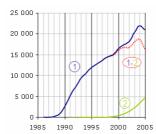
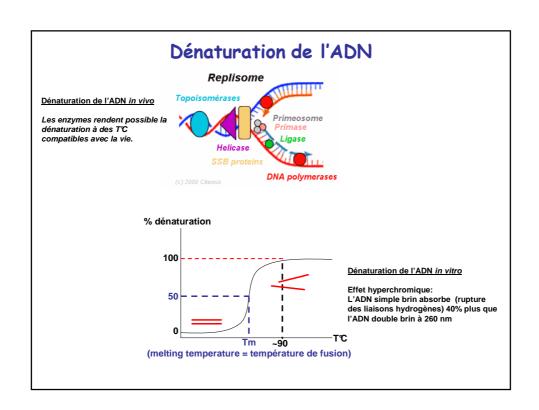
Historique

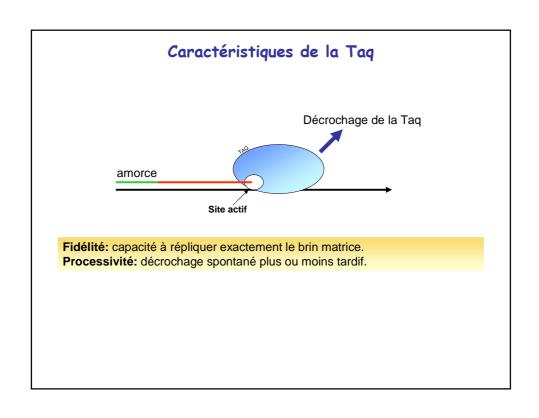
Principe décrit dés 1971 <u>H. Gobind Khorana</u> (indien nationalisé US) and Kjell Kleppe (norvegien).
Réalisation 1985 (**Kary B. Mullis**, prix nobel de chimie 1993):
Cycles de polymérisation mais l'ADN pol (fragment Klenow) se dégrade.
1986 utilisation de la Taq (ADN pol de *thérmophilus aquaphilus*. Evite d'utiliser beaucoup de Klenow, évite d'ouvrir les tubes et de contaminer le milieu réactionnel)

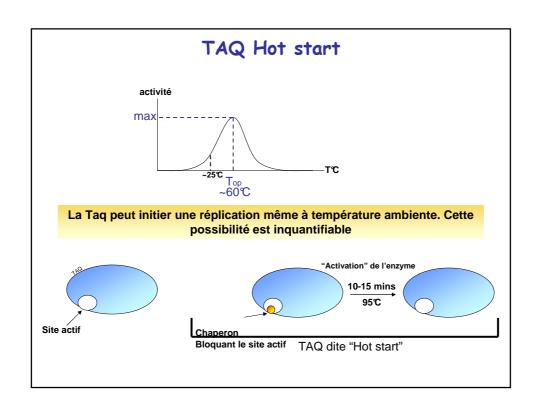
La PCR prend de l'essor



Citation des termes polymeriation chain reaction (bleu) et PCR real time (en vert) dans pub med







La PCR : amplifier et produire en grande quantité (1)

PCR (réaction de polymérisation en chaine) permet l'amplification exponentielle d'un fragment d'ADN de taille fixe (amplicon) à partir d'une matrice ADN.

Méthode très sensible: l'amplification est exponentielle.

On peut détecter la présence de très petite quantité d'ADN (ou ADNc)

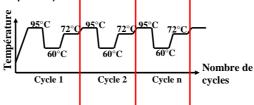
L'amplification de fragments spécifiques nécessite de connaître au moins partiellement la séquence à amplifier afin de pouvoir déterminer une paire d'oligonucléotides qui serviront d'amorces pour la polymérase.

