

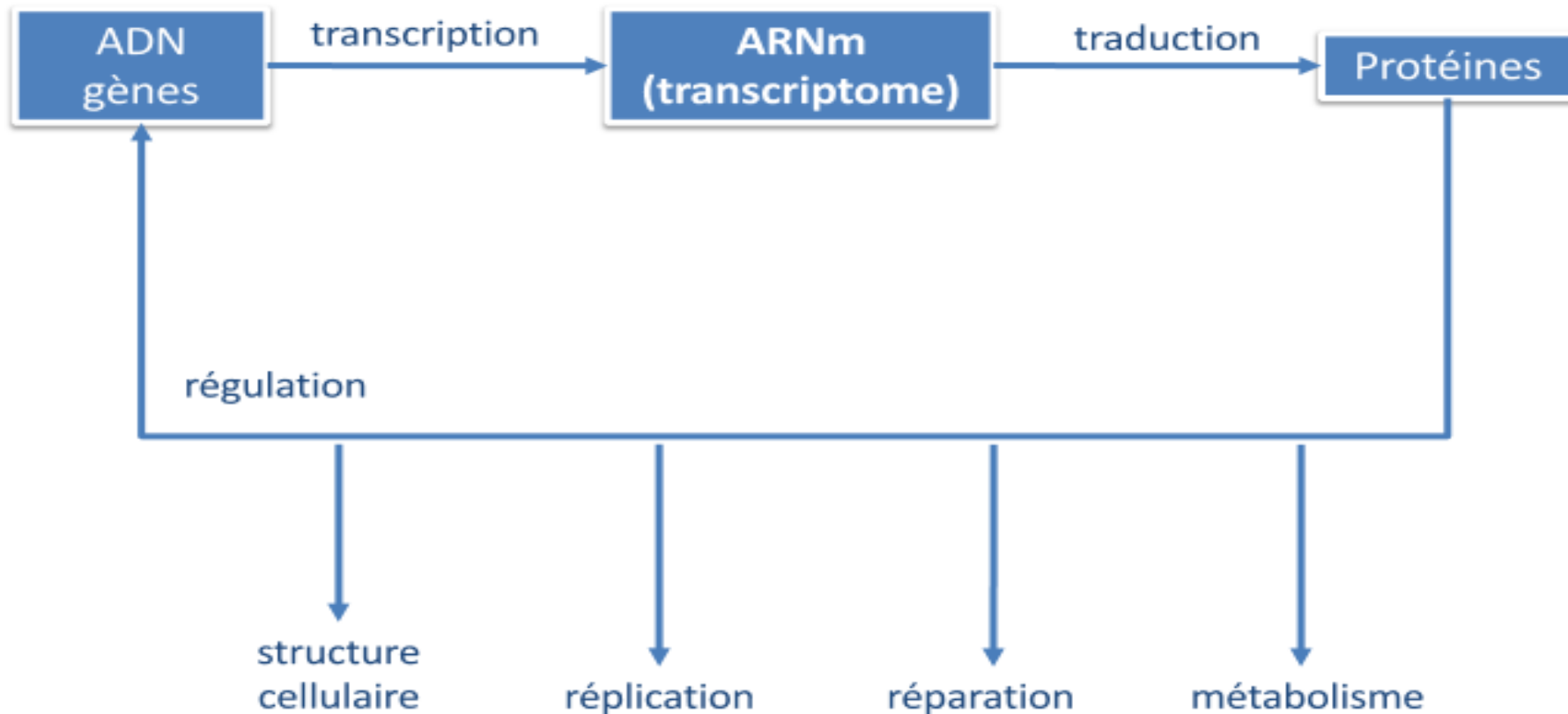
TRANSCRIPTOMIQUE

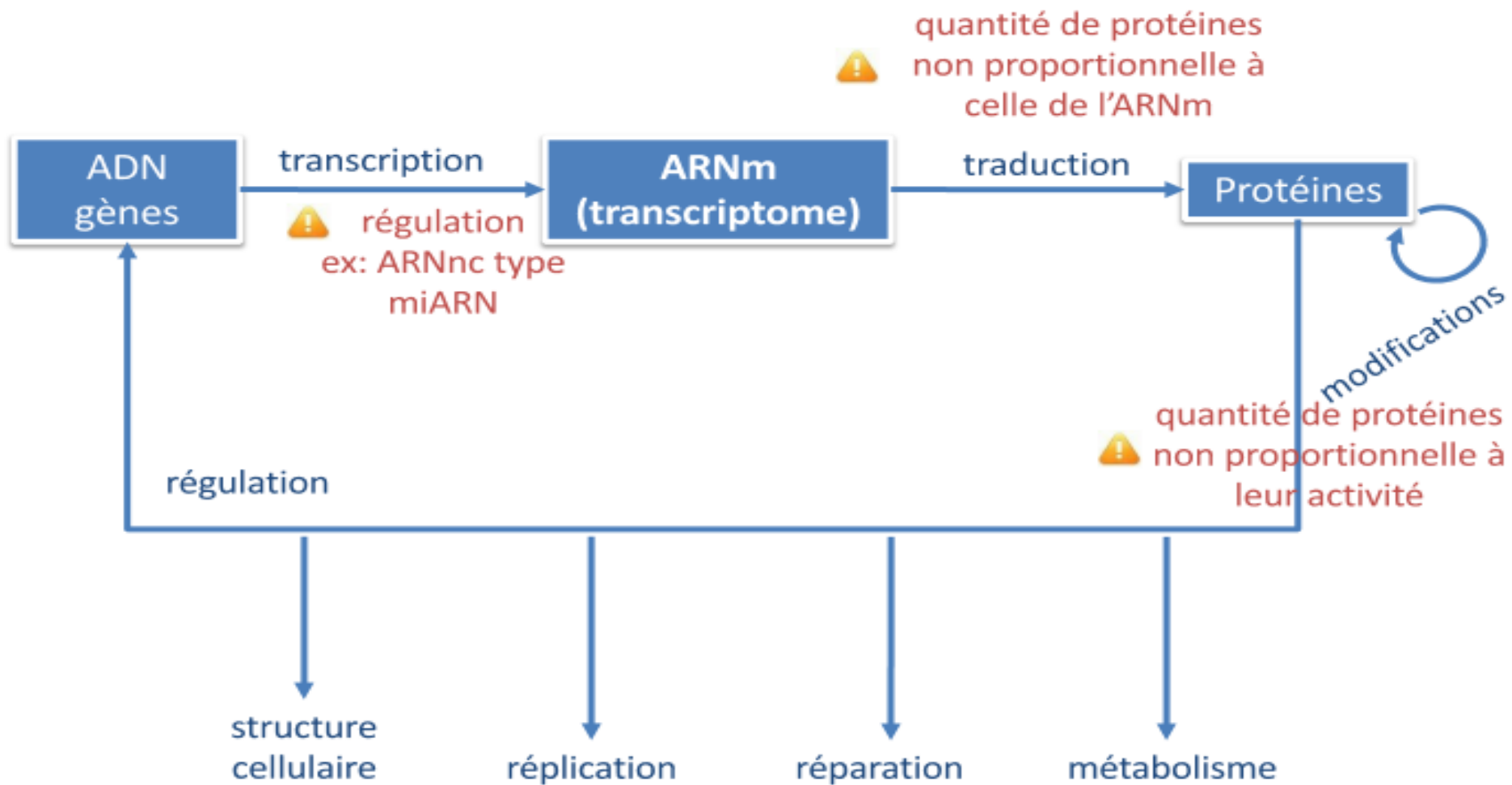
Plan

- Rappels sur la transcription
 - Transcription de l'ADN
 - Le processus d'épissage
 - Les ARNs et leurs fonctions
- La transcriptomique
 - Acquisition des données
 - Description des données
 - Transformation, normalisation et filtrage
- Principales techniques d'acquisition et d'analyse de données de transcriptome
 - Microarray
 - RNAseq
 - qRT-PCR

