est de l'ADN codant prendre une amorce qui chevauche deux exons pour éviter l'hybridation avec l'ADN génomique.

### Démarrage à chaud

La PCR est démarrée à chaud « hot start » permet d’éviter les interactions non spécifiques de l’amorce et limiter la polymérisation avec des associations non spécifiques entre les brins. :

* La Taq est inhibée par un anticorps ce qui permet de préparer les réactifs à température ambiante. Le démarrage à chaud permet de lever l’inhibition de la polymérase en dénaturant l’anticorps.
* Les réactifs sont assemblés dans la glace pour ralentir l’activité enzymatique de la Taq. Le démarrage à chaud permet d’éviter la polymérisation avec des liaisons non spécifiques.

Les paramètres expérimentaux sur lesquels on peut jouer pour optimiser la PCR sont :

|  |  |
| --- | --- |
| La quantité de Mg2+ | La température d’hybridation. |

## PCR analyse jusqu’à l’épuisement du dNTP

La PCR analyse est une technique qui permet d’estimer le nombre de matériel de départ (nombre de séquences initiales). Cela est utile, par exemple, pour connaitre le niveau d’expression d’une protéine.

1. La quantité de nucléotides est fixée au départ.
2. Les cycles sont réalisés jusqu’à épuisement des nucléotides.

Plus il y a de séquences au départ, plus la phase de réplication aura lieu prématurément.

Les paramètres qui agissent sur la température de fusion :

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Paramètre | Agit sur | Si le paramètre augmente |
| Coeff de Chargaff %GC | Le nombre de liaisons hydrogène | Stabilise |
| pH qui ionise les phosphates | La force de répulsion électrostatique (dénaturant) | Dénature |
| Concentration en cation, force ionique | Neutralise les charges | Stabilise |
| L’urée, formamide | Compétiteur des liaisons hydrogène entre bases | Dénature |
| Concentration en ADN, Activité de l'eau | Affecte la constante diélectrique | Stabilise |
| Longueur de la molécule d'ADN | Nombre de zones riches en GC | Stabilise |

## Révéler les fragments d’ADN présent

Deux méthodes pour révéler les fragments présents :

* Indirecte. Pour cela, on utilise des agents intercalants qui permettent de quantifier tous les brins hybridés.
* Directe, une séquence particulière est quantifiée. Ce principe utilise des sondes.

Avantages et inconvénients de chaque méthode :

### Les types de sondes

Les sondes contiennent l’élément fluorescent. Elles sont spécifiques à la séquence d’intérêt. Les principaux types de sondes sont :

* Taqman La fluorescence est inhibée par sa liaison avec la sonde. Lorsque la sonde est appareillée. La polymérase dégrade l’extrémité 5 ‘-3’ et libère le fluorochrome qui devient actif.
* FRET. La méthode utilise deux sondes qui lorsqu’elles sont adjacentes, elles deviennent fluorescentes. Il y a deux fluorochromes. Le premier émet un photon capté par le second. Les spectres d’absorption et d’émission doivent se recouper.
* Balise moléculaire. La sonde adopte un repliement qui inhibe le fluochrome lorsqu’elle n’est pas liée à l’ADN. L’inhibition est alors levée lorsqu’elle s’hybride avec sa séquence complémentaire et le fluorophore devient actif.

### Optimiser la PCR

Une attention particulière doit être accordée à :

* La pureté de l’ARN ou ADN. Une contamination peut entrainer forte augmentation du nombre de copies.
* La précision dans le pipetage.

# PCR quantitative (qPCR)

PCR quantitative (qPCR) ou PCR en temps réel permet de mesurer :

* La quantité de transcription d’un gène par l’ARN càd la quantité de protéines produite. L’ARNm est récupéré et rétro transcrit en ADNc.
* La quantité d’ADN présent au départ.

Elle permet de suivre en temps réel la quantité d’ADN à chaque cycle.

Le principe est de suivre la quantité de produits grâce au niveau de fluorescence. Attention, lors des premiers cycles, la fluorescence est souvent bruitée.

Deux approches sont possibles pour quantifier l’ADN :

* Relative connaitre la quantité par rapport à un autre échantillon. Par exemple, pour connaitre le niveau d’expression d’un gène entre d’un malade et d’un patient sain. C’est la méthode qui permet une meilleure reproductibilité des résultats.
* Absolu connaitre la quantité de façon absolue. Par exemple pour quantifier des protéines virales.

La valeur seuil (ou en anglais) doit être déterminer dans la phase exponentielle. Deux méthodes permettent de déterminer la phase exponentielle :

* A vue d’œil.
* En utilisant la dérivé seconde. On obtient une courbe qui décroit linéairement lorsqu’elle est exponentielle.

Attention : Il n’est souvent pas possible d’utiliser un ADN comme standard car il n’existe pas de moyen de vérifier l’efficacité de la transcription inverse.