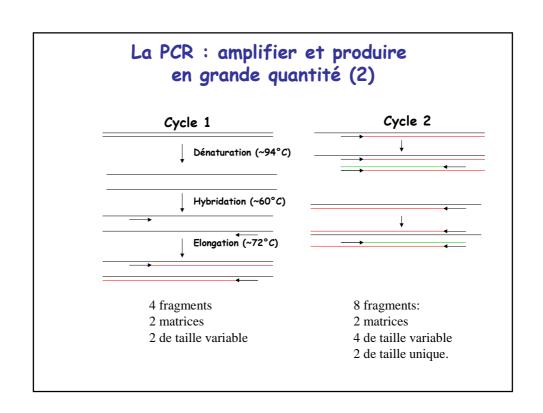
Il s'agit de réplication $\it in \ vitro \ qui \ nécessite de se placer à des températures allant de ~60°C à ~90°C.$

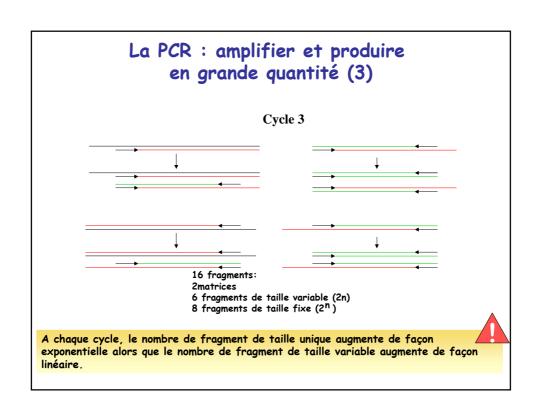
Une ADN polymérase classique se dégrade.

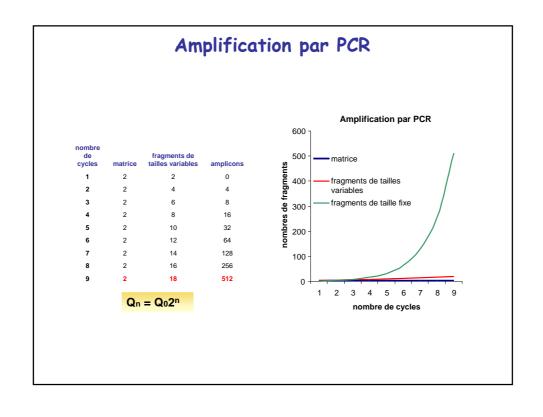
On utilise une polymérase thermostable: Taq polymérase (initialement extraite de

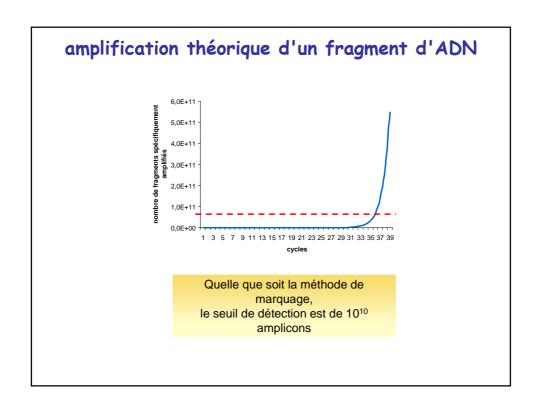
Thermophilus aquaticus).