Rappels sur la transcription

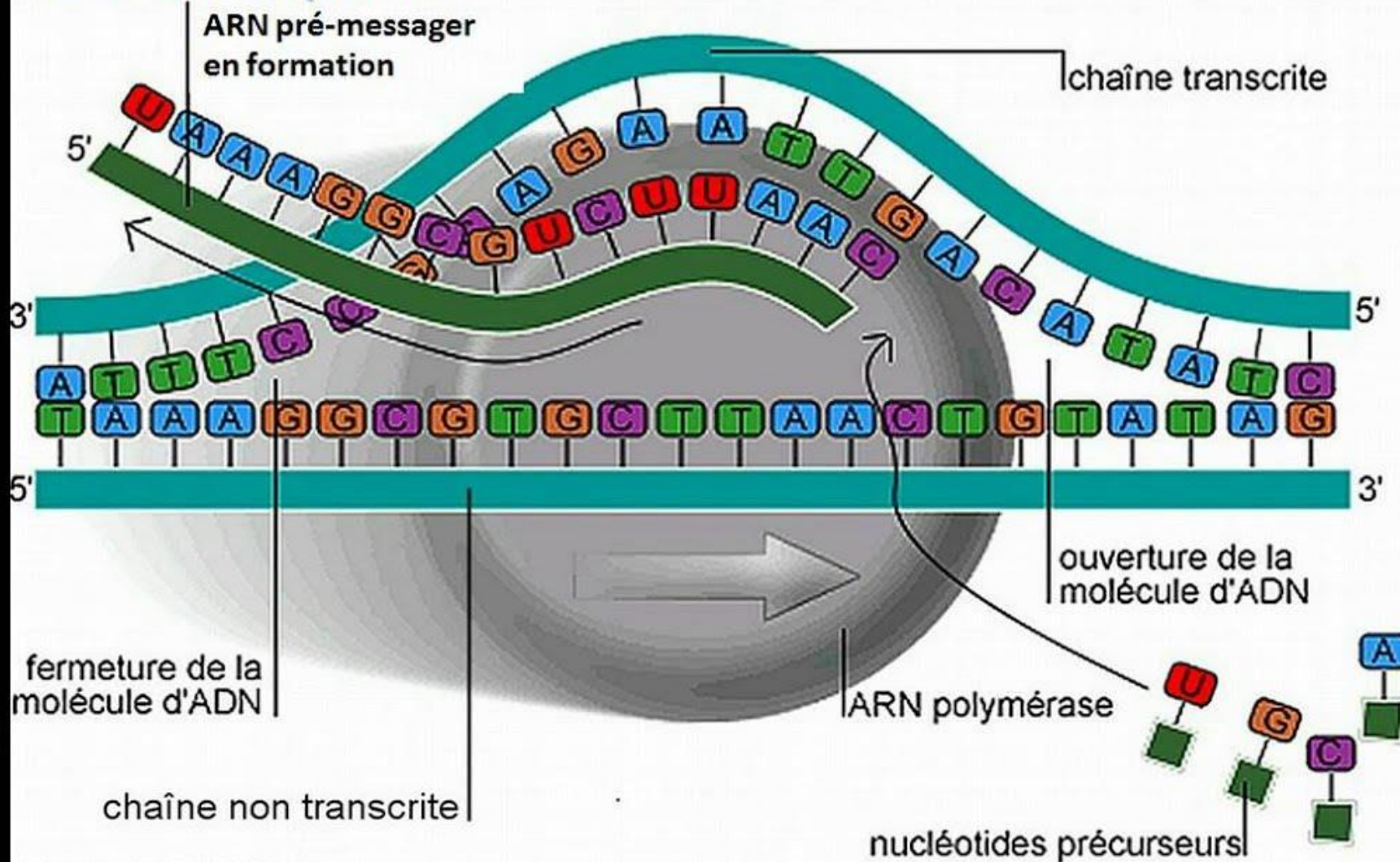
La transcription permet la copie des portions d'ADN en des molécules intermédiaires "semblables", les ARN messagers, qui peuvent ensuite être traduits en protéines.





La transcription: Processus complexe

La transcription



Epissage: Processus complexe

Le transcrit issu directement de la “copie” du gène, le pré-ARNm, n’est pas directement traduit et doit d’abord subir une étape de maturation:

l’épissage.

- ✓ L’épissage **constitutif**: excision des introns des pré-ARNm.
- ✓ L’épissage dit **alternatif**, aboutissant à la rétention de certains introns et/ou à l’excision de certains exons dans les transcrits (près de 90% des gènes de l’humain sont concernés par l’épissage alternatif [Barash et al. [2010]; Pan et al. [2008]]).

Du fait de l'épissage alternatif, un même gène conduit couramment à la formation de transcrits constitués de différentes suites d'exons, et donc potentiellement à la synthèse de plusieurs protéines

