

La PCR en temps réel: principes et applications

Elyse Poitras et Alain Houde*

La technologie de PCR en temps réel devient de plus en plus populaire dans différents secteurs d'activité. Cette technologie est basée sur la détection et la quantification d'un reporter fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction de PCR. Étant donné qu'elle utilise généralement des systèmes en tubes fermés et que la quantification ne requiert aucune manipulation post-amplification, les problèmes de contamination post-PCR par les amplicons sont significativement réduits. Le processus complet est automatisé du début à la fin rendant cette technologie très performante pour des applications d'analyses à grande échelle. Cet article présente une description des principes à la base de la PCR en temps réel, des différentes technologies de détection des amplicons et des exemples d'applications courantes.

Historique

Russell Higuchi fut l'un des premiers à faire l'analyse des cinétiques de la PCR (polymerase Chain Reaction) en élaborant un système qui détectait le produit de la PCR au fur et à mesure qu'il s'accumulait. Ce système en « temps réel » utilisait le bromure d'éthidium comme agent intercalant dans chacune des réactions d'amplification et un thermocycleur modifié pour stimuler l'émission des échantillons par rayonnements UV. L'émission de la fluorescence était détectée à l'aide d'une caméra CCD (charge-coupled device). Une augmentation de l'émission de la fluorescence était observée lorsque le bromure d'éthidium se fixait à l'ADN double brin produit au cours de l'amplification. En traçant l'augmentation de l'émission de fluorescence en fonction du nombre de cycles, le système produit des courbes d'amplification exhibant un schéma plus complet du processus de la PCR que la simple détermination d'amplicons (produits d'amplification) accumulés en fin d'amplification (Higuchi et al, 1992).

Principe

Depuis son invention, la PCR est devenue la technique la plus utilisée pour la détection de l'ADN et de l'ARN. À partir d'une simple copie d'une séquence particulière d'acides nucléiques, cette séquence peut être spécifiquement amplifiée et détectée. Sa nature exponentielle rend cette technique attrayante pour des analyses quantitatives. Théoriquement, il existe une relation quantitative entre la quantité de la séquence cible

de départ et la quantité du produit amplifié à n'importe quel cycle. En pratique, il n'est pas rare que les réactions de PCR en replica donnent des taux différents d'amplicons. Le développement de la PCR quantitative en temps réel a éliminé les variabilités traditionnelles associées à la PCR quantitative et permet la quantification du produit de la PCR de façon fiable et routinière.

Au début de la réaction PCR, les réactifs sont en excès mais en concentration assez faible afin d'éviter que la renaturation des amplicons n'entre en compétition avec l'hybridation des amorces (primers). L'amplification est alors réalisée de façon constante à un taux exponentiel à l'aide d'une ADN polymérase thermostable. Après la phase exponentielle, la réaction d'amplification entre dans une phase linéaire où le taux d'amplification devient extrêmement variable, même au niveau de replica d'un même échantillon, à cause d'une compétition entre la renaturation des amplicons et l'hybridation des amorces. Suit ensuite une phase plateau où le taux d'amplification décroît à près de zéro générant très peu d'amplicons.

Afin de recueillir des données quantitatives avec précision, chacun des échantillons doit être analysé dans sa phase exponentielle d'amplification qui est la phase la plus reproductible de la réaction de PCR. La PCR en temps réel fait donc le suivi de la fluorescence émise pendant la réaction avec un indicateur de la production des amplicons durant chaque cycle, à l'opposé de la PCR quantitative conventionnelle où les amplicons ne sont détectés qu'à la toute fin du processus.

La technologie de la PCR en temps réel est basée sur la détection et la quantification d'un «reporter» fluorescent. L'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés durant la réaction de PCR. En observant la quantité de fluorescence émise à chaque cycle, il devient possible de suivre la réaction PCR durant sa phase exponentielle où la première augmentation significative dans la quantité d'amplicons est en corrélation directe avec la quantité initiale de la matrice originale cible (template). Plusieurs instruments de PCR en temps réel sont présentement sur le marché. Ces appareils utilisent généralement un système en tubes fermés et la quantification ne requiert aucune manipulation post-amplification, ce qui minimise ou élimine les problèmes de contamination par les amplicons suite à la réaction de PCR et réduit le temps d'analyse (Bustin, 2000). Le processus complet est donc automatisé du début à la fin rendant ainsi cette technologie intéressante pour des applications d'analyses à grande échelle (high-throughput) (Martell et al, 1999).

Technologies de détection

Tous les systèmes de PCR en temps réel reposent donc sur la détection et la quantification d'un émetteur fluorescent pendant le processus d'amplification et l'augmentation du signal d'émission fluorescente est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits durant la réaction. Il existe deux principes généraux pour la détection quantitative des amplicons : les agents se liant à l'ADN double brin (ex. SYBR Green I) et les sondes fluorescentes. Pour cette dernière catégorie, il existe présentement quatre technologies principales : hydrolyse de sondes (Taqman assay), hybridation de 2 sondes (HybProbes), balises moléculaires (Molecular Beacons) et amorces scorpion (Scorpion primers). Selon Wittwer et al. (1997), ces différentes technologies de détection auraient une sensibilité équivalente. Cependant, ces technologies présentent des différences au niveau de la spécificité (Bustin, 2000).

1) Agents se liant à l'ADN double brin (Double-stranded DNA binding dyes: Lightcycler assay)

Les molécules qui se lient à l'ADN double brin peuvent être divisées en deux classes: les agents intercalants comme le bromure d'éthidium (Higuchi et al, 1992), le YO-PRO-1 (Ishiguro et al, 1995; Tseng et al, 1997), le SYBR Green I (Morrison et al, 1998) et les agents se fixant au sillon mineur (minor groove binders) comme le Hoeschst 33258 (Searle et Embrey, 1990; Nielsen, 1991). Leur émission fluorescente augmente lorsque qu'ils sont liés à l'ADN double brin. Pour être utilisés dans une réaction de PCR en temps réel, ces agents doivent rencontrer deux exigences : augmenter en fluorescence lorsque lié à l'ADN double brin et ne pas inhiber la réaction de PCR. Le SYBR Green I, dont le mécanisme de liaison n'est pas bien défini, est l'agent le plus fréquemment utilisé. Ses avantages sont

qu'il est économique, facile à utiliser et possède plus de sensibilité que le bromure d'éthidium sans inhiber la réaction d'amplification.