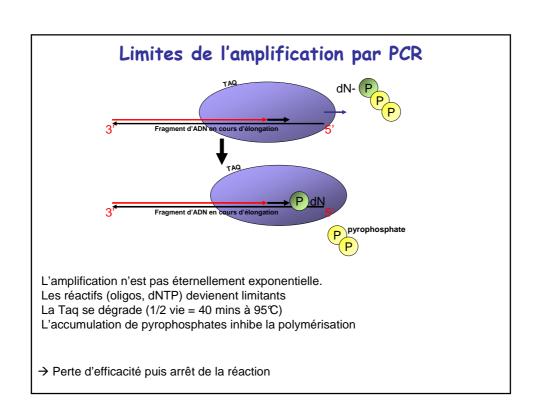


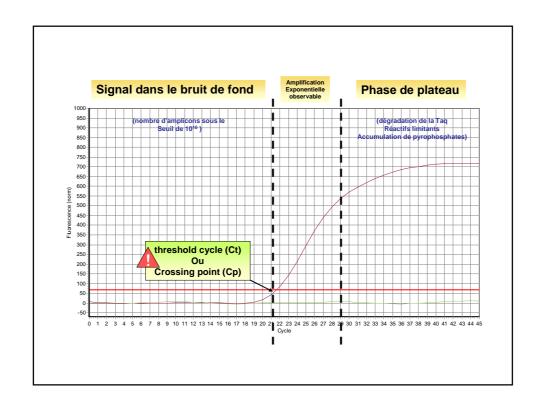


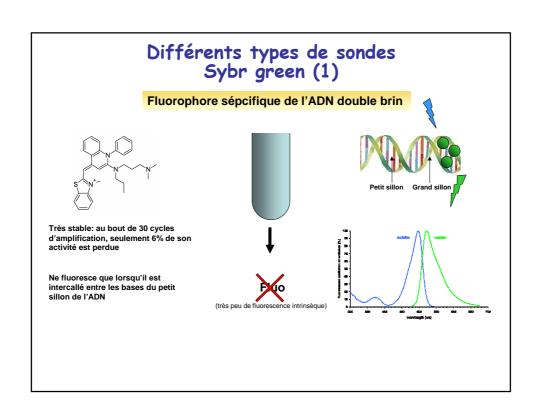


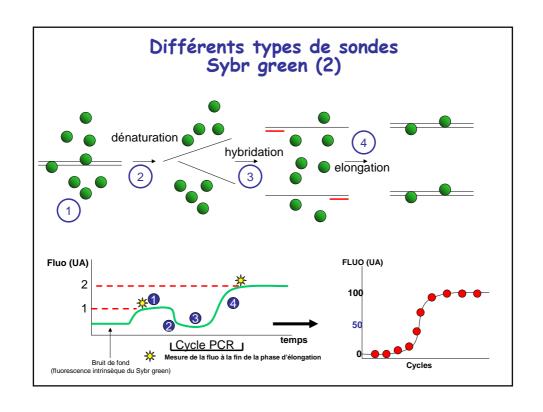


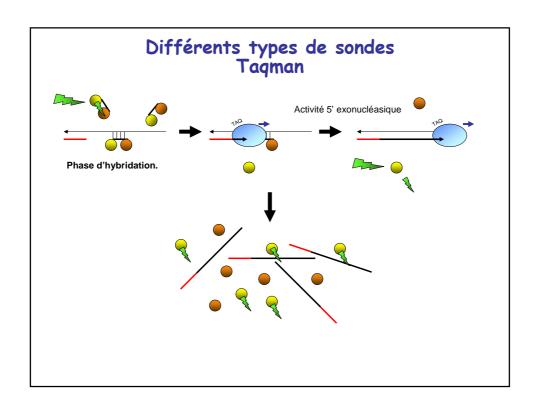


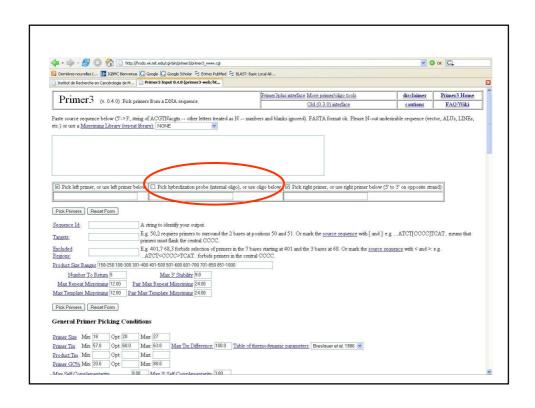


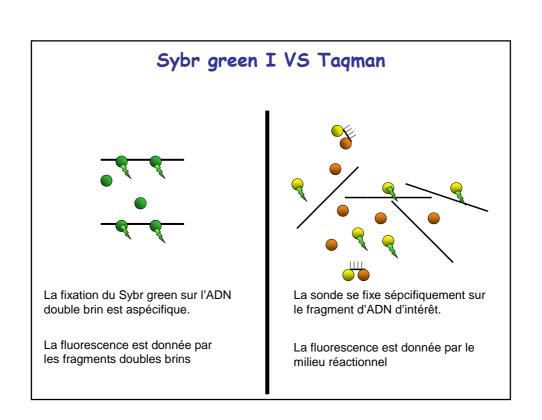


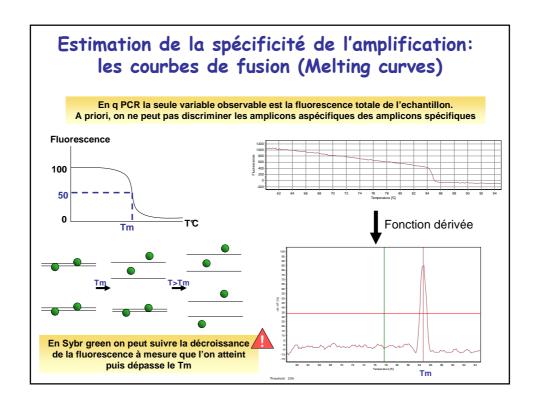


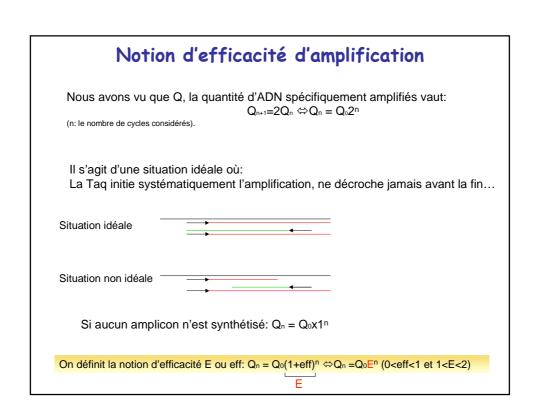


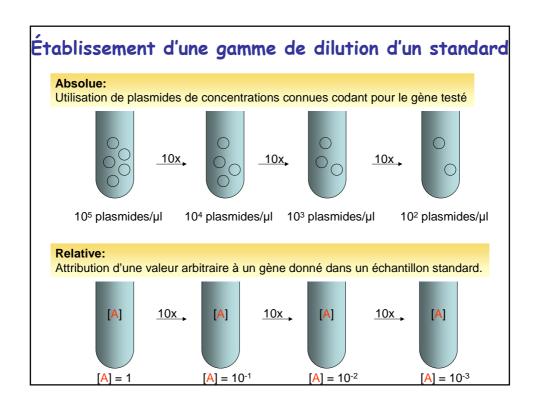


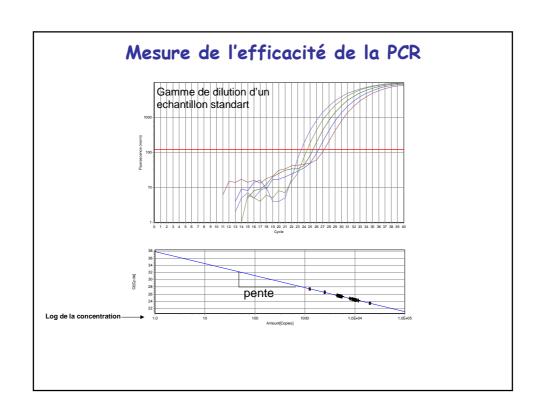


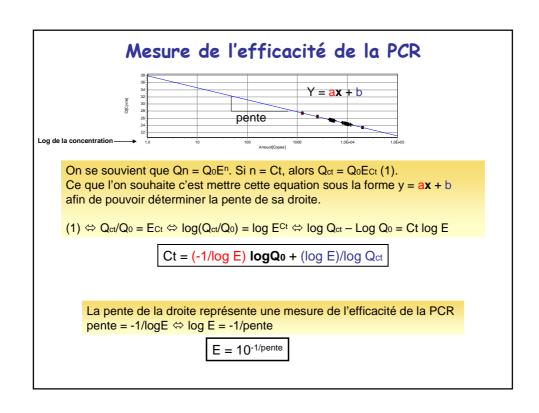


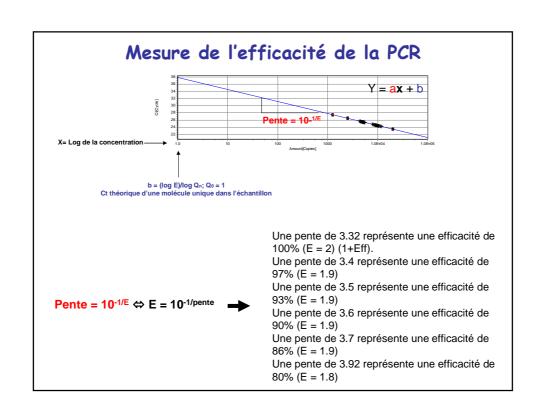


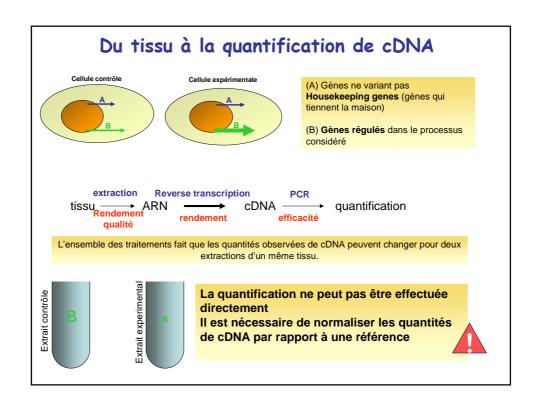