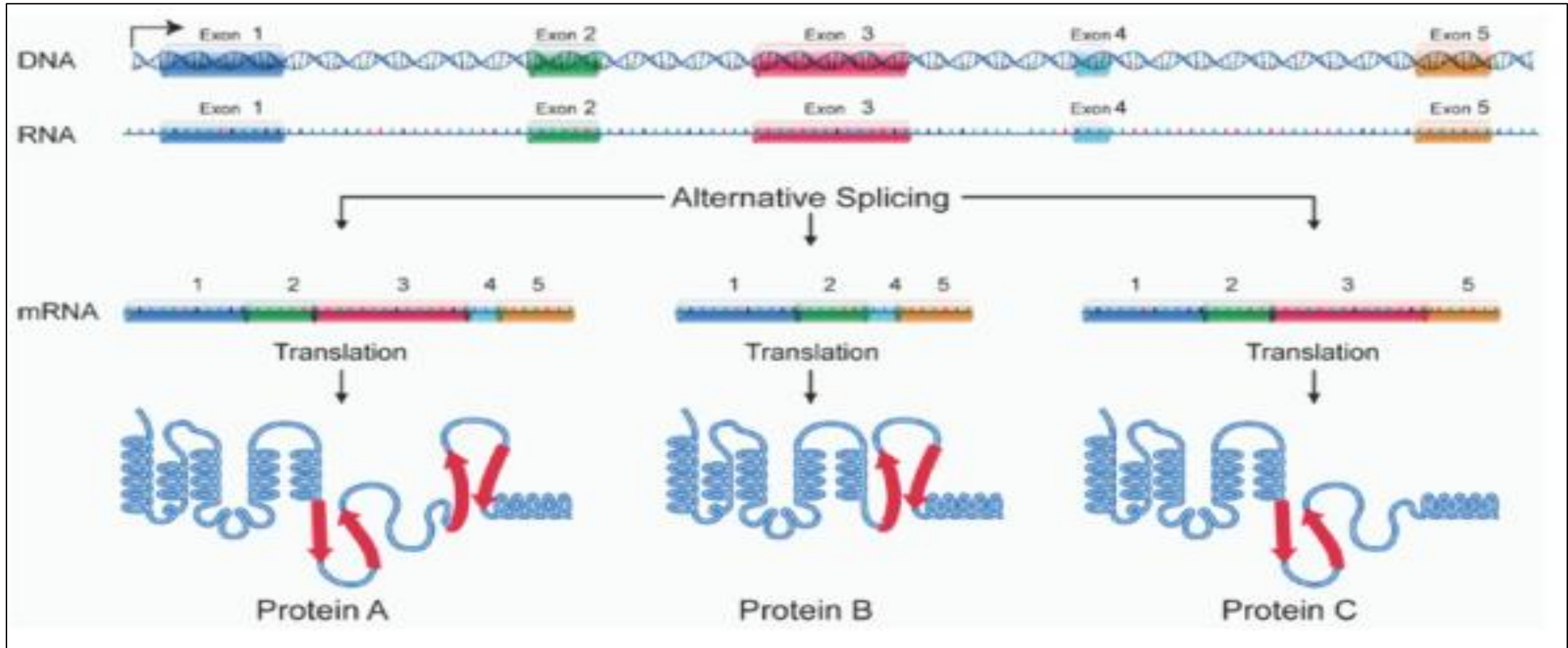
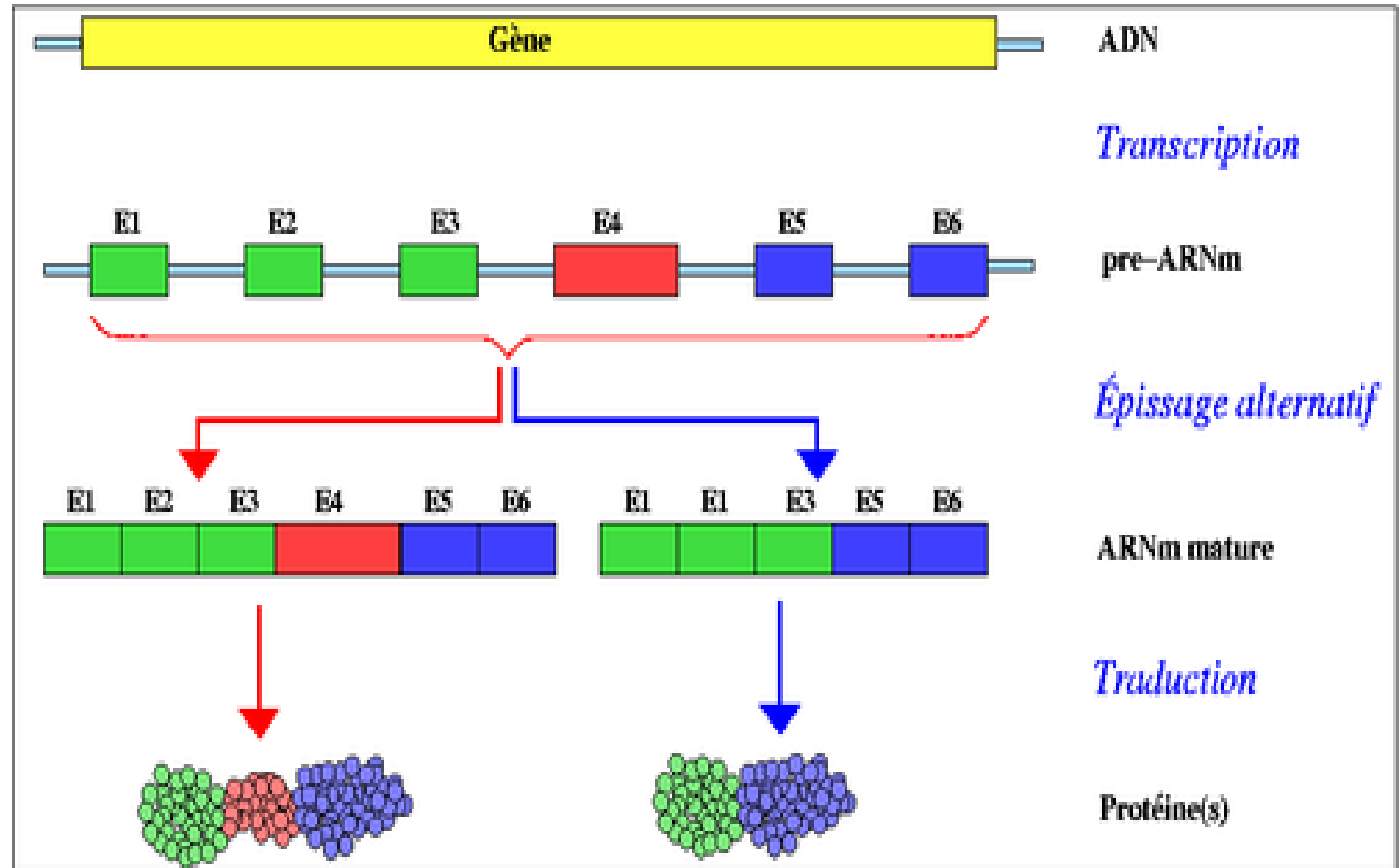