Lors de la réaction d'amplification par PCR, le colorant libre en solution exhibe peu de fluorescence. Durant l'étape d'élongation, une augmentation de la fluorescence est associée à la quantité de colorant se fixant à l'ADN double brin naissant. Lorsque suivi en temps réel, l'augmentation du signal de fluorescence est observée pendant l'étape de polymérisation et l'émission fluorescente décroît complètement lorsque l'ADN est dénaturé à l'étape suivante. Conséquemment, l'émission de fluorescence est mesurée à la fin de chaque étape d'élongation pour chacun des cycles par un système de lecture intégré à l'appareil de PCR en temps réel qui permet de suivre l'augmentation de la quantité d'ADN amplifié durant la réaction (Bustin, 2000) (figure 1).

La technologie basée sur le SYBR Green I ne nécessite aucune sonde fluorescente mais sa spécificité repose entièrement sur ses amorces (Bustin, 2000). Elle ne requiert donc aucune expertise particulière pour le design des sondes fluorescentes et n'est pas affectée par des mutations dans l'ADN cible qui influencent l'hybridation des sondes spécifiques (Mackay et al, 2002). Étant donné que le SYBR Green I se fixe à n'importe quelle molécule d'ADN double brin, cette technologie présente une certaine versatilité puisque le même agent peut être utilisé pour détecter plus d'un produit d'amplification dans la même séquence réactionnelle.

Cette technologie présente aussi certains désavantages: 1) étant donné que l'ADN double brin total émet des signaux, il devient impossible en cours de réaction de s'assurer de la spécificité des amplicons ou de discriminer les différents amplicons dans le cas de multiplexage; 2) le mauvais appariement (mis-priming), générant souvent des bandes d'ADN superflues observables sur gel d'électrophorèse, peut conduire à des faux positifs ou une surestimation de la quantification; 3) l'émission de fluorescence peut être biaisée par la masse moléculaire de l'ADN amplifié par un amplicon plus long qui fixera davantage de molécules fluorescentes par rapport à un amplicon plus court dans la même réaction (Bustin, 2000).

2) Hydrolyse de sondes (Hydrolysis probes: Taqman assay)

La technologie *Taqman* est basée sur l'activité 5'-exonucléasique de la Taq polymérase pour hydrolyser une sonde hybridée à sa séquence cible sur l'amplicon durant l'étape d'hybridation/extension de la PCR. Un fluorochrome émetteur (reporter) (ex. FAM : 6-carboxy-fluorocein) est fixé à l'extrémité 5' de la sonde d'hybridation et son émission est inhibée par un second fluorochrome suppresseur (quencher) présent à l'extrémité 3' (ex. TAMRA : 6-carboxy-tetramethyl-rhodamine). Lorsque stimulé, le fluorochrome émetteur transfère son énergie au fluorochrome suppresseur voisin par le principe

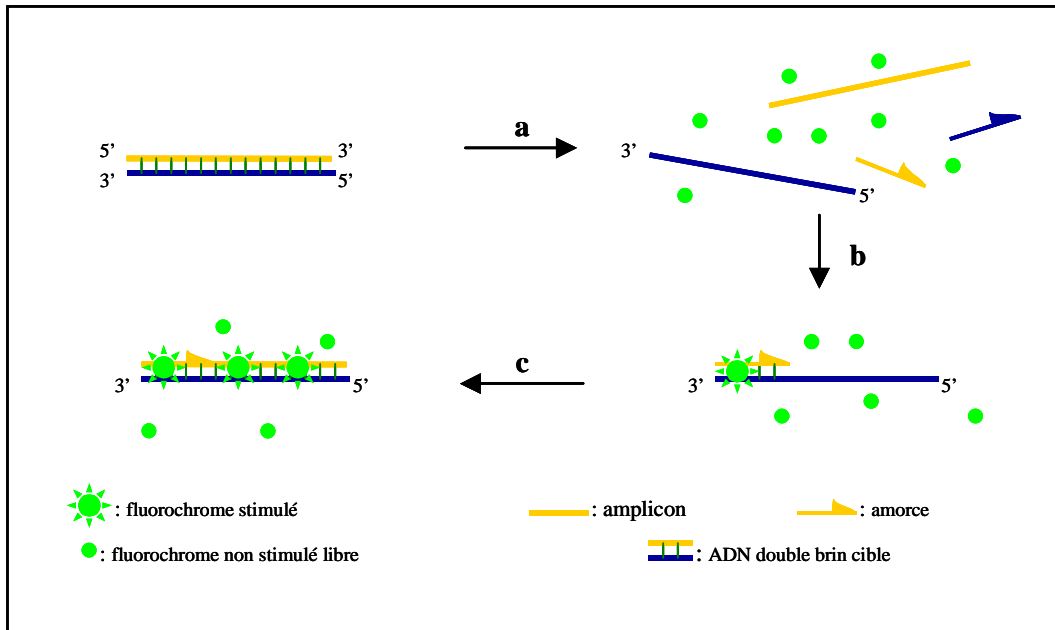


Figure 1 : *Agents se liant à l'ADN double brin (Double-stranded DNA binding dyes: Lightcycler assay)*. (a) Durant la dénaturation, le SYBR Green I libre exhibe peu de fluorescence. (b) À la température d'appariement, quelques molécules se lient au double brin d'ADN naissant résultant en une émission de fluorescence lors de l'excitation. (c) Durant la phase de polymérisation, de plus en plus de molécules se lient au brin naissant et l'accroissement de la fluorescence peut-être suivi en temps réel.

