

PRINCIPES THEORIQUES DE LA PCRq

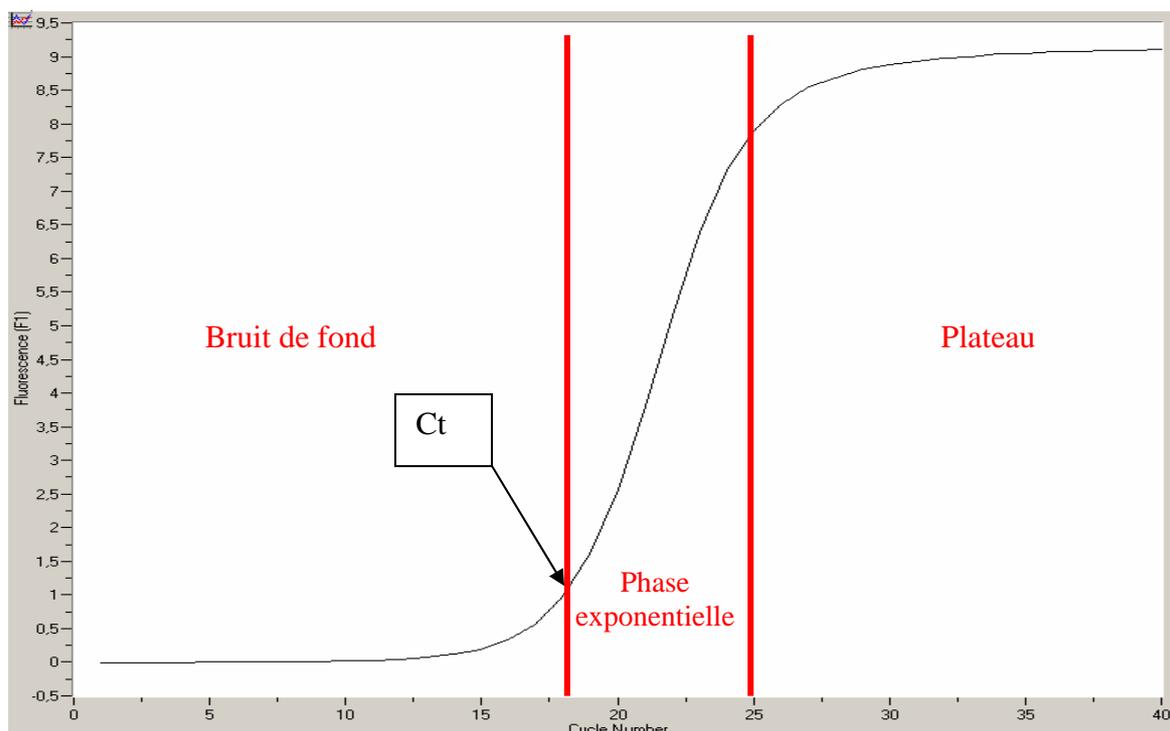
Ce chapitre aborde les notions présentées rapidement dans l'introduction (Ct, droite standard, principes de la quantification). Il détaille les différents formats de fluorescence possibles et résume les différents types d'instrumentation utilisée en PCR quantitative en temps réel.

Profil typique / Ct

La PCR quantitative en temps réel repose sur la possibilité de suivre au cours du temps (« en temps réel ») le processus de PCR à l'aide de la fluorescence. Les données de fluorescence sont collectées à chaque cycle de la PCR et représentent la quantité de produits amplifiés à cet instant. Plus l'échantillon est concentré en molécules cibles à l'origine, moins il faudra de cycles pour atteindre un point pour lequel le signal fluorescent est significativement supérieur au bruit de fond. Ce point est défini comme le Ct et apparaît en début de phase exponentielle. Cette quantification n'étudie donc pas la fin de la PCR et n'est donc pas affectée par les éléments limitants identifiés lors de la phase du plateau. Ce concept de Ct est à la base de la précision et de la reproductibilité de la technique.