Schéma simplifié : transcription, épissage alternatif et traduction (adaptée d'une figure du NHGRI [2014],

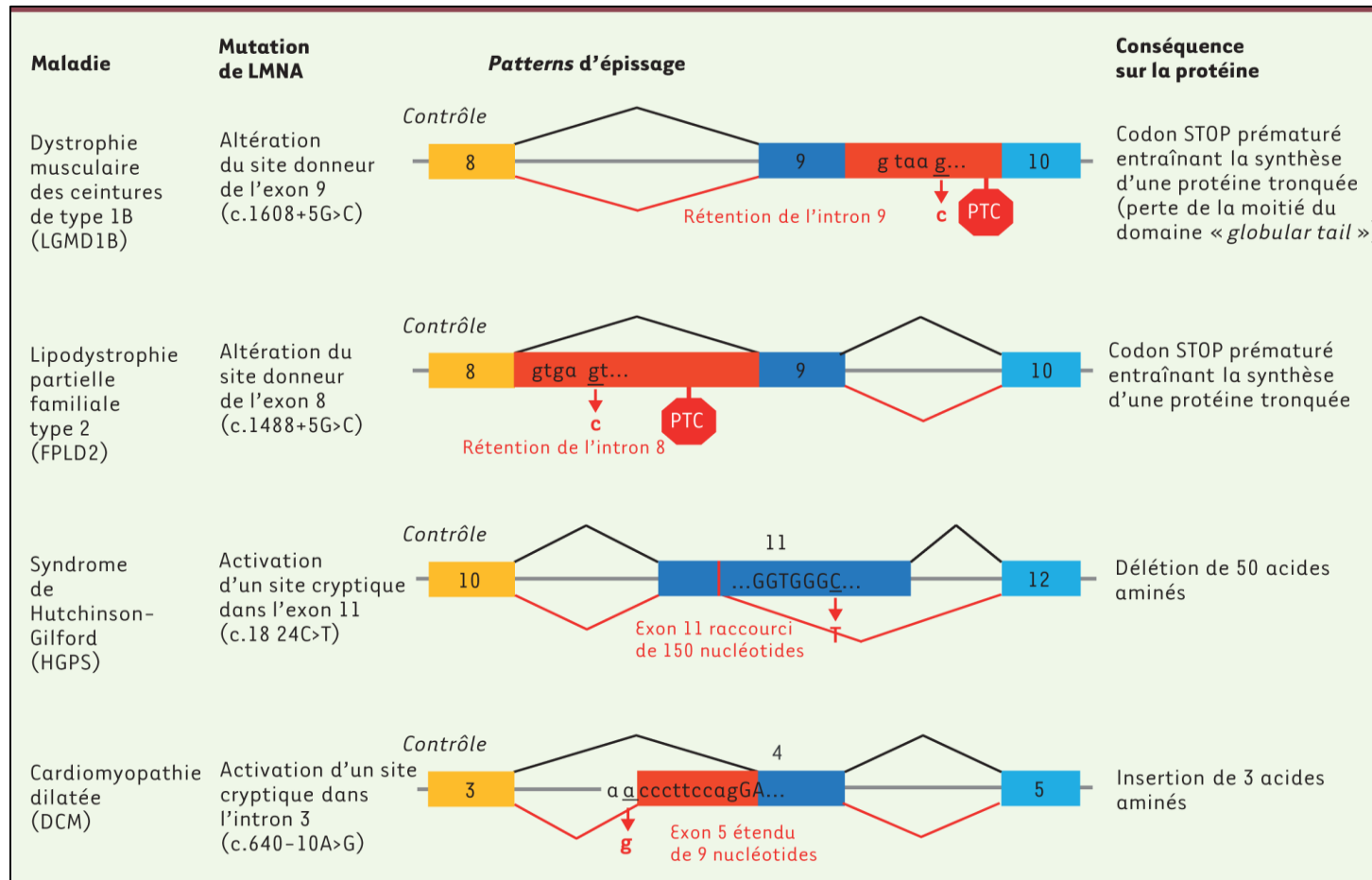
- Le dogme « 1 gène pour 1 protéine » n'est plus généralement valable et "1 gène, des protéines" correspond plus à la réalité.