FRET (fluorescence resonance energy transfer) qui dissipe cette énergie sous forme de chaleur plutôt que d'émettre de la fluorescence (Mackay et al, 2002). Étant donné que l'activité 5'-exonucléasique de la Taq polymérase est spécifique à l'ADN double brin, les sondes libres en solution demeurent intactes et aucune fluorescence n'est émise. Lors de l'étape d'hybridation, la sonde et les amorces se fixent à leurs séquences complémentaires respectives. À l'étape suivante, la Taq polymérase débute l'élongation du nouveau brin d'ADN à partir de l'amorce jusqu'à ce qu'elle rencontre sur son passage la sonde hybridée qu'elle déplace et hydrolyse avec son activité 5'-exonucléasique. Le reporter est alors libéré de l'environnement du suppresseur permettant ainsi l'émission de fluorescence qui augmente à chaque cycle proportionnellement au taux d'hydrolyse de la sonde (figure 2A).

Comme la Taq polymérase hydrolysera la sonde seulement lorsque celle-ci est hybridée à sa séquence complémentaire, les conditions de température de l'étape de polymérisation doivent être ajustées de façon à permettre à la sonde de rester hybridée durant cette étape. La majorité des sondes ont une température de dissociation (T_m) autour de 70°C ou de 5 à 10°C plus élevée que les amorces. Par conséquent, la technologie *Taqman* utilise une étape combinée d'hybridation et de polymérisation à 60-62°C assurant l'hybridation et la stabilité de la sonde durant l'extension. Ceci permet aussi une activité 5'-exonucléasique maximale de la Taq polymérase mais, l'efficacité de l'activité de

polymérisation de l'enzyme sera légèrement réduite à cette température suboptimale. Pour de longs amplicons, une étape d'hybridation/polymérisation plus longue ou encore une augmentation de la concentration en Mn^{2+} ou Mg^{2+} pourrait s'avérer nécessaire pour stabiliser l'hybridation de la sonde à sa séquence cible.

Les principes à respecter dans le design des sondes *Taqman* sont aussi applicables aux autres sondes linéaires et comprennent comme règles générales : 1) une longueur de 20-40 nucléotides, 2) un contenu en G-C variant de 40-60%, 3) aucun patron de séquence répétée, 4) aucune séquence permettant une hybridation ou un chevauchement avec les amorces, 5) un A, un C ou un T à l'extrémité 5' parce qu'un G supprime la fluorescence de l'émetteur même après clivage et, 6) un T_m de 5 à 10°C plus élevé que les amorces afin de s'assurer qu'elles s'hybrident avant les amorces et qu'elles demeureront hybridées pendant l'étape combinée d'hybridation et de polymérisation (Bustin, 2000; Mackay et al, 2002).

Les sondes fluorescentes possèdent comme avantage par rapport aux agents se liant à l'ADN une spécificité accrue et une meilleure capacité de multiplexage. La spécificité d'hybridation entre la sonde fluorescente et sa séquence d'ADN cible réduit significativement l'émission de fluorescence non spécifique due à des mauvais appariements ou des dimères d'amorces (primer-dimers). Des réactions multiplexes peuvent être élaborées en utilisant des fluorochromes émetteurs distincts liés à des sondes différentes dans une même réaction de PCR.

