

TD 02 : La PCR

La qPCR : la PCR quantitative ou PCR en temps réel

La PCR quantitative (ou qPCR), ou PCR en temps réel, est une méthode particulière de réaction en chaîne par polymérase permettant de mesurer la quantité initiale d'ADN. En réalité, la PCR quantitative mesure le nombre d'amplicon (portion d'ADN définie par un couple d'amorces).

Son principe est de suivre la quantité d'ADN cycle après cycle grâce à un marqueur fluorescent dont l'intensité d'émission est proportionnelle à la quantité de produits. Consiste à utiliser l'enzyme polymérase pour répliquer une petite quantité d'ADN cible dans une réaction chimique. La réaction est suivie en temps réel en mesurant les signaux fluorescents générés par les composés fluorescents liés aux produits raffinés. On doit mettre le mélange réactionnel de la PCR une molécule émettrice de fluorescence (SyberGreen ou des sondes fluorescentes. Le thermocycleur est branché à un ordinateur qui, avec un programme dédié va mesurer l'intensité de fluorescence cycle après cycle et il va tracer une courbe.

- **Le Processus de qPCR**

A la différence d'une PCR classique, la PCR en temps réel utilise une sonde fluorescente qui permet la quantification et la caractérisation de l'amplicon formé en temps réel.

Le processus qPCR commence par l'ajout de l'échantillon à la machine PCR.

L'échantillon est ensuite chauffé à 95°C pour décomposer l'ADN cible en petits morceaux.

Ensuite, l'échantillon est refroidi à 50-60°C pour ajouter la Taq polymérase et les composés fluorescents. La Taq polymérase se lie à de petits morceaux d'ADN cible et commence à les répliquer. La réplication de l'ADN se produit par cycles successifs.

- **L'utilisation de PCR quantitative**

1. Déterminer la quantité d'ADN cible dans l'échantillon. Par exemple, la qPCR peut être utilisée pour déterminer la quantité de virus VIH dans un échantillon de sang.
2. Détection de la présence d'ADN cible dans l'échantillon. Par exemple, la qPCR peut être utilisée pour détecter la présence des bactéries dans un échantillon alimentaire.
3. Déterminer l'expression des gènes. Par exemple, la qPCR peut être utilisée pour déterminer la quantité de protéine produite par un gène particulier.

4. La qPCR est une technologie précise et sensible qui peut être utilisée pour quantifier l'ADN cible dans un échantillon. Ses applications sont nombreuses en science et en médecine.

La M-PCR : la PCR multiplexe

C'est une variante de la PCR conventionnelle. Son principe de base, qui contrairement à la PCR classique, implique l'amplification de plusieurs séquences cibles simultanément en utilisant des paires multiples d'amorces dans le mélange réactionnel. La PCR multiplexe est plus rapide et plus économique, a une spécificité et une sensibilité similaires à celles de la PCR simple.

La PCR multiplexe est un protocole conçu pour augmenter plus d'un amplicon à la fois, par l'utilisation d'au moins trois amorces par réaction de PCR. Les produits de PCR ne seront alors pas compétitifs pour la polymérase, les dNTP et, peut-être, le marqueur d'ADN. Il est aussi envisageable d'augmenter différents types d'ADN reconnus par un même couple d'amorces.

Dans la PCR multiplex, il peut être difficile de trouver un contrôle endogène adéquat :

- Plus abondant que toutes les cibles à quantifier ;
- Qui ne modifie pas les niveaux d'expression selon les conditions d'expérience ou avec différents échantillons.

