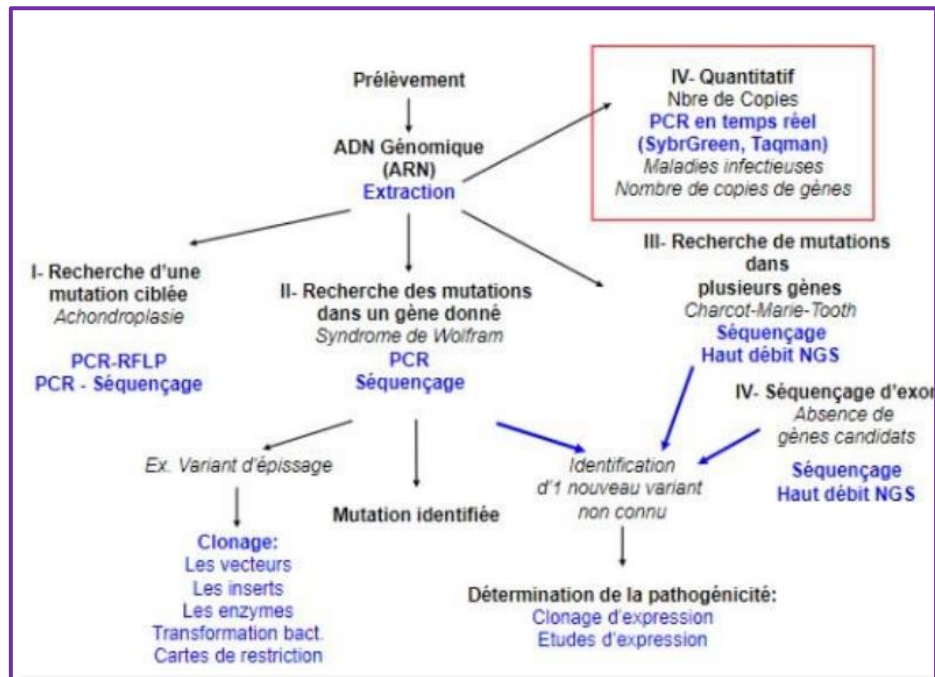


PCR quantitative = PCR en temps réel = RT-PCR

Attention à ne pas confondre PCR classique et PCR en temps réel !

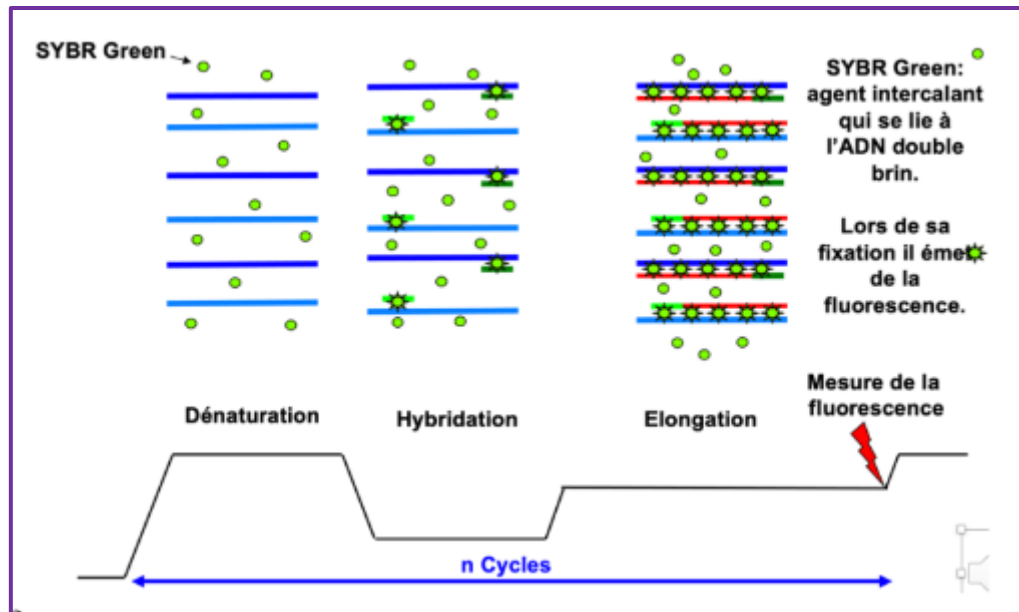
Rappel +++:



La technique de PCR en temps réel, basée sur les mêmes techniques que la PCR, permet **d'amplifier un fragment en un très grand nombre de copies** comme la PCR classique mais aussi de **quantifier**. Elle est utilisée dans les **maladies infectieuses** pour déterminer les **charges virales** et pour quantifier le **nombre de copies de virus**. Elle est également utilisée pour **déterminer l'expression d'un ARN**.