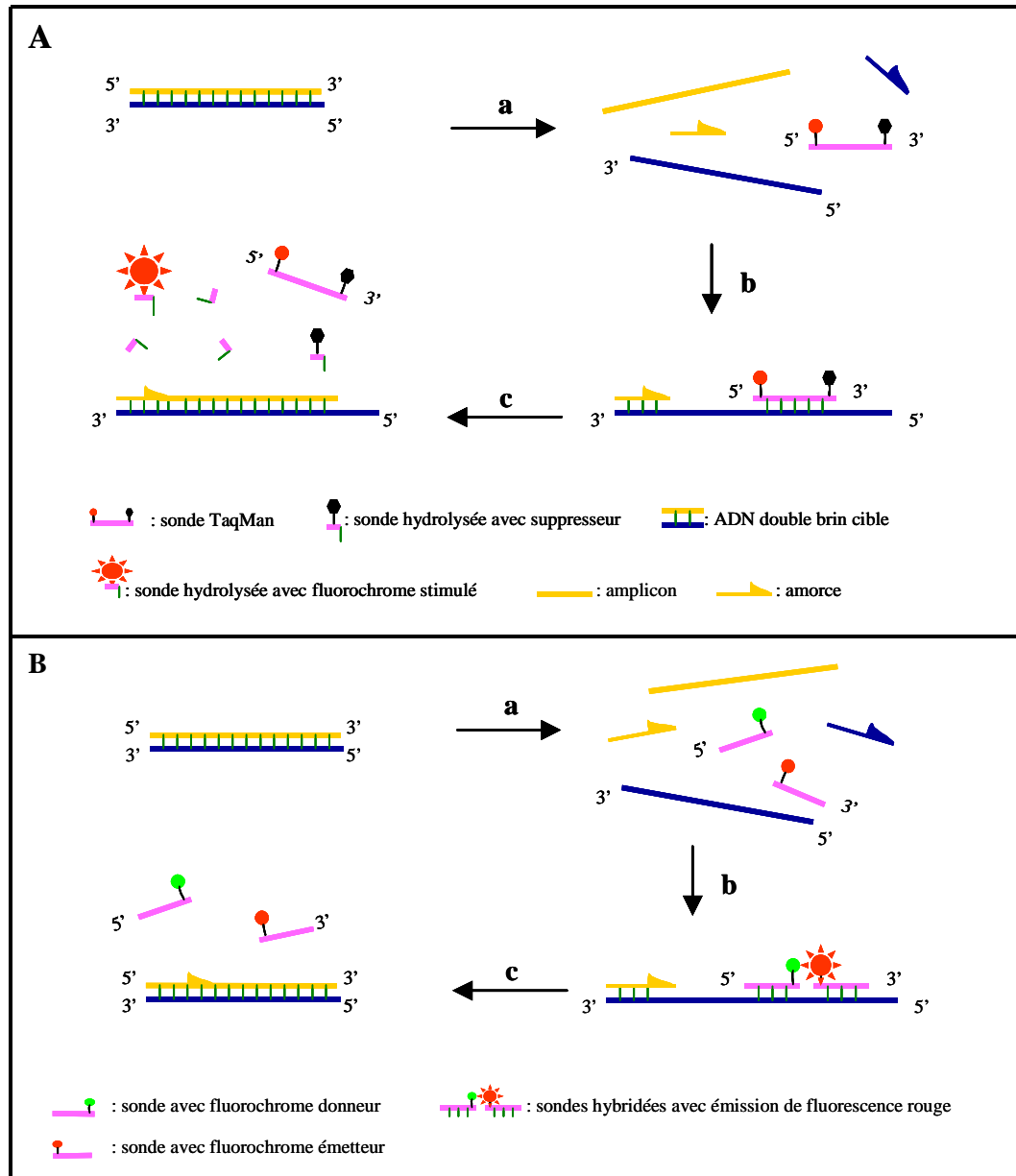


Figure 2 : **A: Hydrolyse de sondes (Hydrolysis probes: Taqman assay)** (a) Durant l'étape de dénaturation, la sonde est libre en solution. (b) À la température d'appariement, la sonde et les amorces s'hybrident à leurs séquences cibles respectives et la proximité des fluorochromes permet l'inhibition de la fluorescence. La polymérisation débute. (c) La polymérase déplace et hydrolyse la sonde. Le fluorochrome émetteur est libéré de l'environnement du suppresseur permettant ainsi l'émission de la fluorescence. **B: Hybridation de 2 sondes (Hybridization probes)** (a) Durant l'étape de dénaturation, les deux sondes demeurent séparées et en solution. (b) À la température d'appariement, les sondes s'hybrident à leurs séquences cibles respectives et la proximité des fluorochromes permet l'émission de fluorescence rouge par le principe FRET. (c) Les sondes retournent libres en solution.

La technologie *Taqman* est toutefois moins efficace et moins flexible que d'autres technologies en temps réel pour la détection de mutations spécifiques (Bustin, 2000; Mackay et al, 2002).

3) Hybridation de 2 sondes (Hybridization probes)

Cette technologie est aussi connue sous le nom de

HybProbes et repose sur l'utilisation de deux sondes linéaires complémentaires à une séquence cible pour maximiser la spécificité du signal (Wittwer et al, 1997). Une première sonde, bloquée à son extrémité 3' afin de prévenir son extension durant l'étape d'élongation, transporte en 3' un fluorochrome donneur (FITC) qui produit une lumière fluorescente verte lorsque excité

par une source de lumière. Son spectre d'émission est plus large que celui du fluorochrome accepteur (Red 640 ou Red 705) attaché à l'extrémité 5' d'une seconde sonde. En solution, les deux sondes sont libres et séparées. Étant donné que le transfert d'énergie par le principe FRET dépend de la distance entre les deux fluorochromes, il en résulte alors seulement un bruit de fond de fluorescence verte émis par le fluorochrome donneur. Pendant l'étape d'hybridation, les deux sondes se fixent à leurs séquences cibles respectives localisées à moins de 10 nucléotides (Mackay et al, 2002) dans un arrangement en tête-à-queue. La proximité des deux fluorochromes permet le transfert énergétique de la fluorescéine verte par le principe FRET au fluorochrome accepteur rouge et provoque son émission fluorescente. Pendant l'étape de polymérisation, les deux sondes retournent de façon indépendante en solution ce qui supprime l'émission de fluorescence rouge (figure 2B). L'accroissement de la fluorescence rouge est proportionnel à la quantité d'ADN synthétisé durant la réaction PCR et commence à diminuer lorsque la quantité d'amplicons produits devient suffisamment importante pour provoquer une compétition de l'ADN amplifié avec l'hybridation simultanée des 2 sondes sur l'ADN cible (Mackay et al, 2002).

Cette technologie possède donc une grande spécificité et permet aussi une grande flexibilité dans le design des sondes. De plus, comme les sondes ne sont pas hydrolysées, elles sont réutilisées à chacun des cycles (Bustin, 2000). En plus du fait que la séquence cible doit être localisée vers l'extrémité 3' de l'amplicon et que le T_m des deux sondes doit être similaire, les principes généraux dans le design des sondes *Taqman* sont applicables pour cette technologie.

4) Balises moléculaires (sonde d'hybridation en épingle à cheveux: *Molecular Beacons*)

Une balise moléculaire est une sonde d'hybridation d'ADN en forme d'épingle à cheveux. La portion de la sonde qui compose la boucle est complémentaire à la séquence cible d'ADN. Le tronc de la balise moléculaire est formé de deux bras avec des séquences complémentaires (Tyagi et Kramer, 1996). Un émetteur fluorescent (FAM, TAMRA, TET, ROX) est fixé à l'extrémité d'un des bras et un suppresseur (quencher) (4-(4'-diméthylamino-phenylazo)-benzene: DABCYL) est fixé à l'extrémité de l'autre bras. Le suppresseur est un chromophore non-fluorescent qui dissipe en chaleur l'énergie du fluorochrome émetteur par le principe FRET. Les sondes libres adoptent en solution une structure en épingle à cheveux et le tronc maintient les bras ensemble pour une suppression efficace de l'émission de fluorescence. Pendant l'étape d'hybridation, lorsque la sonde rencontre une séquence qui lui est complémentaire, elle adopte une conformation transitoire qui force le tronc à se séparer libérant ainsi les 2 bras. La sonde s'hybride alors préférentiellement à sa séquence complémentaire cible sur la matrice. Dans cette conformation, le fluorochrome

