

Les bases de la réaction en chaîne de la polymérase (PCR) - II



Ordre du jour

Les bases de la PCR
Partie I

Notions de base de la biologie
moléculaire

Définition de la PCR

Phases de la PCR

Les bases de la PCR
Partie II

Définition de la PCR en temps réel

PCR en temps réel qualitative

PCR en temps réel quantitative

Les bases de la PCR
Partie III

Définition de la température de fusion

Analyse de la courbe de fusion

PCR en temps réel



PCR en temps réel (RT-PCR)

- La PCR en temps réel est une réaction de PCR normale qui utilise un oligonucléotide supplémentaire marqué par une molécule fluorescente : c'est ce qu'on appelle une sonde.
- La sonde est un ADN simple brin complémentaire d'une séquence cible
- La sonde fluorescente émet un signal fluorescent lorsqu'elle est activée par hybridation
- Une copie de l'ADN cible active une molécule de sonde. De ce fait, le signal fluorescent sera donc directement proportionnel au nombre de copies de l'ADN cible produites
- Exemples de sondes utilisées pour la PCR en temps réel : Sondes Taqman, balise moléculaire, Scorpion...



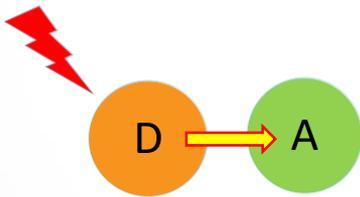
Sonde

Technologie FRET :

- Le transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET) est une interaction basée sur la distance entre deux molécules de colorant.
- L'énergie d'excitation est transférée d'une molécule donneuse vers une molécule acceptrice sans émission de photon.
- Le FRET a de nombreuses applications, y compris la PCR.

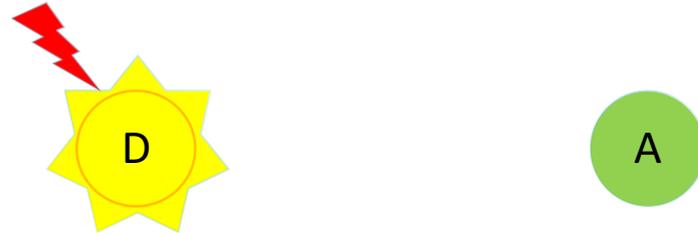
D = Donneur/Rapporteur
A = Accepteur/Supprimeur

