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

* la quantité de transcription d’un gène par l’ARN.
* 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 pour 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 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 sert de référence aux autres échantillons. Sa valeur 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 est un 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 pipeté ?

Le gène d’intérêt et celui endogène sont présent 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

# PCR

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 :