## Efficacité de la PCR

En théorie, à chaque cycle, on devrait avoir copie.

En pratique, à chaque cycle, le nombre de copie est de avec l’efficacité.

Rmq : Pour une efficacité de 100%, et le coefficient de copies est égale à 2.

En passant par log, on démontre que :

Avec :

* le nombre de cycles au seuil.
* le nombre de séquence au seuil.

Rmq : un Ct grand indique que le gène est faiblement exprimé.

### Optimisation et de la PCR

L’efficacité de la réplication dépend de :

* Amorce à 90%.
* Pureté de l’échantillon.
* Séquence cible.
* Longueur de l’amplicon.

Pour optimiser le processus, il est possible de faire la gamme qu’une seule fois puis de créer des échantillons qui reprennent la gamme (càd des échantillons de gamme) avec les échantillons à quantifier.

* Une fait la gamme une seule fois
* Deux gammes contrôles et les échantillons à quantifier

# Méthode absolue

La méthode absolue permet d’obtenir le nombre exact de copie. Elle ne fonctionne que si les paramètres sont strictement identiques : amorces, type de matrice cible, tampons, etc.

Tracer la droite d’efficacité et déduire la valeur en reportant le Ct sur la droite.

# Méthode relative

La méthode relative consiste à exprimer la quantité d’ADN initiale par rapport un gène de référence.

Le ratio correspond au rapport de l’expression d’un gène cible sur un gène d’intérêt entre deux échantillons (une condition d’intérêt et une condition de référence).

Le gène d’intérêt et le gène endogène sont présents dans les mêmes échantillons.

* Normaliser les résultats entre les expériences.
* Validation de l’expérience comme contrôle positif.
* Possibilité d’utiliser les résultats pour une courbe standard relative.

## Sans calibreur

Méthode des courbes standards (standards externes)

Courbes standards avec des d’efficacité différentes mais constante entre le gène cible et de référence.

Indépendamment, on construit une gamme qui possède les deux gènes pour obtenir le graphique

On reporte le Ct de chaque valeur de fluorescence de caque gène pour déterminer la quantité de gènes à N0.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | Gène d’intérêt | Gène de référence |
| Echantillon intérêt | Log(No) |  |
| Echantillon référence |  |  |
| Calcul du ratio |  |  |
| Ratio de quantité | Log(No)/ Log(No) / Log(No)/ Log(No) | |

Hypothèse :

* L’efficacité est la même entre le gène étudié et celui de référence.
* Log de concentration on vérifie que c’est linéaire.

## Avec calibreur

Le gène calibreur n’a pas de différence d’expression (expression constante) entre les échantillons. Concrètement, on choisit généralement un gène de ménage (domestique/housekeeping) qui s’exprime de façon identique dans chaque cellule comme ceux qui codent pour l’actine…

Rmq : Les gènes domestiques sont des gènes dont le niveau d’expression varie peu entre les types cellulaires et entre les conditions.

Rmq : Le calibreur sert également de contrôle positif.

Par exemple :

* Gène cible : transcrit de fusion BCR‐ABL
* Calibreur lignée cellulaire : K562
* Gène domestique : G6PDH

Deux méthodes :

* Sans correction d’efficacité appelé rapide et pas de gamme) juste deux échantillons.
* Avec correction d’efficacité càd lorsqu’elle n’est pas constante ou égale à 2.

Il faut deux échantillons :

|  |  |
| --- | --- |
| Intérêt- Référence appelé | Calibreur-Référence |

### Sans correction d’efficacité

Le ratio d’expression est égal à .

Cette méthode fonction uniquement si l’efficacité est :

* La même entre les deux échantillons.
* Constante et comprise entre 95% et 100%.
* La différence entre les droites ne dépasse pas .

### Avec correction d’efficacité

Cette méthode nécessite de connaitre les efficacités.

Pour chaque gène, puis on pose .

## Validation des échantillons

Pour valider la PCR, il faut vérifier :

* La gamme de CT qui doit être comprise entre [15 ;30].
* La dispersion des échantillons entre eux et avec la valeur théorique.

### Dispersion des échantillons

La dispersion des réplicas :

< 1%

La division par la moyenne permet de compenser la différence exponentielle entre les échantillons dû à l’augmentation exponentielle des différentes quantités d’ADN.

Différence de quantité d’ADN observé et théorique :

Précision (precision) dispersion des mesures.

Justesse (accuracy) mesure l’éloignement entre la prédiction et la mesure.

# ddPCR

Une PCR est réalisée dans des gouttelettes de 1nL. La quantité de fragments dans chaque gouttelette suit la loi de Poisson. Ce qui permet d’estimer la quantité de départ :

Avec :

* concentration absolue copies par nL.
* facteur de dilution.
* volume moyen des gouttelettes
* P nombre de gouttelettes positives.
* P nombre de gouttelettes total.