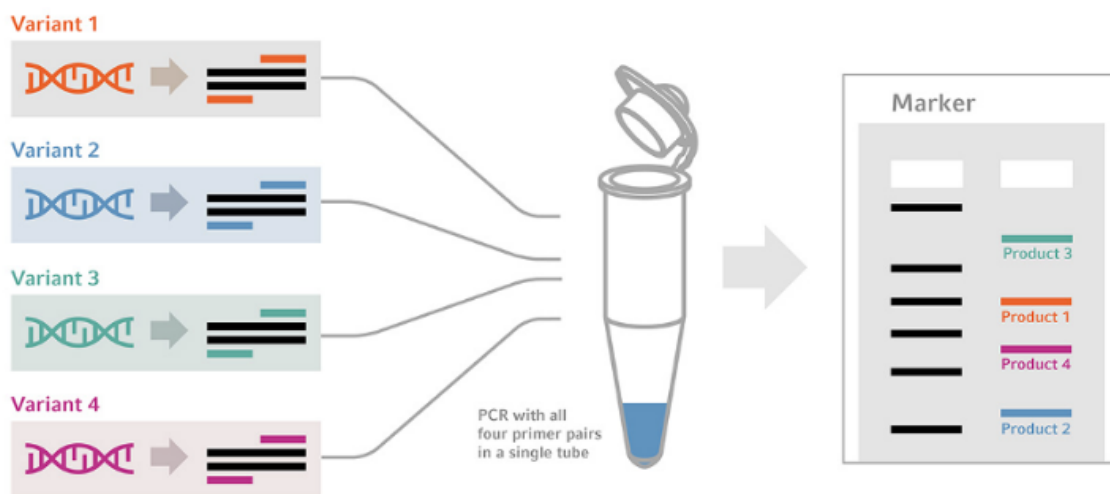


Figure : Schéma montrant l'approche PCR multiplex

Son principe repose sur l'utilisation de plusieurs couples d'amorces pour amplifier simultanément plusieurs cibles d'ADN en une seule réaction de PCR, plutôt qu'un seul couple d'amorces pour amplifier une cible d'ADN unique.

Avant de réaliser votre PCR multiplexe, vous devez indiquer les séquences d'ADN cibles à amplifier dans une base de données telle que GenBank, puis faire le design des amorces

spécifiques et vérifier leur compatibilité pour être mélangées ensemble dans une même réaction de PCR.

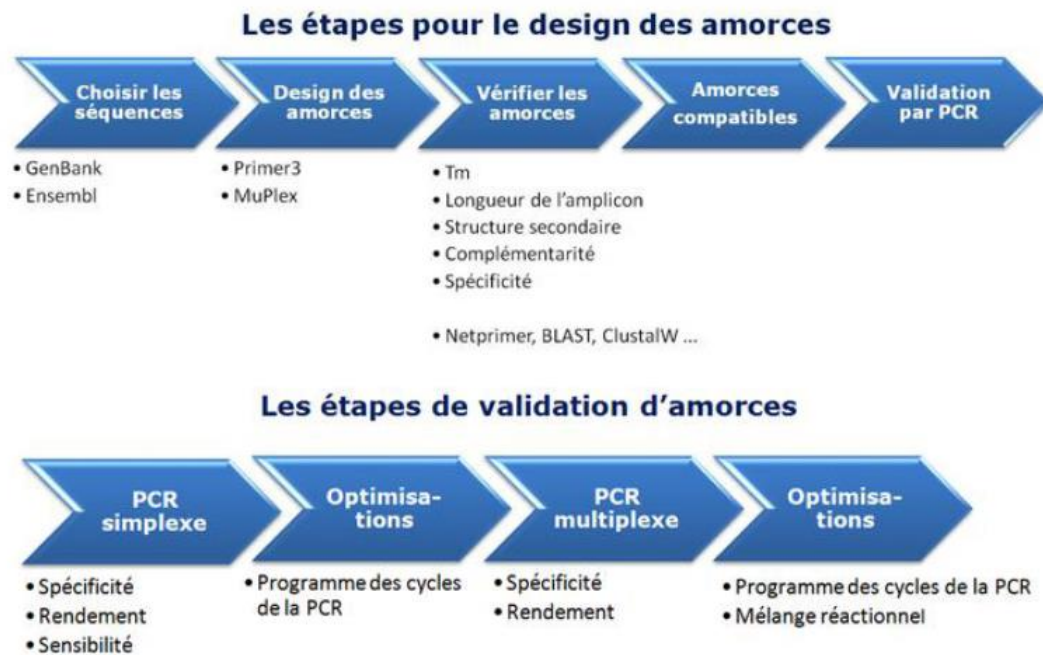


Figure : Schéma de préparation d'une expérience par PCR Multiplexe