Excitation



Proches – La fluorescence est absorbée

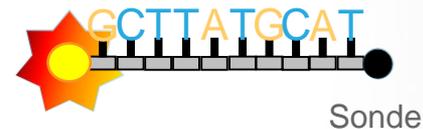
Excitation



Séparés – La fluorescence est émise

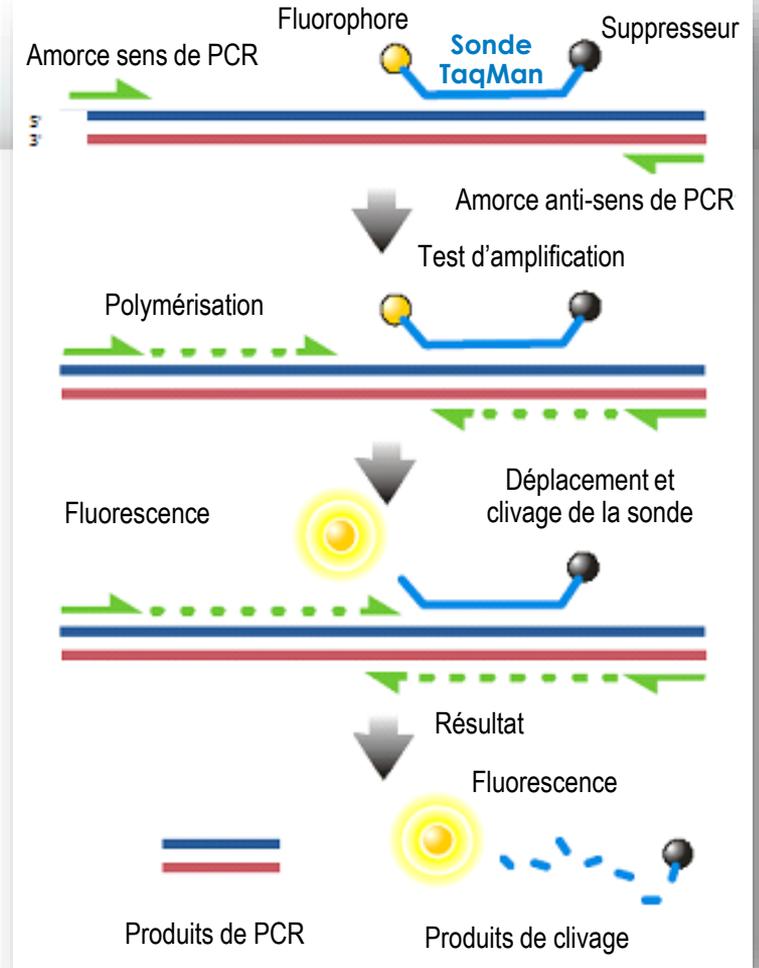
Sonde Taqman

- Une sonde Taqman est une sonde oligonucléotidique courte (de 15 à 30 bases de long) marquée par un colorant fluorescent à l'extrémité 5' et un suppresseur à l'extrémité 3'.
- Tant que le rapporteur et le suppresseur sont proches l'un de l'autre, le suppresseur absorbera la fluorescence provenant du rapporteur
- La sonde est conçue pour permettre l'hybridation de la séquence d'ADN et de la cible
- Pendant la phase d'extension de la PCR, la Taq polymérase dégrade la sonde
- Ceci séparera physiquement le rapporteur et le suppresseur. La fluorescence sera alors émise et pourra être mesurée



1 fluorophore
libre/amplicon
d'ADN

Sonde Taqman



Sonde Taqman

Rapporteur

Suppresseur



Sonde Taqman

Rapporteur

Suppresseur



Amorce sens



Sonde Taqman

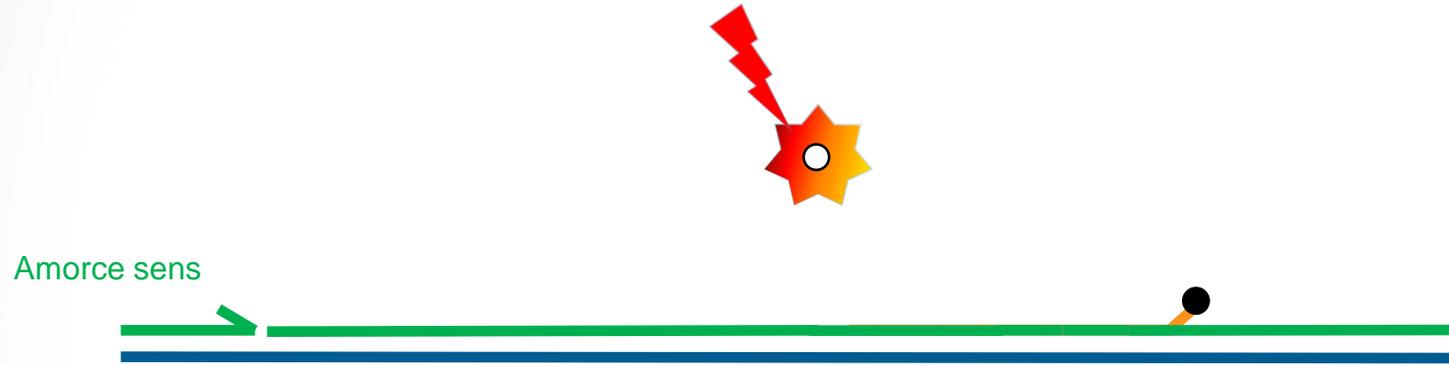
Amorce sens

Rapporteur

Suppresseur



Sonde Taqman



Sonde-balise moléculaire

- Une sonde-balise moléculaire est une molécule en forme d'épingle à cheveux constituée d'un fluorophore (rapporteur) et d'un suppresseur
- La séquence de la sonde est longue d'environ 17 à 21 bases. La séquence de la tige doit être riche en GC (> 80 % de la séquence totale) pour former un duplex stable de 5 à 8 bases de long
- Lorsqu'elles sont libres en solution, les deux extrémités sont proches l'une de l'autre, ce qui désactive la fluorescence.
- En présence de l'ADN cible, la sonde s'hybride à la cible et sépare le fluorophore et le suppresseur, ce qui déclenche l'émission de la fluorescence