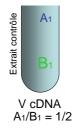


Notion de normalisation

Housekeeping genes: gènes du métabolisme basal de la cellule Lamines; protéines de la glycolyse (GAPDH); cytosquelette (actine); traduction (protéine ribosomique 18S)

A priori leur expression ne devrait pas être modifiée quelque soit les conditions.

Possibilité de quantification relative.

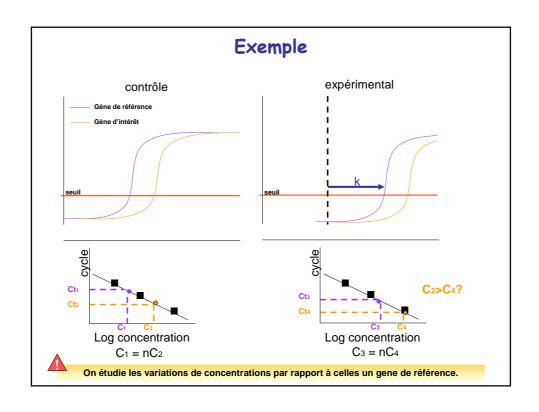




\forall Les conditions, A1 = A2

Comme, $A_1 = B_1/2$ et $A_2 = 2B_2$ Alors $B_1/2 = 2B_2 \Leftrightarrow B_2/2 = 2B_1$ Conclusion: $B_1 = 4B_2$