L'épissage alternatif joue un rôle très important dans le **développement des cellules**, l'organisation des **tissus** et même dans le **développement d'un individu**



Conséquences de l'épissage alternatif

Des altérations de l'épissage d'un même gène peuvent être la cause d'une même maladie : Exemple du gène *LMNA*. Au milieu de la figure (« patterns d'épissage ») sont indiqués en **rouge les mutations et les événements d'épissage aberrants** qui en résultent. Les octogones rouges contenant « PTC » (pour *premature termination codons*) indiquent la position de codons STOP prématurés. *LMNA* : gène de la lamine A/C.



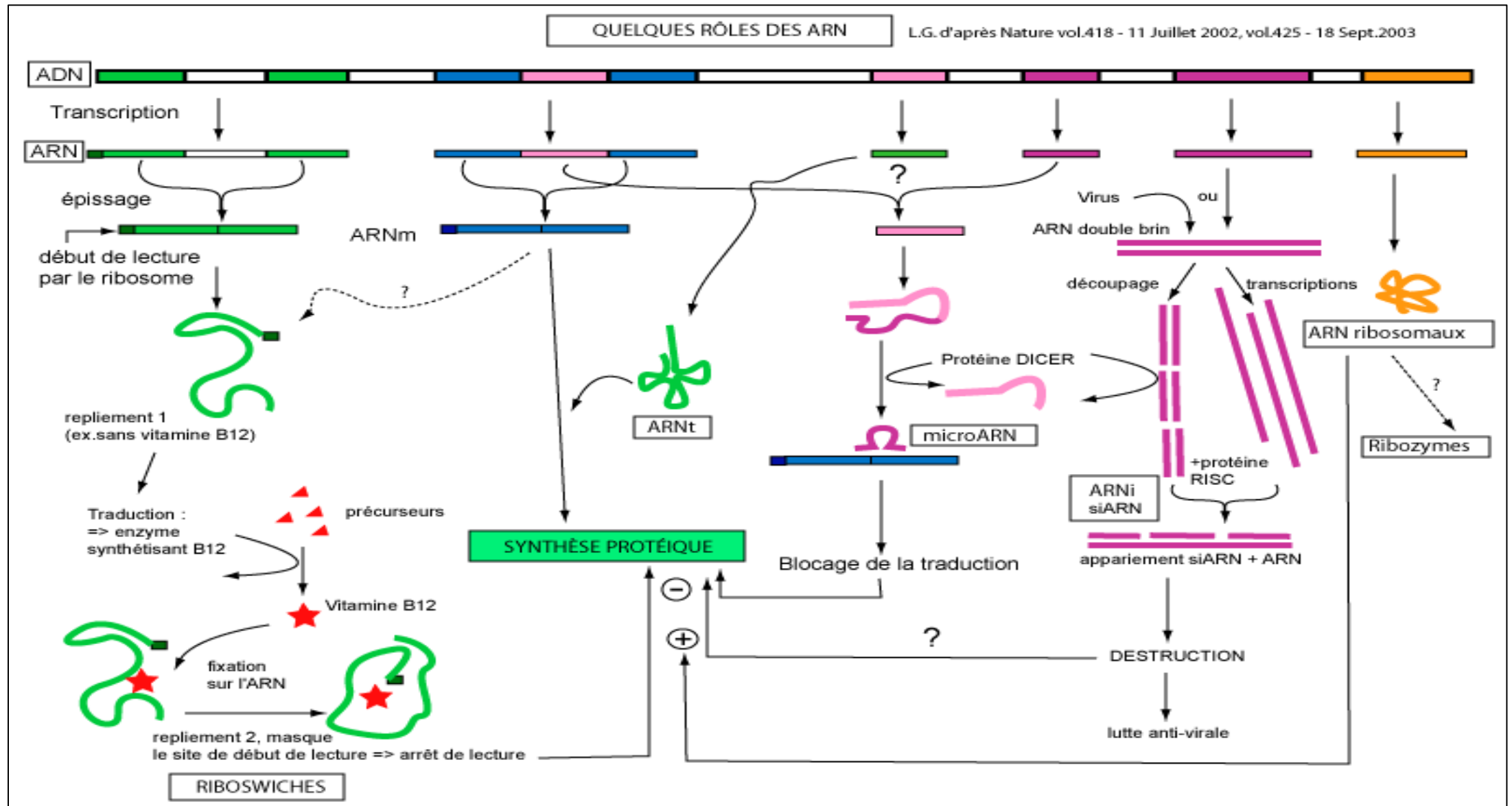
L'épissage est le mécanisme principal qui permet l'augmentation de la diversité de nos cellules.