Si l'on suit la fluorescence au cours du temps d'une PCR en temps réel, on observe une augmentation de cette fluorescence et donc du nombre de fragments PCR en 3 phases distinctes :

- Phase de bruit de fond : La quantité de fragment amplifié est insuffisante pour générer un signal fluorescent supérieur au bruit de fond (et donc la fluorescence générée).
- Phase exponentielle : La quantité de fragment amplifié génère un signal fluorescent supérieur au seuil de détection de l'appareil, puis le nombre de produits amplifié double à chaque cycle. En coordonnées logarithmiques, cette phase est représentée par une droite.
- Phase de plateau (ou de saturation) : certains composants de la réaction (et en particulier le nombre de molécules de Taq disponibles) deviennent limitants. Le système ne permet plus une amplification exponentielle.



Droite standard

La droite standard va représenter les valeurs de C_t obtenues expérimentalement en fonction du log des concentrations en molécules cibles fixées, issues de séries de dilutions d'un échantillon standard. La valeur de C_t est inversement proportionnelle au log base 10 de la concentration initiale en molécules cibles.

Le C_t obtenu à partir d'un échantillon de concentration inconnue va ainsi être traduit en concentration en molécules cibles grâce à la droite standard.

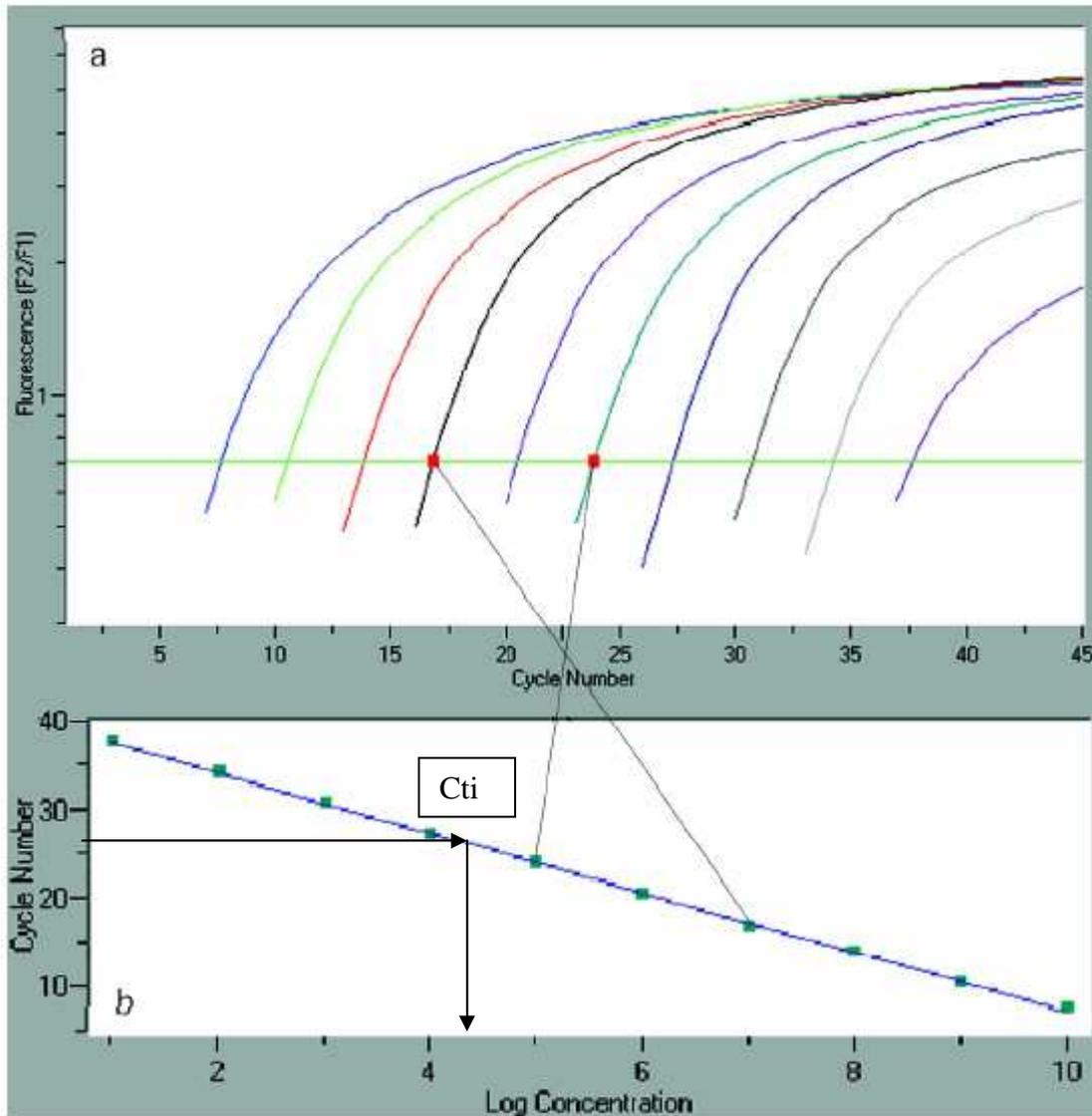


Fig. a :

Un échantillon standard a été dilué en série. Les C_t obtenus (points rouges) sont reportés en fonction des log des concentrations relatives du standard : on établit ainsi une droite standard (points verts de la fig. b). Le C_t obtenu à partir d'un échantillon inconnu (C_{ti}) permettra, lorsqu'il sera reporté sur le droite, d'obtenir le log de la concentration en molécules cibles de cet échantillon.

Principes mathématiques

Soit :

K : le nombre de produits PCR présents au Cp (ou Ct),

T0 : le nombre de molécules cibles présentes à l'origine

Eff : efficacité de la PCR

Cp (= Ct) : Crossing point

L'équation décrivant la PCR s'écrit alors :

$$K = T_0 (1+Eff)^{C_p}$$

Pour simplifier, 1+Eff est représenté par E : $K = T_0 (E)^{C_p}$

Cette équation peut se linéariser en :

$$\log K = \log T_0 + C_p \log (E)$$

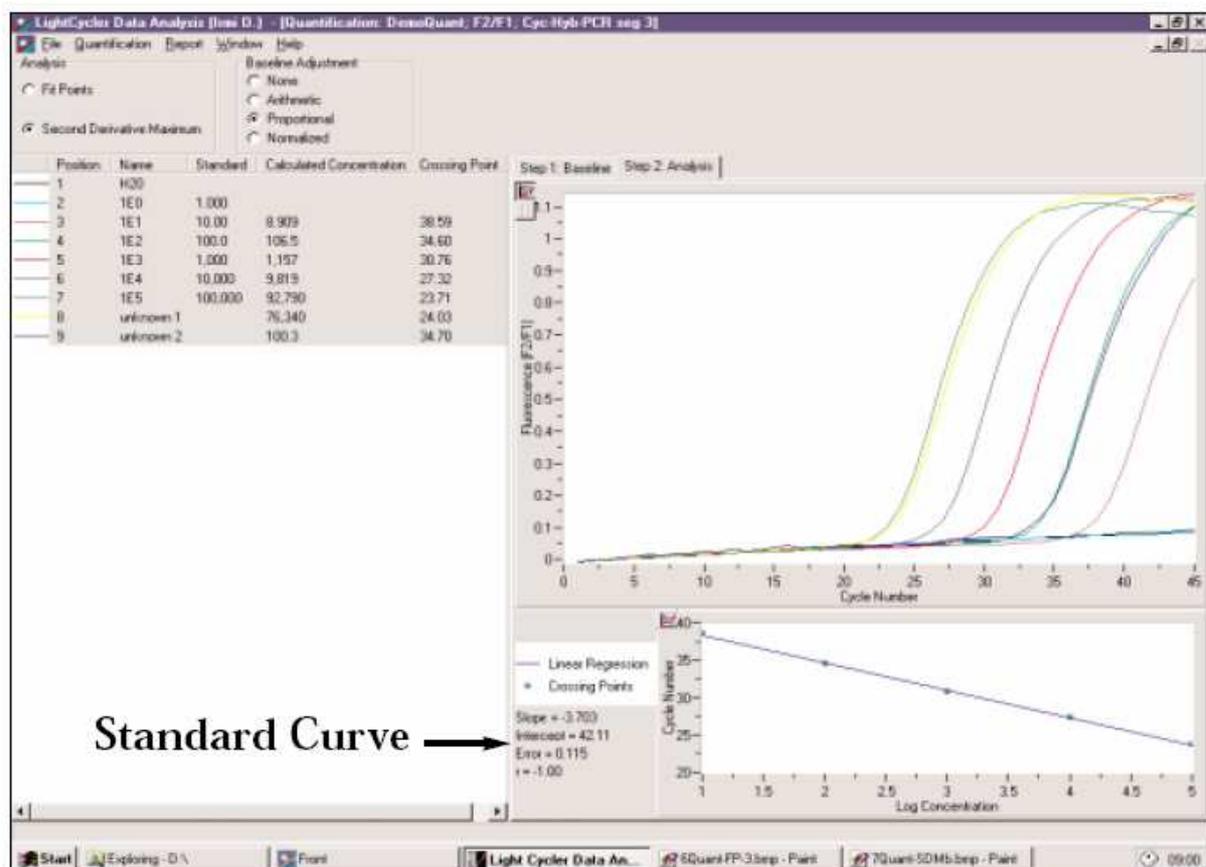
Les concentrations initiales des échantillons standards (T0) sont connues par