La normalisation des résultats grâce aux housekeeping genes permet d'établir des variations de quantité relative des gènes d'intérêt.



Procédure: Variante de la méthode des droites standards

Nécessité: établir une droite standard comprenant au moins 4 points par gène.

Théorie:

Ct < 25 cycles: le gène est fortement exprimé pas de nécessité de répliquer les points. (PCR robuste)

25<Ct<40 cycles: on répète trois fois par expérience. (PCR moins robuste, lissage statistique des variations)

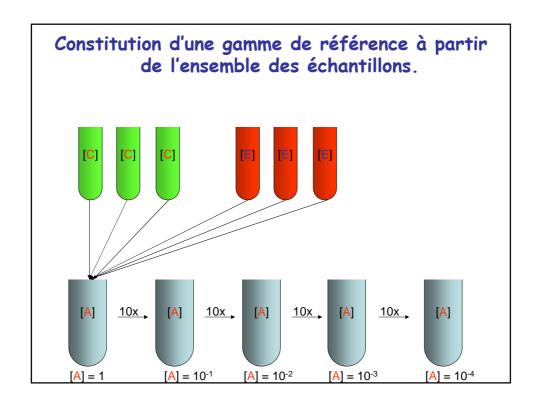
40<Ct cycles: la PCR n'est pas robuste (Taq dégradée, peu de matrice). Résultats difficilement quantifiables.