Fonctionnement de la PCR en temps réel :

- On va y retrouver nos cycles de dénaturation-hybridation-élongation en fonction de la température
- La spécificité de la PCR en temps réel est principalement l'étape à laquelle on fait la mesure.
- Le milieu réactionnel est composé par exactement les mêmes réactifs que la PCR classique (fragments d'ADN, primer, polymérase...) auxquels on ajoute le **SYBR Green** (=agent intercalant)



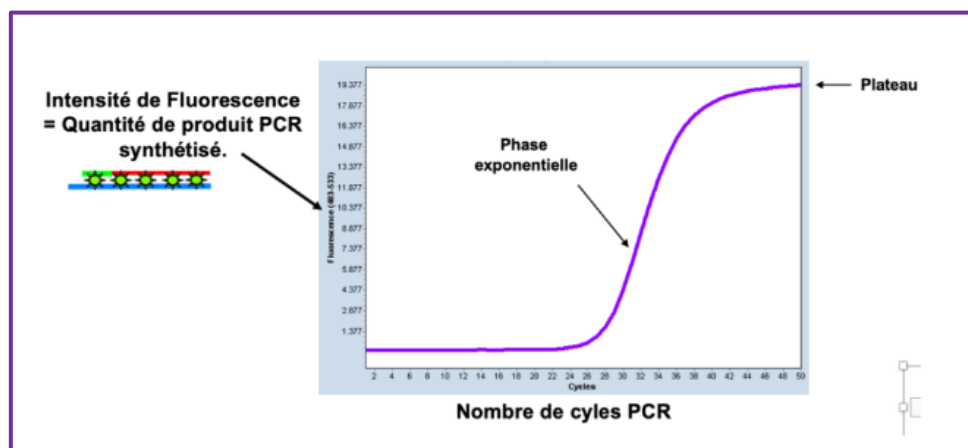
- Lors de l'hybridation, le SYBR Green est capable de **s'intercaler** dans l'ADN et de **fluorescer** → il a la propriété d'être **fluorescent à partir du moment où il est intercalé dans l'ADN +++**
- Ensuite, au moment de l'élongation, la Taq Polymérase synthétise le brin complémentaire

**La mesure de la fluorescence se fait après chaque cycle PCR (à la fin de l'élongation)
≠ PCR classique : au bout des 35-40 cycles +++**

- Un automate mesure, dans chaque puits, la **fluorescence** qui reflète la **quantité d'ADN produit** puisque la fluorescence est produite par SYBR Green qui s'intercale dans l'ADN double brin.

L'intensité de la fluorescence est proportionnelle à la quantité de produit PCR synthétisé

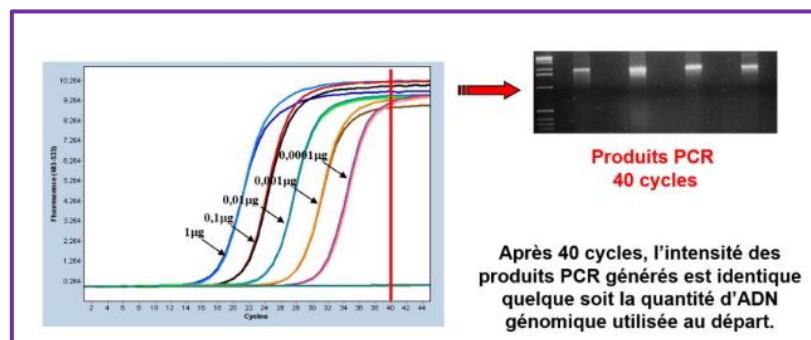
La mesure de cette fluorescence permet de dessiner la courbe qui correspond à l'intensité de la fluorescence en fonction du nombre de cycles :



On observe :

- une **phase de plateau** où la fluorescence est très basse = pas suffisamment de produit PCR pour qu'il soit détectable
 - une **phase exponentielle** où la fluorescence augmente
 - une **autre phase de plateau** = à env. 40 cycles, le système est **saturé** (il n'y a plus de dNTP → la Taq Polymérase ne fonctionne plus)
- ➔ **On aura beau augmenter 1000 fois la quantité de cycles, on n'aura pas plus de produits PCR**

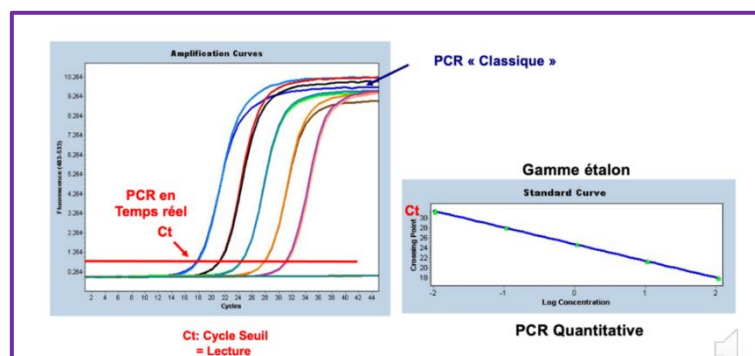
Effet de la quantité initiale d'ADN génomique sur la PCR quantitative :