l'expérimentateur et le Cp est obtenu par la mesure. Ainsi en réarrangeant l'équation sous la forme $y = ax+b$, on obtient :

$$C_p = -(1/\log E) \log T_0 + (\log K/\log E)$$

On obtient l'équation de la courbe standard (y représenté par Cp et x par $\log T_0$).

La pente de la droite est $-(1/\log E)$ et l'ordonnée à l'origine est $(\log K/\log E)$.



Une fois la courbe standard établie, les Ct des échantillons inconnus sont convertis en concentrations en utilisant l'équation dérivée des échantillons standards. Les efficacités PCR des échantillons standards et des échantillons inconnus doivent être les mêmes.

Dans l'exemple ci dessus, on a établi une droite standard du gène de la Bêta globine : des échantillons « standards » (de concentrations connues, allant de 1 à 100 000 copies du gène) ont permis (par l'obtention de leur Ct respectif) de tracer cette droite.

Les caractéristiques de cette droite sont les suivantes :

- **sa pente** : représentée par $-(1/\log E)$.

La conversion « pente de courbe standard / efficacité PCR » est donnée par la relation : pente = $(1/\log E)$.

Ainsi : une pente de 3.32 représente une efficacité de 100% ($E = 2$) ($1+Eff$).

Une pente de 3.4 représente une efficacité de 97% ($E = 1.9$)

Une pente de 3.5 représente une efficacité de 93% ($E = 1.9$)

Une pente de 3.6 représente une efficacité de 90% ($E = 1.9$)

Une pente de 3.7 représente une efficacité de 86% ($E = 1.9$)

Une pente de 3.92 représente une efficacité de 80% ($E = 1.8$)

Vous avez la pente, vous voulez l'efficacité : utilisez la formule

$$E = 10^{-1/\text{pente}}$$

Dans l'exemple ci dessus, la pente de -3.7 correspond donc à une efficacité PCR de : $10^{-1/-3.7} = 1.86$ c'est à dire 86% d'efficacité PCR.