émetteur est éloigné de son suppresseur restaurant ainsi l'émission de fluorescence qui peut être détectée alors que les autres balises moléculaires demeurent en structure d'épingle à cheveux (position fermée). Si la séquence d'ADN cible ne correspond pas parfaitement (mismatch) à la séquence de la balise moléculaire aucune hybridation et, par conséquent, aucune émission fluorescente ne survient. Ceci est principalement dû aux propriétés thermodynamiques de la structure de la balise moléculaire qui favorisent surtout la formation de l'épingle à cheveux sauf en cas d'hybridation parfaite des séquences (Bustin, 2000) (figure 3A). La spécificité de cette technologie est telle qu'elle permet de détecter les différences de séquences au nucléotide près, ce qui peut être parfois difficile à réaliser avec les technologies de sondes linéaires (Giesendorf et al, 1998; Marras et al, 1999). Elle constitue donc une technologie efficace pour la détection et le criblage à grande échelle des SNPs (single nucleotide polymorphisms) (Tyagi et al, 1998; Mhlanga et Malmberg, 2001). Les sondes sont dessinées pour demeurer intactes durant la réaction d'amplification et doivent se réhybrider à la cible à chaque cycle pour mesurer le signal constituant ainsi un autre avantage par rapport aux sondes *Taqman* hydrolysées à chaque cycle.

Le désavantage le plus important associé à l'utilisation des balises moléculaires est le design des sondes d'hybridation. Un design optimal du tronc des balises moléculaires est crucial. Avec un design non adéquat, le tronc pourrait adopter une conformation différente qui éloignerait le fluorochrome émetteur de l'environnement immédiat du suppresseur résultant ainsi en une population de sondes mal supprimées et un bruit de fond important. En contrepartie, si les forces d'hybridation du tronc (dépendantes de la longueur et de la composition des séquences complémentaires des bras) sont trop importantes, elles peuvent interférer avec l'hybridation de la balise moléculaire à sa séquence complémentaire cible et l'émission de fluorescence. Un profil de dénaturation thermique précis de chacune des balises moléculaires doit être établi pour déterminer les caractéristiques de dissociation (melting) des bras.

Plusieurs variantes de cette technologie comme les Sunrise primers (maintenant sous appellation commerciale Amplifluor™ hairpin primers) (Nazarenko et al, 1997; Myakishev et al, 2001), les cyclicons (Kandimalla et Agrawal, 2000) et les amorces scorpion (Mhlanga et Malmberg, 2001) ont été proposées pour la détection d'acides nucléiques spécifiques dans des solutions homogènes.

5) Amorces scorpion (*Scorpion primer: self-fluorescing amplicon*)

Les amorces scorpion représentent une variante de la technologie des balises moléculaires. Les fluorochromes et la sonde (partie balise moléculaire) sont intégrés à même l'amplicon de façon irréversible durant l'amplification par