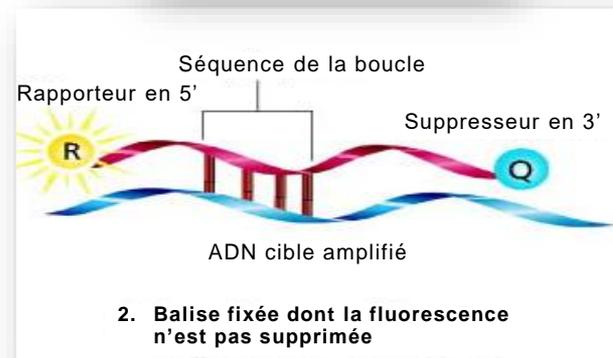
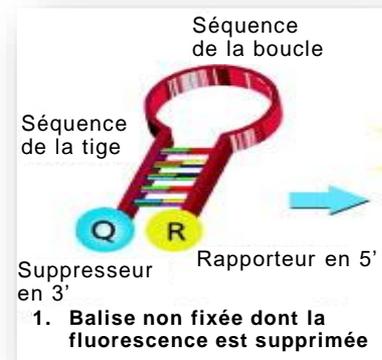
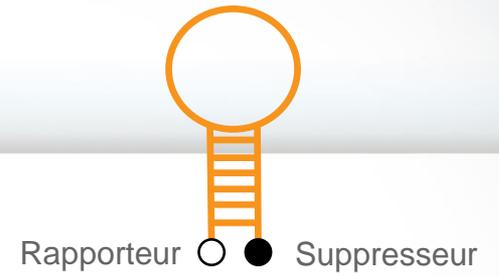