Rôles des ARNs

Si les ARN messagers (ARNm) sont les molécules le plus souvent visées par les analyses de transcriptome, de part leur rôle d'intermédiaire pour la synthèse des protéines, il existe d'autres types d'ARN qui sont eux non codants :

- ✓ **De longs ARN non codants**, qui n'entraîneront pas la synthèse d'une protéine.
- ✓ **Les ARN ribosomiques (ARNr)** constituent la plus grande part de l'ARN total d'une cellule (80% chez les mammifères). Ils forment, en association avec des protéines, les ribosomes chargés de la synthèse des protéines à partir des ARNm.
- ✓ **Les ARN de transfert (ARNt)** qui permettent la traduction d'un codon d'un ARNm en acide aminé.
- ✓ **Divers petits ARN non codants**, dont on sait que certains jouent un rôle dans les systèmes de régulation d'expression de différents compartiments du génomes (gènes et éléments transposables).

Rôles des ARNs



Introduction sur la transcriptomique

- Transcriptome : ensemble des ARNm ou transcrits présents dans une cellule ou une population de cellules dans des conditions données.
- Le transcriptome peut être celui d'un type cellulaire particulier ou d'un tissu spécifique.
- La transcriptomique consiste en l'étude de l'ensemble des ARN (ou transcrits), souvent plus particulièrement les ARN messagers (ARNm), qui sont utilisés comme intermédiaires pour la production de protéines.
- La transcriptomique constitue aujourd'hui un domaine de recherche à part entière.

- Le séquençage à haut débit de l'ARN (appelé RNA-seq) est actuellement la technologie la plus employée pour identifier et quantifier, à large échelle, les transcrits extraits d'un ou plusieurs individus, tissus ou types cellulaires, dans des conditions physiologiques données.
- Avec la production massive de données RNA-seq, des méthodes et outils spécifiques permettant l'analyse de ce type de données ont été et sont encore développés.

Principales techniques d'acquisition de données de transcriptome

- qPCR, RT-PCR, qRT-PCR
- Microarrays
- Next Generation Sequencing (NGS)
 - ✓ RNAseq
 - ✓ sRNAseq