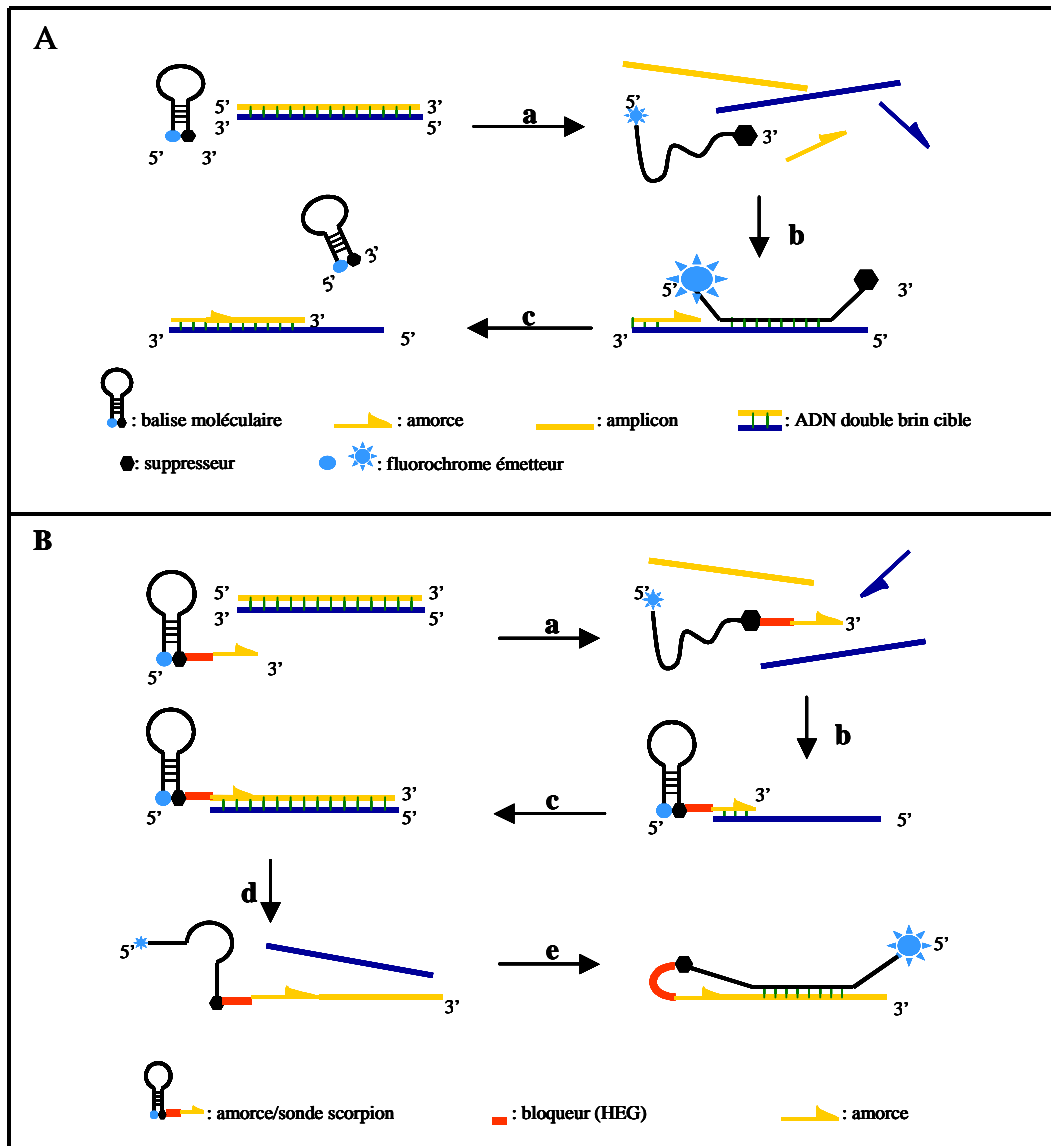


Figure 3 : **A: Balises moléculaires (Molecular Beacons).** (a) Durant l'étape de dénaturation, la balise moléculaire est sous forme relaxée et libre en solution mais la proximité des fluorochromes permet l'inhibition de la fluorescence. (b) Lorsque la sonde s'hybride à sa séquence cible, le fluorochrome émetteur est suffisamment éloigné de son supprimeur pour permettre l'émission de fluorescence. (c) À l'étape de polymérisation, la balise moléculaire retourne en solution sous forme d'épingle à cheveux. **B: Amorce scorpion (Scorpion primer).** (a) Durant l'étape de dénaturation, la balise moléculaire est sous forme relaxée et libre en solution mais la proximité des fluorochromes permet l'inhibition de la fluorescence. (b) L'amorce scorpion se fixe à sa séquence complémentaire cible. (c) Polymérisation du brin complémentaire. (d) Dénaturation des brins d'ADN. (e) Hybridation de la séquence complémentaire de la partie balise moléculaire à sa séquence cible permettant l'émission de fluorescence.

PCR. Le design d'une amorce/sonde scorpion est pratiquement similaire à celui des balises moléculaires. L'ajout d'une molécule d'hexéthylène glycol (HEG), aussi appelé bloqueur (stopper), est nécessaire pour empêcher la réplication de la balise moléculaire par l'ADN polymérase

pendant la réaction de PCR. Le HEG est donc situé après le fluorochrome supprimeur et est suivi d'une région amorce. Le fluorochrome émetteur porté en 5' de la région balise moléculaire peut être le FAM ou le ROX et le supprimeur est normalement le rouge de méthyl. La région amorce du

scorpion permet donc d'intégrer la balise moléculaire dans le nouvel amplicon pendant la réaction de PCR. La boucle de l'épingle à cheveux est dessinée dans le but de permettre l'hybridation de la sonde à sa séquence complémentaire cible située sur l'amplicon (figure 3B). Cette hybridation force l'épingle à cheveux à changer de conformation permettant ainsi l'émission de fluorescence (Whitcombe et al, 1999; Thelwell et al, 2000; Mackay et al, 2002). Thelwell et al (2000) rapportent que la technologie amorce/sonde scorpion est généralement plus efficace que les technologies *Taqman* et balises moléculaires, particulièrement dans un programme de PCR possédant des cycles très courts.

Cycle seuil (Threshold cycle)

Le concept du « cycle seuil » est à la base d'une quantification précise et reproductible pour les techniques fluorescentes en PCR. Les valeurs de fluorescence sont enregistrées au cours de chaque cycle et représentent la quantité d'amplicons produits en un point précis dans la réaction (figure 4). Plus il y a de matrices (template) à amplifier au départ de la réaction PCR, moins élevé sera le nombre de cycle requis pour atteindre un point où le signal d'émission de fluorescence sera statistiquement et significativement plus élevé que le bruit de fond (Gibson et al, 1996). Ce point est défini comme étant le cycle seuil (Ct) et apparaîtra toujours au cours de la phase exponentielle d'amplification. Par conséquent, la quantification n'est pas affectée par l'épuisement d'un des réactifs comme lors de la phase plateau ce qui explique pourquoi le système en temps réel est si reproductible. La valeur du Ct peut être traduite en un résultat quantitatif en la comparant avec les valeurs du Ct générées avec des matrices de quantification connues (Bustin, 2000).

Applications

La PCR en temps réel, à cause de sa capacité à produire des résultats rapides, spécifiques et quantitatifs, trouve de plus en plus d'applications dans différents domaines. Bien que cette liste ne soit pas exhaustive, voici les exemples d'application les plus courants.

La PCR en temps réel permet maintenant de réaliser des études plus fines d'expression génétique à partir de tissus ou de lignées cellulaires comme pour l'analyse quantitative de l'expression de différents gènes dans des études de modulation du cycle cellulaire avec des tissus exposés à des carcinogènes non génotoxiques (cic TNO BIBRA), les analyses de promoteurs dans des lignées cellulaires avec le gène reporter de la chloramphénicol acétyl transférase (Jeyaseelan et al, 2001), les études de modifications d'expression génétique dans les expériences drogues/réponses (drug/response), l'étude des ARNm variants résultant d'épissage alternatif (alternative splicing) (Vandenbroucke et al, 2001), etc. Elle peut aussi permettre de standardiser la quantité d'ADN de départ et d'évaluer la quantité d'ARNm en fin de réaction dans des études de

transcription *in vitro* (Liu et al, 2002).

La PCR en temps réel s'avère aussi un outil puissant pour des analyses de mutations comme les SNPs et des études de génotypage à grande échelle comme pour le gène du récepteur d'œstrogène (Täpp et al, 2000).

De plus en plus des tests utilisant la technologie des balises moléculaires sont dessinés pour la détection et la quantification rapide d'agents pathogènes viraux, bactériens et parasitaires. Vet et al (1999) ont déjà proposé un système multiplexe qui permet la détection et la quantification simultanées des rétrovirus HIV-1, HIV-2, des virus lymphotrophiques-T humains de type I et de type II avec un seuil de détection de 10 copies de génome et Poddar (1999) pour la détection d'adénovirus. Des tests de détection ont aussi été mis au point pour *Salmonella* avec une sensibilité de 2 CFU par réaction de PCR en temps réel (Chen et al, 2000) et de 1 CFU/ml après 6 h d'enrichissement pour *Escherichia coli* O157:H7 à partir d'échantillons de lait cru et de jus de pomme (Fortin et al, 2001). Chez les parasites, un test de PCR en temps réel a été développé pour *Toxoplasma gondii* (Lin et al, 2000). Plusieurs laboratoires travaillent présentement à la mise au point de nombreux autres tests diagnostiques pour différents agents pathogènes.