Image : Sigma-Aldrich

Sonde-balise moléculaire



Sonde-balise moléculaire



Sonde-balise moléculaire



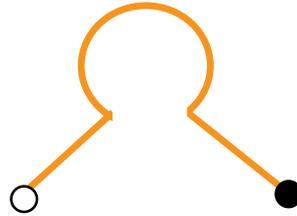
Sonde-balise moléculaire



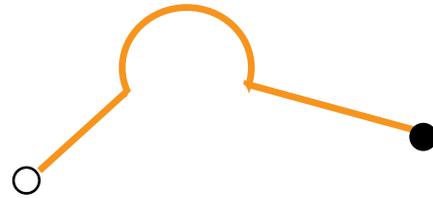
Sonde-balise moléculaire



Sonde-balise moléculaire



Sonde-balise moléculaire



Sonde-balise moléculaire

Amorce sens



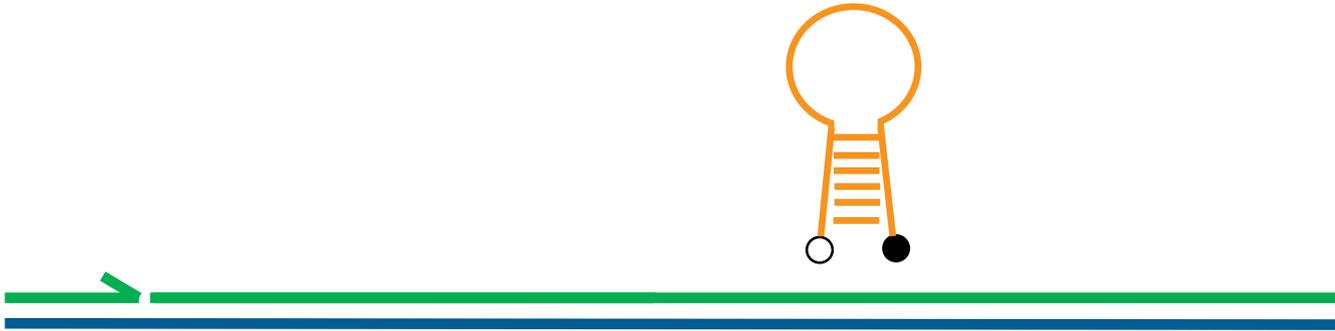
Sonde-balise moléculaire



Sonde-balise moléculaire



Sonde-balise moléculaire

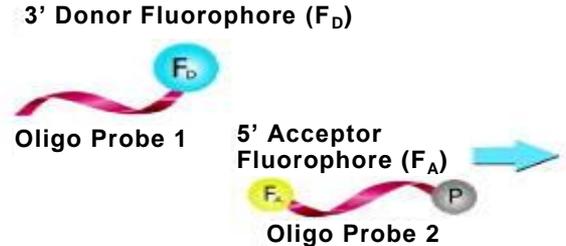


Sonde-balise moléculaire



Sonde FRET

- Les sondes FRET sont une paire d'oligonucléotides comprenant un fluorophore donneur et un fluorophore accepteur
- Lorsqu'il est excité par l'instrument, le donneur excite l'accepteur qui émettra la fluorescence. Cette fluorescence sera détectée par l'instrument
- Lorsque les sondes sont libres dans la solution, ce phénomène ne se produit pas en raison du manque de proximité
- Pendant la phase d'hybridation de la PCR, les sondes s'hybrident à proximité immédiate de l'une l'autre, ce qui permet le transfert d'énergie et l'émission et la mesure de la fluorescence



1. Probes in solution emit low fluorescence

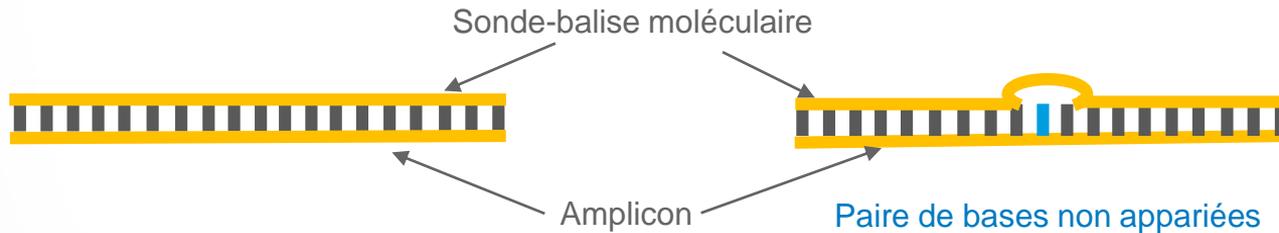


2. Emission through fluorescence resonance energy transfer

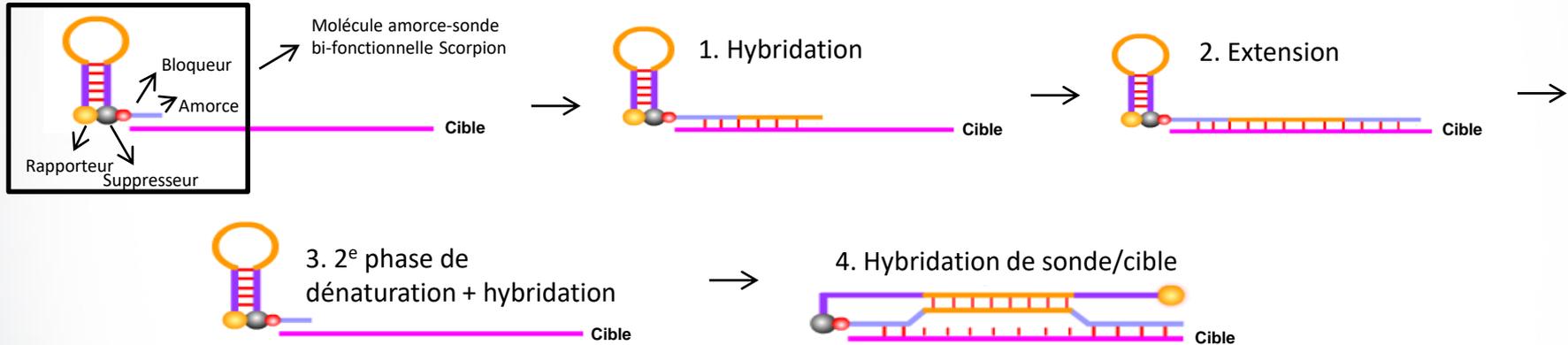
Image : Sigma-Aldrich

Balise moléculaire sous forme « relaxée »

- Les balises moléculaires sous forme « relaxée » possèdent des séquences de sonde relativement longues (environ 30 à 40 bases de long), ce qui leur permet de former des hybrides avec des amplicons appartenant à de nombreuses espèces différentes, malgré la présence de **paires de bases non appariées**.