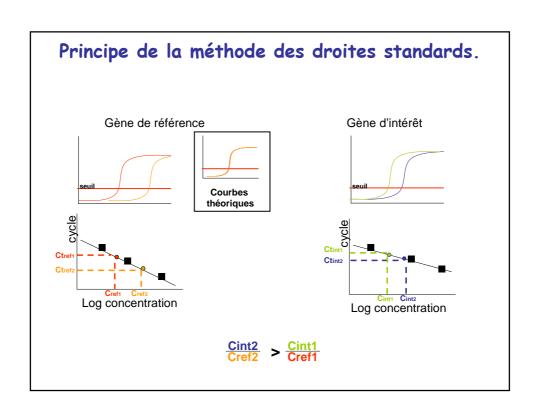
Pratique: On répète systématiquement trois fois chacun des points.

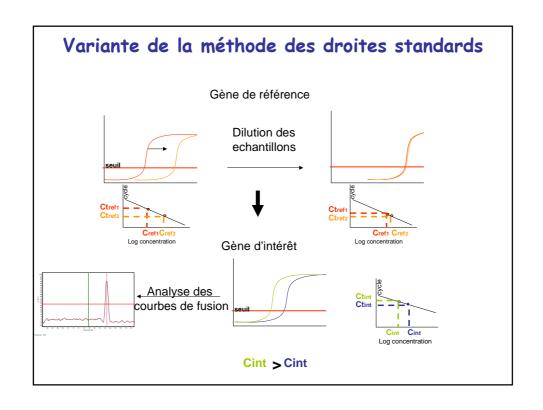
On utilise des temps d'amplification courts (on n'amplifie que de petits fragments, on s'affranchit des limites de la processivité de la Taq)

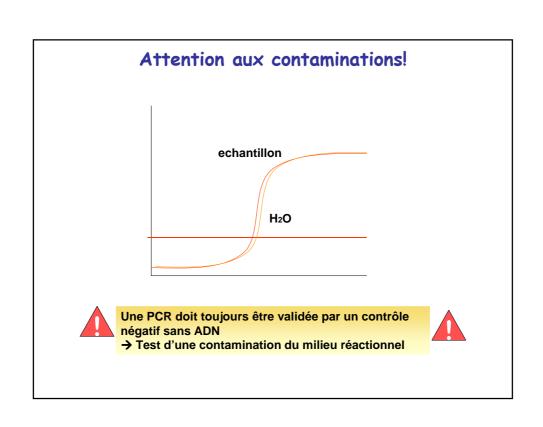
House keeping gene		Gene d'intérêt	
contrôle	expérimental	contrôle	expérimental
HKc	HKe	GIc	GIe

On compare HKc/Glc et HKe/Gle

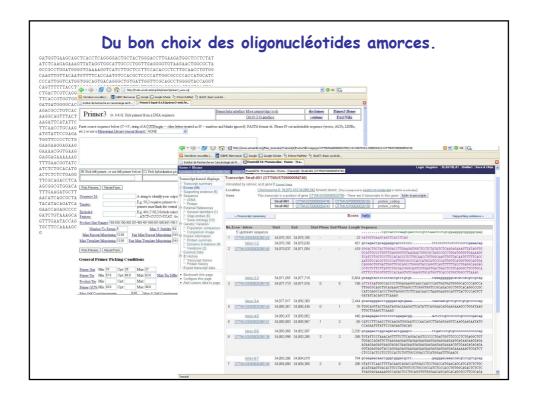








Prérequis pour l'exploitation des données d'une expérience de qPCR L'ensemble des échantillons contrôles et expérimentaux par gènes étudiés. Une gamme de dilution standard d'au moins 4 points par gène étudié. Evaluation des contaminations avec un témoin eau Tout élément est répété 3 fois sur la plaque.



Justification de la méthode ADN génomique exon1 Exon 2 cDNA Exon 2 Les amplicons sont de taille différentes selon que l'on amplifie de l'ADN génomique ou du cDNA: On utilise des temps courts d'amplification. Si l'amplicon génomique est trop grand il n'est pas amplifié. La différence de taille change le melting des deux amplicons. On peut voir la contamination.