Traditionnellement, l'analyse du nombre de copies d'un plasmide pour évaluer la stabilité génétique des collections de cellules était effectuée par transfert de Southern (Southern blot). La PCR en temps réel permet maintenant de réaliser ces analyses de façon beaucoup plus rapide et plus précise. Elle peut aussi être utilisée dans l'évaluation de la quantité d'ADN chromosomique contaminant ou résiduel bactérien ou de mammifères dans la production de protéines recombinantes.

L'analyse de la bio-distribution d'un vecteur est un élément important dans l'évaluation de l'efficacité de protocoles de thérapie génique. La PCR en temps réel simplifie les études d'évaluation de la présence/absence d'ADN ou d'ARNm cible dans les différents tissus et permet de déterminer les conditions d'équilibre des ARNm exprimés (steady-state expressed mRNA).

Conclusion

Selon la littérature, la technique la plus fréquemment utilisée jusqu'à maintenant est la technologie des sondes d'hydrolyse (*Taqman assay*) bien que sa popularité soit principalement due à sa maturité commerciale. Cette technologie s'est avérée plus efficace que celle des agents intercalants au niveau de la spécificité et du multiplexage. Le développement des technologies de détection à base de balises moléculaires amène encore davantage de spécificité et de précision entre autre pour la détection des SNPs et des analyses de génotypage comparativement aux technologies basées sur les sondes linaires. La PCR en temps réel s'avère très intéressante pour des applications d'analyses à grande échelle étant donné que le processus complet est

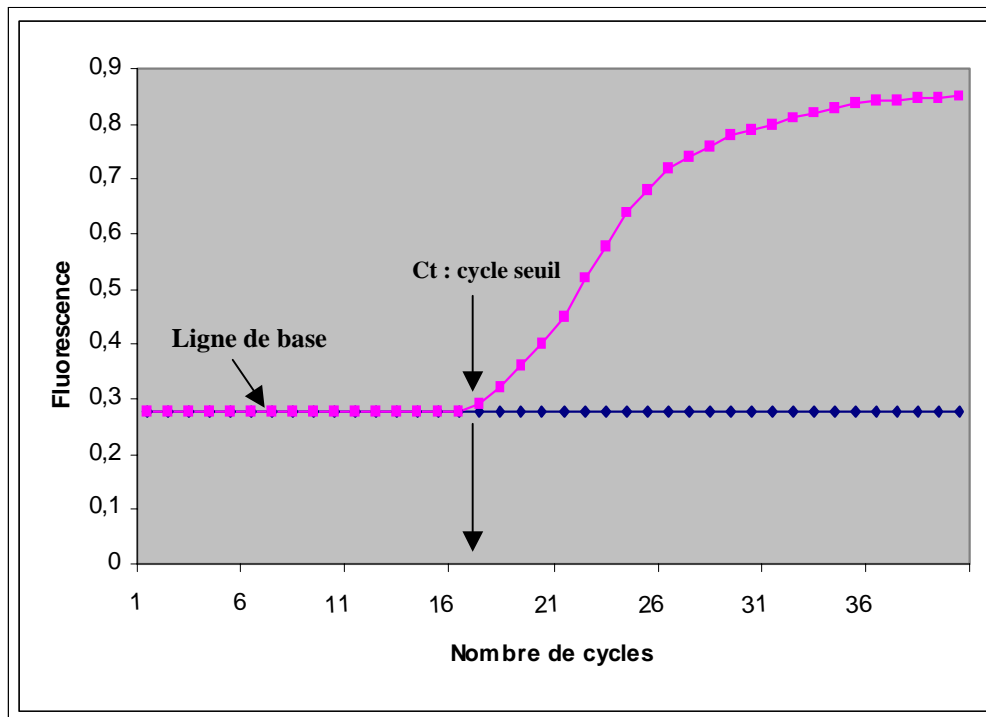


Figure 4 : Modèle graphique de la PCR en temps réel où l'intensité de la fluorescence est exprimée en fonction du nombre de cycles. L'intensité de la fluorescence à chaque cycle est proportionnelle à la concentration d'amplicons, le cycle seuil (Ct) représente le nombre de cycles requis où le signal d'émission de fluorescence est statistiquement et significativement plus élevé que la ligne de base.

automatisé du début à la fin. Comme cette technique comprend généralement des systèmes en tubes fermés et que la quantification ne requiert aucune manipulation post-amplification, les problèmes de contamination post-PCR par les amplicons sont fortement réduits.

Des analyses d'expression de gènes, de réponse cellulaire à différentes drogues (drug/response), de détection de mutations, de génotypage, de détection et quantification d'agents pathogènes, de quantification d'ADN et d'ARN, d'essais d'expression et de distribution pour la thérapie

génique, de quantification du nombre de copies dans une collection de cellules et, finalement, d'évaluation d'ADN résiduel sont, présentement, quelques exemples d'applications de plus en plus répandus de la PCR en temps réel.

La PCR en temps réel est donc un outil puissant et les développements récents dans les différentes technologies de détection laissent entrevoir des applications plus innovatrices les unes que les autres.

Références

Bustin, S. A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* # 25: 169-193.

Chen, W., Martinez, G. and Mulchandani, A. 2000. Molecular beacons: A real time polymerase chain reaction assay for detecting *Salmonella*. *Analytical Biochemistry* # 280: 166-172.

Fortin, N. Y., Mulchandani, A. and Chen, W. 2001. Use of real time polymerase chain reaction and molecular beacons for the detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Analytical Biochemistry* # 289: 281-288.

Gibson, U. E., Heid, C. A. and Williams, P. M. 1996. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Research* # 6: 995-1001.