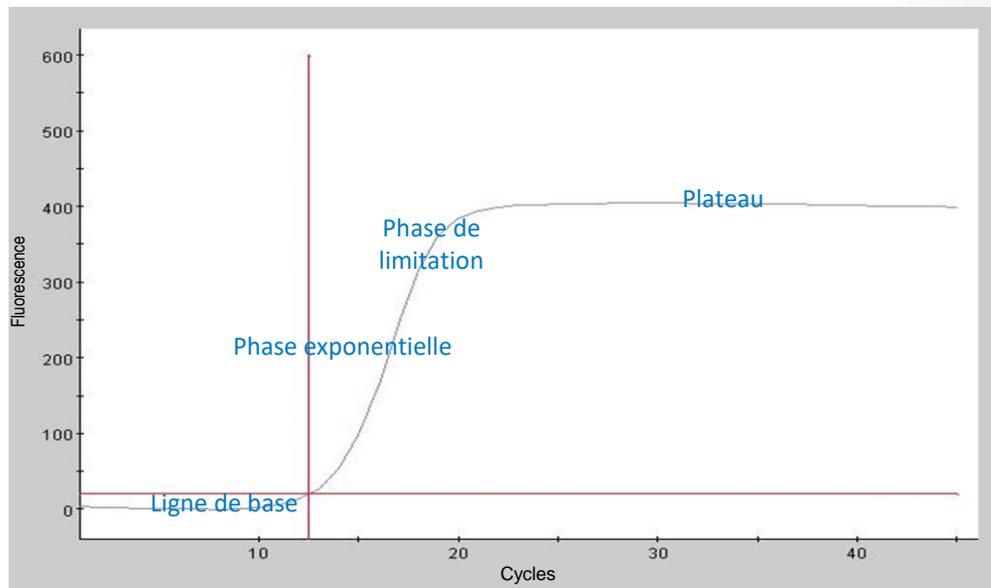
Sonde Scorpion



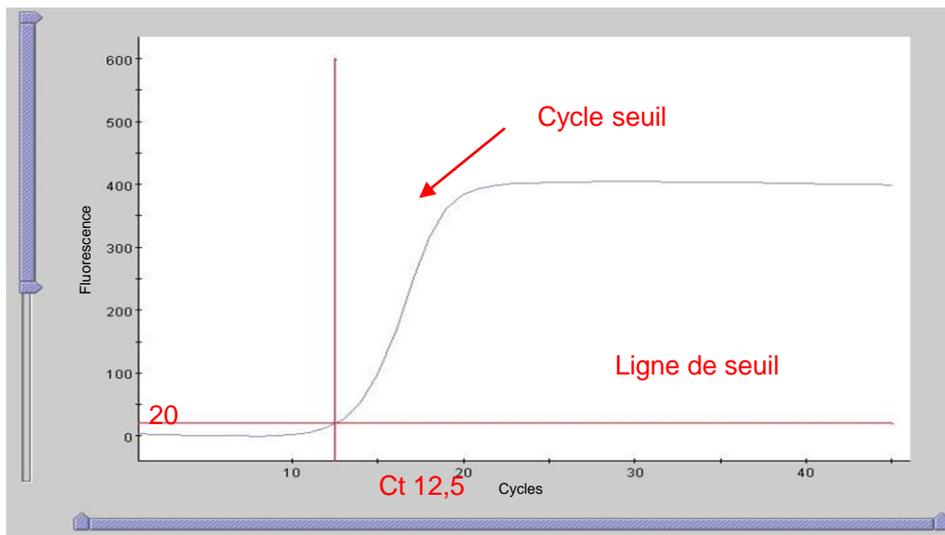
La séquence de la sonde doit être longue de 17 à 27 bases.

Changements dans la fluorescence pendant la PCR

- La courbe d'amplification comprend 4 phases :



Définition de Ct – en fonction du seuil



- Cycle seuil (Ct) : le premier cycle qui franchit un seuil de fluorescence défini
- La valeur de ce cycle peut être fractionnaire

Critères de validation d'une PCR : Plage de Ct et fluorescence en point final

- Plage de Ct
 - Il s'agit de la plage acceptable pour une valeur de Ct
 - Elle est limitée par un Ct_{\min} et un Ct_{\max}
- Fluorescence en point final
 - La valeur de la fluorescence à la fin de la PCR (Plateau)

Pour les tests Xpert, hors de la plage, la courbe d'amplification n'est pas validée : le résultat ne peut pas être fourni