On voit que les courbes sont décalées en fonction de la quantité initiale d'ADN génomique. Si on fait des dilutions de 10 en 10 de la quantité d'ADN, on voit un **décalage** de la courbe et surtout de la **phase exponentielle**. *Pourquoi ?* Si on met **beaucoup d'ADN génomique au départ**, il faudra **moins de cycles** pour obtenir une quantité d'ADN suffisante pour que la **fluorescence soit détectable**.

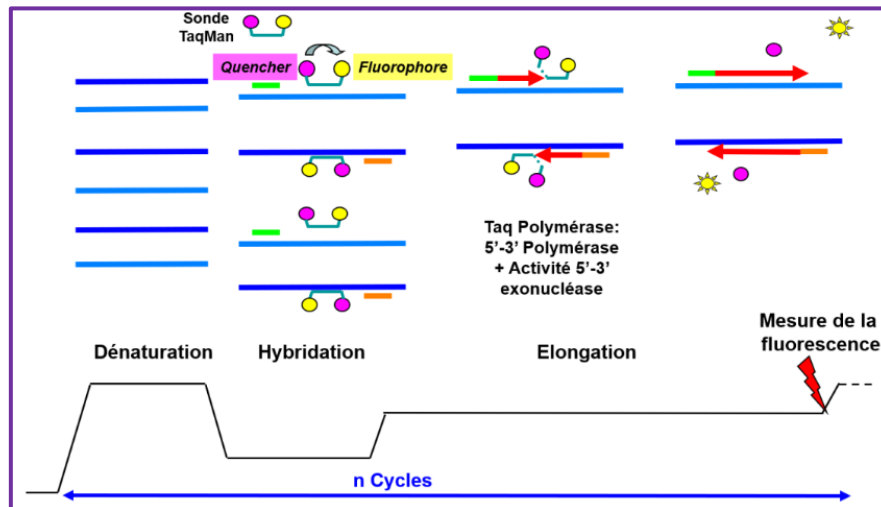
Si on mesure au bout du 40^{ème} cycle (comme en PCR classique), l'intensité des bandes varie très peu. La quantité finale de produits PCR générée est identique quelle que soit la quantité initiale d'ADN génomique utilisée. Or, ce n'est pas ce que l'on recherche avec la PCR quantitative. Le but est de **savoir la quantité d'ADN génomique au départ** dans le tube. C'est pour cela que pour **quantifier**, on se place au début de la phase exponentielle.

Si on trace la droite de la quantité en fonction du nombre de cycles, on voit qu'il y a une **proportion linéaire** entre la quantité d'ADN génomique de départ et le nombre de cycles : on sait qu'il y a 3,3 cycles d'écart pour un facteur 10 entre les différentes concentrations d'ADN de départ → **Pour 10 fois plus d'ADN de départ, on met 3,3 cycles de moins à l'atteindre**.



Principe de fonctionnement des sondes TaqMan :

Elles remplacent l'agent intercalant (SYBR Green)



- Le milieu réactionnel est formé par la TAQ polymérase, DNTPS et 3 primers
- En effet, la **sonde TaqMan** agit comme un **primer supplémentaire** :
 - C'est une **séquence d'ADN simple brin**
 - Elle est composée en **5'** d'un **quencher** et en **3'** d'un **fluorophore**

- **Quencher et fluorophores proches = sonde dans le milieu réactionnel et hybridée à l'ADN → Quencher empêche la fluorescence d'apparaître**
- **Au moment de l'élongation, quand la Taq Polymérase va synthétiser le brin complémentaire, elle a également une activité exonucléase qui va lui permettre de dégrader la sonde TaqMan au moment où elle arrive à son niveau → Cela permet la séparation du quencher et du fluorophore et donc l'apparition de la fluorescence**
- ➔ **La mesure de la fluorescence se fait donc à la fin de l'élongation car c'est là qu'on aura le plus de sondes**

⚠ Quand on travaille sur l'ARN, on retrouve les mêmes étapes qu'avec l'ADN MAIS nous allons **ajouter une étape de reverse transcription** puisque cette PCR est faite grâce à une polymérase qui ne peut travailler que sur l'ADN. Ainsi, on obtient une **copie en ADN simple brin complémentaire de l'ARN** qui nous intéresse pouvant être utilisée directement par la Taq Polymérase.