Giesendorf, B. A., Vet, J. A., Tyagi, S., Mensink, E. J., Trijbels, F. J. and Blom, H. J. 1998. Molecular beacons: a new approach for semiautomated mutation analysis. *Clinical Chemistry* # 44: 482-486.

Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S. and Griffith, R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* # 10: 413-417.

- Ishiguro, T., Saitoh, J., Yawata, H., Yamagishi, H., Iwasaki, S. and Mitoma, Y. 1995. Homogeneous quantitative assay of Hepatitis C virus RNA by polymerase chain reaction in the presence of a fluorescent intercalater. *Analytical Biochemistry* # 229: 207-213.
- Jeyaseelan, K., Ma, D. and Armugam A. 2001. Real-time detection of gene promotor activity: quantification of toxin gene transcription. *Nucleic Acids Research* # 29 No.12 E58.
- Kandimalla, E. R. and Agrawal, S. 2000. "Cyclicons" as hybridation-based fluorescent primer-probes: synthesis, properties and application in real-time PCR. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* # 8: 1911-1916.
- Lin, M.-H., Chen, T.-C., Kuo, T.-T., Tseng, C. and Tseng, C.-P. 2000. Real-time PCR for quantitative detection of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Clinical Microbiology* # 38: 4121-4125.
- Liu, J., Feldman, P. and Chung, T. D. Y. 2002. Real-time monitoring *in vitro* transcription using molecular beacons. *Analytical Biochemistry* # 300: 40-45.
- Mackay, I. M., Arden, K. E. and Nitsche A. 2002. Real time PCR in virology. *Nucleic Acids Research* # 30: 1292-1305.
- Marras, S. A., Kramer, F. R. and Tyagi, S. 1999. Multiplex detection of single-nucleotide variations using molecular beacons. *Genetic Analysis* # 14: 151-156.
- Martell, M. Gomez, J., Esteban, J. I., Sauleda, S., Quer, J., Cabot, B., Esteban, R. and Guardia, J. 1999. High-throughput real-time reverse transcription-PCR quantitation of Hepatitis C virus RNA. *Journal of Clinical Microbiology* # 37: 327-332.
- Mhlanga, M. M. and Malmberg, L. 2001. Using molecular beacons to detect single nucleotide polymorphisms with real-time PCR. *Methods* # 25: 463-471.
- Morrison, T. M., Weis, J. J. and Wittwer, C. T. 1998. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR green I monitoring during amplification. *Biotechniques* # 24: 952-962.
- Myakishev, M. V., Khripin Y., Hu, S. and Hamer D. H. 2001. High-throughput SNP Genotyping by allele-specific PCR with universal energy-transfer-labeled primers. *Genome Research* # 11: 163-169.
- Nazarenko, I. A., Bhatnagaer, S. K. and Hohman, R.J. 1997. A closed tube format for amplification and detection of DNA based on energy transfer. *Nucleic Acids Research* # 25: 2516-2521.
- Nielsen, P. E. 1991. Sequence-selective DNA recognition by synthetic ligands. *Bioconjugate Chemistry* # 2:1-12.
- Poddar, S. K. 1999. Detection of adenovirus using PCR and molecular beacon. *Journal of Virological Methods* # 82: 19-26.
- Searle, M. S. and Embrey, K. E. 1990. Sequence-specific interaction of Hoescht 33258 with the minor groove of an adenine-tract DNA duplex studied in solution by 1H NMR spectroscopy. *Nucleic Acids Research* # 18: 3753-3762.
- Täpp, I., Malmberg, I., Rennel, E., Wik, M. and Syvänen, A.-C. 2000. Homogenous scoring of single-nucleotide polymorphisms: comparison of the 5'-nuclease Taq Man assay and molecular beacon probes. *Biotechniques* # 28: 732-738.
- Thelwell, N., Millington, S., Solinas, A., Booth, J. and Brown, T. 2000. Mode of action and application of scorpion primers to mutation detection. *Nucleic Acids Research* # 28: 3752-3761.
- Tseng, S. Y., Macool, D., Elliot, V., Tice, G., Jackson, R., Barbour, M. and Amorese, D. 1997. An homogeneous fluorescence polymerase chain reaction assay to identify *Salmonella*. *Analytical Biochemistry* # 245: 207-212.
- Tyagi, S. and Kramer, F.R. 1996. Molecular beacons: Probes that fluoresce upon hybridization. *Nature Biotechnology* # 14: 303-308.
- Tyagi, S., Bratu, D. P. and Kramer, F. R. 1998. Multicolor molecular beacons for allele discrimination. *Nature Biotechnology* # 16: 49-53.
- Vandenbroucke, I. I., Vandesompele, J., De Paepe, A. and Messiaen, L. 2001. Quantification of splice variant using real-time PCR. *Nucleic Acids Research* # 29 No.13 E68.
- Vet, J. A. M., Majithia, A. R., Marras, S. A. E., Tyagi, S., Dube, S., Poiesz, B. J. and Kramer, F. R. 1999. Multiplex detection of four pathogenic retroviruses using molecular beacons. *Proceedings of the National Academy of Science* # 96: 6394-6399.
- Whitcombe, D., Theaker, J., Guy, S. P., Brown, T. and Little, S. 1999. Detection of PCR products using self probing amplicons and fluorescence. *Nature Biotechnology* # 17: 804-807.
- Wittwer, C. T., Herrmann, M. G., Moss, A. A. and Rasmussen, R. P. 1997. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* # 22: 130-138.

Summary:

Real-Time PCR technology is getting more and more popular for different sectors of activity. This technology is based on the detection and quantification of a fluorescent reporter whose emission is directly

proportional to the quantity of amplicons produced during the PCR reaction. Because it is generally performed with closed tube systems and that quantification does not require any post-amplification

handling, the risks of post-PCR contamination by amplicons are significantly reduced. The complete process is automated from the beginning to the end, rendering this technology very performing for high-

throughput analyses. This paper presents a description of the Real-Time PCR based principles, different amplicons detection technologies and examples of current applications.