PCR multiplex

- La PCR multiplex est l'amplification simultanée de **plusieurs cibles d'ADN**
 - Chaque cible dispose de son propre ensemble d'amorces
 - Chaque cible est détectée ou quantifiée grâce à sa propre sonde, marquée à l'aide d'un colorant différent et détectée à une longueur d'onde de fluorescence spécifique
- Lors de la conception d'une PCR multiplex, il faut éviter la concurrence entre les cibles

Détection de plusieurs colorants – 6 colorants jusqu'en 2020

- Différents colorants (rapporteurs) sont sélectionnés
- Ils sont excités et émettent à des longueurs d'onde différentes

Analyte	Rapporteur	Excitation (nm)	Émission (nm)
Cible 1	Colorant 1	375-405	420-480 
Cible 2	Colorant 2	450-495	510-535 
Cible 3	Colorant 3	500-550	565-590 
Cible 4	Colorant 4	630-650	665-685 
CTE	Colorant 6		> 700 
Cible 5	Colorant 5	555-590	606-650 

Détection de plusieurs colorants – désormais 10 colorants

- Différents colorants (rapporteurs) sont sélectionnés
- Ils sont excités et émettent à des longueurs d'onde différentes

		Détection dans le module I-CORE			
Canaux optiques dans le module I-CORE		Bleu + IR (420-477 nm + > 700 nm)	Vert + Rouge profond (510-535 nm + 660-680 nm)	Jaune (565-585 nm)	Rouge (620-645 nm)
Excitation dans le module I-CORE	UV (400 nm)	CF1			
	Bleu (470 nm)		FAM	CF7 (FAM-CF3)	CF9
	Vert (520 nm)	CF10 (CF3-CF6)		A532 (CF3)	CF8 (CF3-CF4)
	Jaune (574-584 nm)				TxR (CF4)
	Rouge (635 nm)	CF6	A647 (CF5)		

Quantification par PCR en temps réel

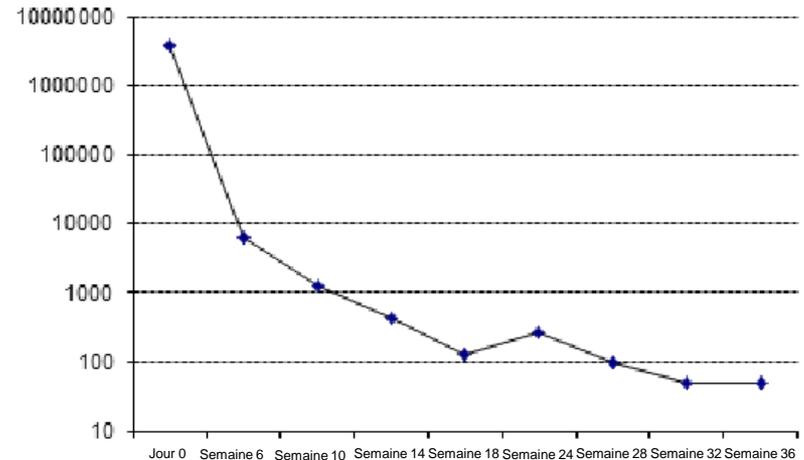


Quantification

- Quantification absolue : résultat fourni sous forme de concentration (copies/ml, UI/ml, etc...) :

Xpert HIV-1 VL et Xpert HCV

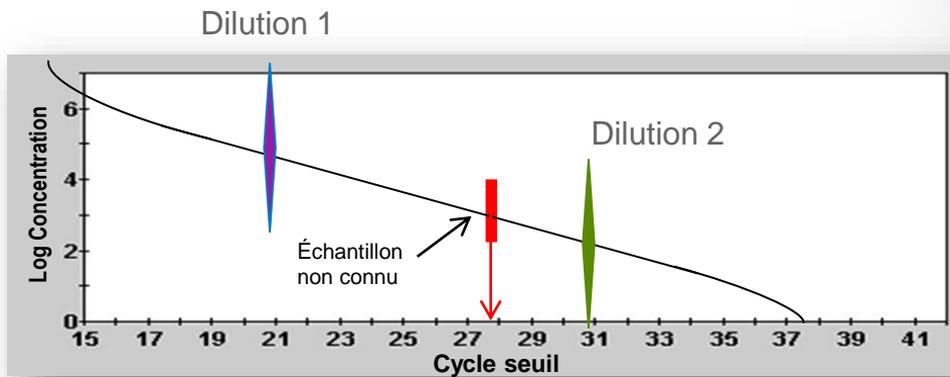
- Quantification relative : résultat fourni sous forme de rapport :
Xpert BCR-ABL