- **son ordonné a l'origine** (intercept): il correspond a la valeur de Cp obtenue en partant d'une copie cible à l'origine. Il correspond théoriquement au temps mis par la PCR pour obtenir une quantité de fluorescence supérieure à la valeur seuil (autour de 10^{10} copies) : pour une PCR présentant une efficacité PCR de 86%, en partant d'une copie cible à l'origine, il faudra entre 37 et 38 cycles ($1.86^{38} = 1.7 \times 10^{10}$). Cela suppose que le Ct soit positionné au tout début de la phase exponentielle.

- **le taux d'erreur (Error)** : il correspond a l'écart entre les points expérimentaux et la droite de régression obtenue. C'est la somme des carrés des écarts à la moyenne.

On s'accorde un taux d'erreur de 0.2 (20%) sur une gamme dynamique de 4-5 logs.

Ici le taux d'erreur est de 11.5% sur une échelle dynamique de 4 logs (compris entre les Cp 23 à 38).

- **le coefficient de corrélation r** : il indique l'intensité de la liaison entre Cp et log base 10 des concentrations initiales en molécules cibles. Plus la valeur de r est proche de 1 ou -1 et plus l'intensité de la liaison est forte.

Chimie – courbe de fusion

Voir <http://www.gene-quantification.info/> voir fluorescence chemistry

Voir également à la même adresse : eurogentech-RT-PCR-booklet.pdf

On considère globalement 2 types de formats de fluorescence :

- Le premier utilise les propriétés d'un fluorophore spécifique du DNA, le SyBr Green I. Ce fluorophore s'incorpore dans le petit sillon de la double hélice d'ADN et fluoresce. A l'état libre, il ne fluoresce quasiment pas. Lorsque l'on suit ce type de chimie en PCR temps réel, on observe une augmentation du signal au cours de l'étape d'élongation et une chute de ce même signal au moment de la dénaturation. Avec ce type de chimie, on mesure donc l'augmentation de fluorescence à la fin de chaque étape d'élongation de chaque cycle. La spécificité de cette chimie dépend complètement de la spécificité des amorces utilisées. La vérification de cette spécificité est réalisée à la fin de l'étape d'amplification grâce à la courbe de fusion : on observe la diminution de la fluorescence en fonction de l'augmentation de la température. Un pic de fusion d'un produit PCR va se distinguer facilement des pics de fusion de produits non spécifiques qui vont fondre à des températures plus faibles en présentant des pics généralement plus larges.

- Le second type de format utilise une sonde interne fluorescente spécifique du produit amplifié. On augmente la spécificité de la détection de façon importante. Trois types de formats de sondes sont possibles :

- Les sondes d'hybridation : On ne trouve ce type de sondes qu'en utilisant le Light Cycler de Roche. Cette méthode utilise deux sondes d'hybridation pour augmenter la spécificité. Une des sondes porte à son extrémité 3' une fluorescéine qui émet une lumière verte lorsqu'elle est excitée par l'appareil. Son spectre d'émission recouvre le spectre d'excitation d'un fluorophore accepteur situé à l'extrémité 5' de la seconde sonde. Celle-ci est bloquée en 3' pour éviter toute extension à partir de son extrémité. L'excitation du fluo donneur (la fluorescéine) est transmise par FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfert) au fluo accepteur qui émet une lumière rouge (Red 640 et 705 de Roche). En solution ces 2 fluo doivent être très proches pour permettre un transfert optimal. Après l'étape de dénaturation, les deux sondes vont s'hybrider « tête-bêche » sur leur séquence cible au cours de l'étape d'hybridation. Les deux fluo sont ainsi très proches et vont permettre au FRET d'avoir lieu. Les sondes d'hybridation présentent des spécificités élevées. Puisqu'elles ne sont pas hydrolysées durant la PCR, la fluorescence est réversible et va permettre de générer des courbes de fusion (utilisées pour le génotypage).

