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 liaison 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. ADN polymérase résistante à la chaleur pour polymériser les séquences. L’ADN polymérase utilisé 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.

## PCR

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).

## 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 |
| le coeff de Chargaff %GC | le nombre de liaisons hydrogène | Stabilise |
| le pH qui ionise les phosphates | la force de répulsion électrostatique (dénaturant) | Dénature |
| la concentration en cation, force ionique | neutralise les charges | Stabilise |
| L’urée, formamide | compétiteur des liaisons hydrogène entre bases | Dénature |
| la concentration en ADN, Activité de l'eau | affecte la constante diélectrique | Stabilise |
| la longueur de la molécule d'ADN | le nombre de zones riches en GC | Stabilise |

## Les types de sondes

Sondes spécifiques

* Taqman La fluorescence inhibé 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 Deux sondes qui lorsqu’elles sont adjacentes. Elles deviennent fluorescentes. Il y a deux fluorochromes. Le premier émet un photon capté par le seconde. Les spectre d’absorption et d’émission doivent se recouper.
* Balise moléculaire. Fluorophore inhibé et lié à l’ADN.

## Révéler les fragments d’ADN présent

Deux méthodes pour révéler les fragments présent :

* Indirecte seul
* Directe

Non spécifique consiste à utiliser des agents intercalants. tout est quantifié

Spécifique un séquence spécifique est quantifié

Avantages et inconvénients de chaque méthodes :

### Démarrage à chaud

La PCR est démarrée à chaud « hot start ».

* La Taq est inhibé par un anticorps possibilité de préparer les réactifs à température ambiante. Le démarrage à chaud. Permet de dénaturer l’anticorps.
* Les réactifs sont assemblés dans la glace pour ralentir l’activité enzymatique de la Taq. Le démarrage à chaud permet d’éviter les interactions non spécifique de l’amorce.

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

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

# 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 protéine produite. L’ARNm est récupéré et rétro transcrit en ADNc.
* mesurer 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.
* 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.

## 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 :

Relative ratio entre plusieurs gènes calibreurs.

L’efficacité de la réplication dépend de :

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

# Méthode absolue

La méthode absolue permet d’obtenir le nombre exact de copie. fonctionne il faut être dans des paramètres strictement identiques : amorces, type de matrice cible, tampons, etc.

# Méthode relative

Deux approches existent pour :

* La méthode des courbes standards. Hypothèse : référence et cible ont la même efficacité et la somme de leur efficacité est égale 2.
* Méthode comparative des CT. Avec correction d’efficacité pou avec une efficacité non constante et pas nécessairement égale à 2.

Il faut définir :

* Gène référence/domestique/housekeeping Contrôle endogène gène de contrôle qui n’a pas de différence d’expression entre les différents échantillons. Concrètement, on choisit généralement un gène qui s’exprime de façon identique dans chaque cellule comme ceux qui codent pour l’actine… (ce type de gène est appelé housekeeping). Le gène de référence doit avoir un Cp similaire pour chaque échantillon. (expression constante).
* Calibreur est l’échantillon qui est comparé et qui sert de référence aux autres échantillons. Sa valeur est 1.

Par exemple :

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

Absence de variation de l’expression des gènes calibreurs.

Rmq : Les gènes domestiques sont une catégorie de gène catégorisé en niveau d’expression.

Pseudogène gène inactif.

Une attention particulière doit être accordée à :

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

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.

Le gène domestique est exprimé à la fois dans les échantillons calibreurs et les échantillons du gène d’intérêt.

## Méthode des courbes standards (standards externes)

Hypothèse :

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

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

## Méthode comparative des CT (normalisé par un calibreur)

Calibreur contrôle positif pour la cible et la référence.

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

Variabilité de l’échantillon limité car pureté, la dégradation, quantité pipetée ?

Le gène d’intérêt et le gène endogène sont présents dans les même échantillons. On mesure le Ct càd le nombre de cycles nécessaire pour atteindre la valeur de fluorescence, pour chaque gène de façon indépendante.

Ensuite, on calcule

Hypothèse l’efficacité est comprise entre 95% et 105%   
et .

En cas d’efficacité variable, il est possible d’effectuer une correction d’efficacité.

### Sans correction d’efficacité

Hypothèse : Référence et cible ont une efficacité de 100%.

### Avec une correction d’efficacité

Si l’efficacité du gène calibreur est différente de celle du gènes d’intérêt. Il faut réaliser une gamme de gènes (au moins 3) pour modéliser l’efficacité en fonction de la concentration.

Il faut au moins 2 gènes calibreurs. Ces gènes doivent avoir le même ratio pour chaque échantillon.

Deux groupes d’échantillons : calibre + référence et intérêt + référence.

# ddPCR

gouttelette de 1nL sur la loi de Poisson.

Avec :

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

Répartition des fragments suit la loi de poisson.

Relative augment la reproductibilité des résultats

Amorce :

- Repliement de l'ADN générer entre les deux amorces.

- Spécificité de la séquence données. Attention si les deux amorces 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.