La charge virale détectée par le test HIV-1 VL diminue sous antirétroviraux (méthode différente de celle du GeneXpert).
Graphique : hivbook.com

Quantification absolue à l'aide d'étalons externes

1. Préparez les dilutions d'un échantillon contenant l'ADN cible à une concentration connue.
2. Ces dilutions seront traitées en même temps que votre propre échantillon non connu, chacune dans un tube distinct
3. Le Ct est fourni pour chaque dilution
4. La courbe d'étalonnage est tracée : Concentration en fonction de Ct
5. Le Ct de l'échantillon non connu est utilisé pour extrapoler la concentration de l'échantillon à partir de la courbe d'étalonnage



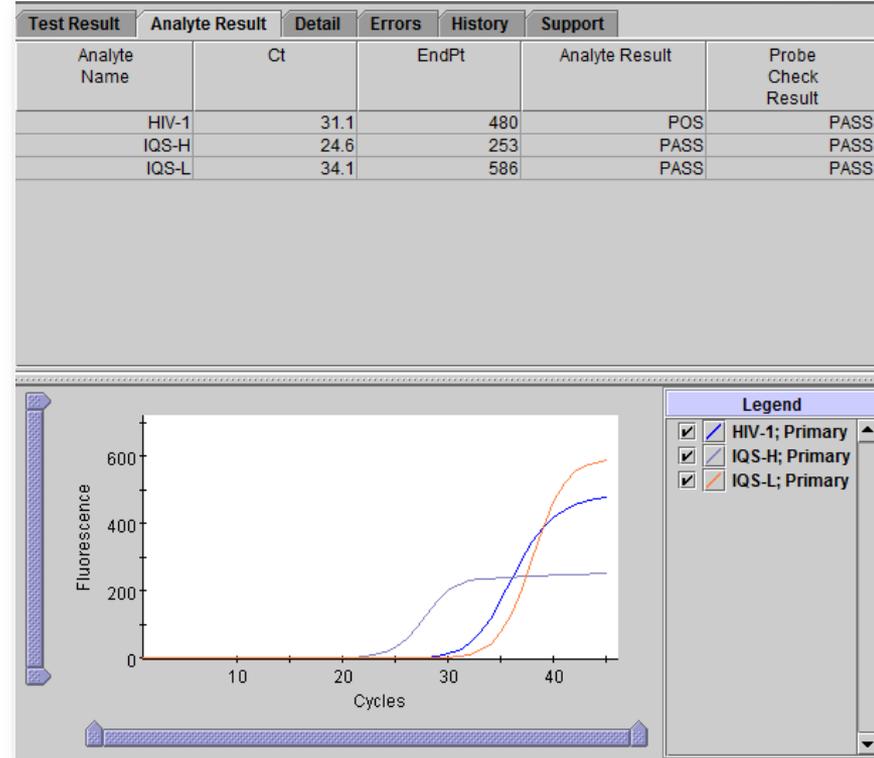
Deux étalons sont suffisants au sein de la plage linéaire de la concentration

Quantification absolue à l'aide d'étalons internes.

Pour Xpert HIV-1 VL :

Deux étalons sont utilisés pour calculer la concentration de l'échantillon :

- 1 étalon élevé (IQS-H) = 10^6 copies/ml
- 1 étalon faible (IQS-L) = 10^3 copies/ml
- La concentration de l'échantillon non connu sera calculée par le logiciel GeneXpert en fonction des Ct et de la concentration connue pour chaque étalon et du Ct de l'échantillon non connu.