Voir : <http://dorakmt.tripod.com/genetivs/realtime.html>

- Les sondes d'hydrolyse ou sondes Taqman (Perkin-Elmer-Applied Biosystems) utilisent l'activité 5' exonucléasique de la Taq polymérase pour hydrolyser une sonde fluorescente fixée sur sa cible. Cette cible se situe à l'intérieur d'un produit PCR amplifié par deux amorces. Elle s'hybride durant la phase d'hybridation – allongement de la PCR. Cette sonde contient un fluo rapporteur à son extrémité 5' dont l'émission est quenchée par un second fluorophore situé à l'extrémité 3'. L'activité exonucléasique de la taq est double-brin spécifique. Elle ne va pas hydrolyser les sondes non fixées. Si l'amplicon est correctement amplifié par les 2 amorces PCR, la sonde Taqman va s'hybrider sur sa cible après l'étape de dénaturation. Lorsque le taq atteint la sonde hybridée, son activité exonucléasique va déplacer

La sonde et la dégrader. Cette étape entraîne la séparation du fluo rapporteur du fluo quencher et donc une augmentation de la fluorescence du rapporteur. Le système Taqman utilise une étape combinée d'hybridation et de polymérisation à 60-62°C. La plupart des sondes ont un Tm autour de 70°C.

- Les « Molecular beacons » (Stratagene) sont des sondes d'hybridation formant une structure en épingle à cheveux. La boucle de la sonde est complémentaire de la séquence ciblée et l'épingle est constituée par l'hybridation de deux séquences complémentaires situées aux extrémités 5' et 3' de la sonde. Un fluo rapporteur est fixé à une extrémité et un fluo quencher est fixé à l'autre extrémité. Le quencher dissipe l'énergie qu'il reçoit du rapporteur en chaleur. En solution, le Beacon présente une structure en épingle à cheveux : l'épingle rapproche les 2 bras de la sonde permettant le quenching du rapporteur. Lorsque le Beacon s'hybride sur sa séquence cible, il présente une conformation séparant le rapporteur du quencher : on observe alors une émission de fluorescence.

Instrumentation

Voir <http://www.gene-quantification.info/> voir kinetic PCR platforms

Il existe plusieurs appareils commerciaux permettant de réaliser des expériences de PCR quantitative en temps réel. Tous ces systèmes ont en commun d'être clos et donc de ne pas nécessiter de manipulations post amplification. Cela permet d'éviter tout problème de contaminations PCR.

D'un point de vue technique, on considère 2 types d'instruments :

Le Light Cycler de Roche utilise un système basé sur des échanges d'air et des réactions dans des capillaires en verre. Les échanges thermiques instantanés permettent une mesure directe de la fluorescence, en temps réel. C'est l'appareil utilisé par l'institut et sa description est détaillée plus loin dans la seconde partie.

Les appareils (ABI Prism 7700, 7900, 7300 7500) d'Applied Biosystems sont des appareils PCR classiques basés sur des échanges thermiques par effet Peltier entre un bloc 96 puits (ou 384) et des tubes réactionnels en plastique (microplaque ou tube à 0,2 ml). Les sources de lumière excitatrices sont des lampes halogènes au tungstène (7700) ou des lasers argon-ion (7900). La fluorescence est filtrée par une roue à filtre véhiculée jusqu'à une caméra CCD. Les chimies utilisées sur ces appareils sont le SyBr green I et les sondes Taqman.

Biorad commercialise également des appareils de PCR quantitative en temps réel : ce sont les modèles iCycler et MyiQ, basés sur des échanges thermiques par effet Peltier entre un bloc de 96 puits et des tubes réactionnels en plastique. Pour le second modèle, on enregistre uniquement la fluorescence du SyBr Green et de la fluorescéine.

Stratagene propose également une solution (système MX3000P, 3005 et 4000). Corbett Research propose le Rotorgene 3000. Cepheid propose le SmartCycler II et TD. MJ Research propose le Chromo4 et l'Opticon. Techne propose le Quantica.

Pour une comparaison des appareils allez à :

<http://www.biocompare.com/matrix.asp?catid=2838>

Bibliographie :

A voir absolument : un site complet dédié a la PCRq :

<http://www.gene-quantification.info/>

A partir de ce site, vous pouvez accéder a tout type d'information concernant la PCRq.