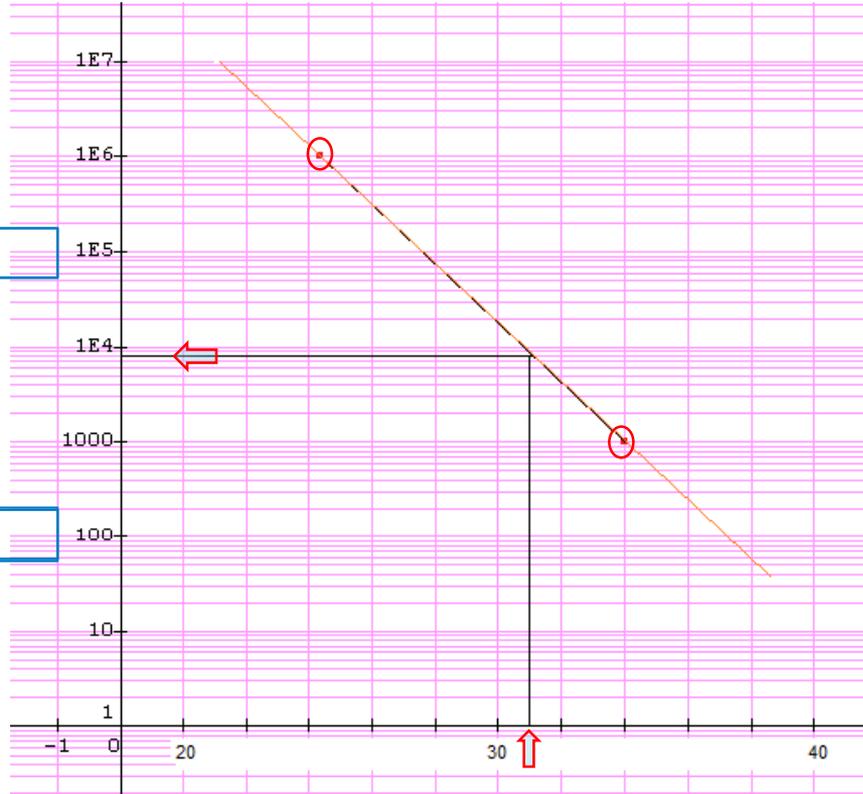
Calcul de la concentration de l'échantillon

$y = \text{charge virale}$
(copies/ml)

Analyte Name	Ct
HIV-1	31.1
IQS-H	24.6
IQS-L	34.1

IQS-H

IQS-L

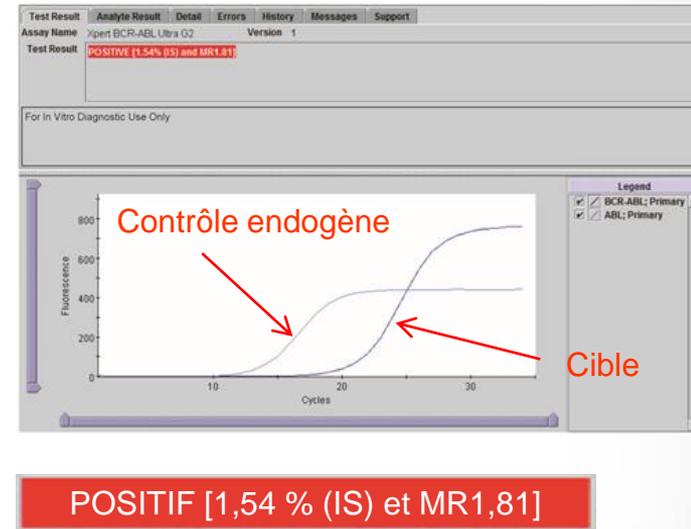


$x = Ct$



Quantification relative par PCR en temps réel (exemple : Xpert BCR-ABL)

- La quantification relative mesure le niveau d'une cible et l'exprime par rapport au niveau d'un contrôle interne (gène de référence)
- Le gène de référence peut être endogène. En tant que tel, il peut également garantir qu'une quantité suffisante d'échantillon est utilisée dans le test.
- Du fait de sa faible variabilité, le contrôle endogène peut également être utilisé pour indiquer l'inhibition de la PCR.



Exemple d'un résultat de test
Xpert BCR-ABL Ultra

Conclusion

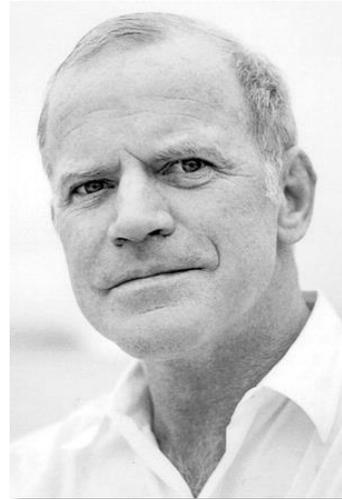
La RT-PCR est :

- Rapide
- Sensible
- Précise
- Facile à exécuter
- Quantitative si nécessaire

“

La science imagine chaque année une kyrielle de vérités et de dispositifs sensationnels.

Kary Mullis





Merci.

www.Cepheid.com