Technique de Microarray

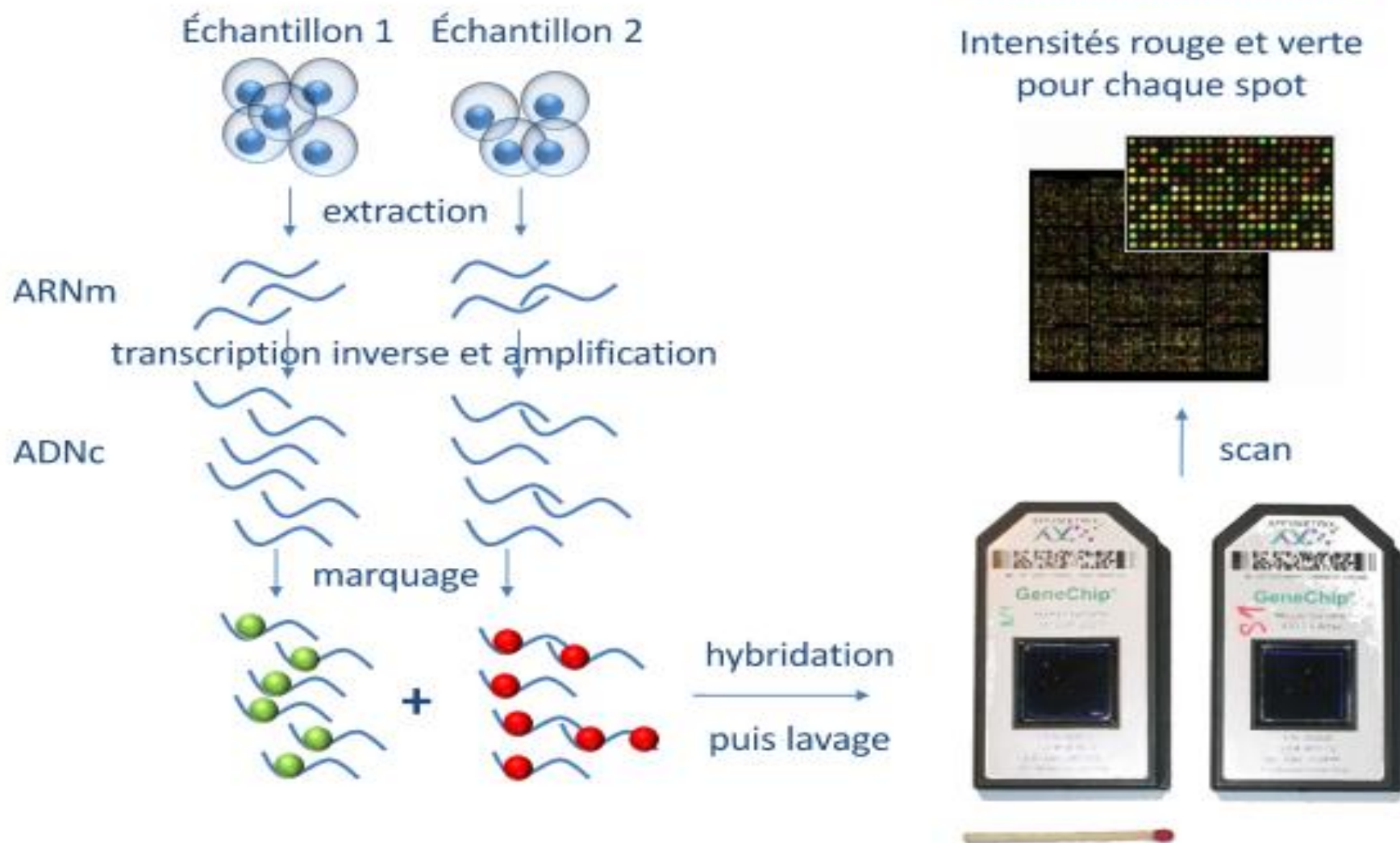
Technique de Microarray

- C'est un arrangement ordonné d'échantillons où la comparaison d'échantillons d'ADN connus et inconnus est effectuée sur la base de règles d'appariement de bases.
- Une expérience de puces à ADN utilise des systèmes d'analyse courants tels que les microplaques ou les membranes de buvardage standard.
- Les microarray sont des ensembles de zones de réaction chimique miniaturisées qui peuvent être utilisées pour tester des **fragments d'ADN, des anticorps ou des protéines**. Chaque zone ou point de réaction a une **cible immobilisée** qui est **hybridée avec une sonde complémentaire** présente dans l'échantillon à tester

Principe de base des puces à ADN

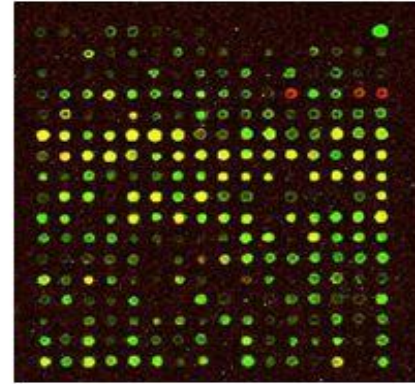
- Le principe de base des puces à ADN est l'hybridation entre deux brins d'ADN. Des séquences cibles marquées par fluorescence qui se lient à une séquence sonde génèrent un signal qui dépend de la force de l'hybridation déterminée par le nombre de bases appariées.
- Un microarray d'ADN est une collection de taches d'ADN microscopiques sur une surface solide. Chaque tache contient des picomoles d'une séquence d'ADN spécifique, appelés sondes
- Utilisés pour la détection de polymorphismes et de mutations dans l'ADN génomique: puces à ADN, matrices d'ADN ou biopuces (est une petite surface solide rectangulaire en verre ou en silicone)

Acquisition des données (microarray)



Transcriptomique

- Puces à ADN (microarrays)
 - Technologie privée Affymetrix
 - Technologie académique CATMA
- Principe :
 - fixer sur un support des fragments d'ADN spécifiques de chaque cDNA
 - Hybrider un pool d'ARN extrait d'un tissu d'une lignée donnée dans une condition donnée et marqué à l'aide d'un fluorophore
 - Évaluer pour cet échantillon d'ARN le niveau d'expression de la quasi-intégralité des gènes (dans le cas d'*Arabidopsis*)



Les fluorophores les plus utilisés sont Cy3 (rouge à 635 nm) et Cy5 (vert à 532 nm)

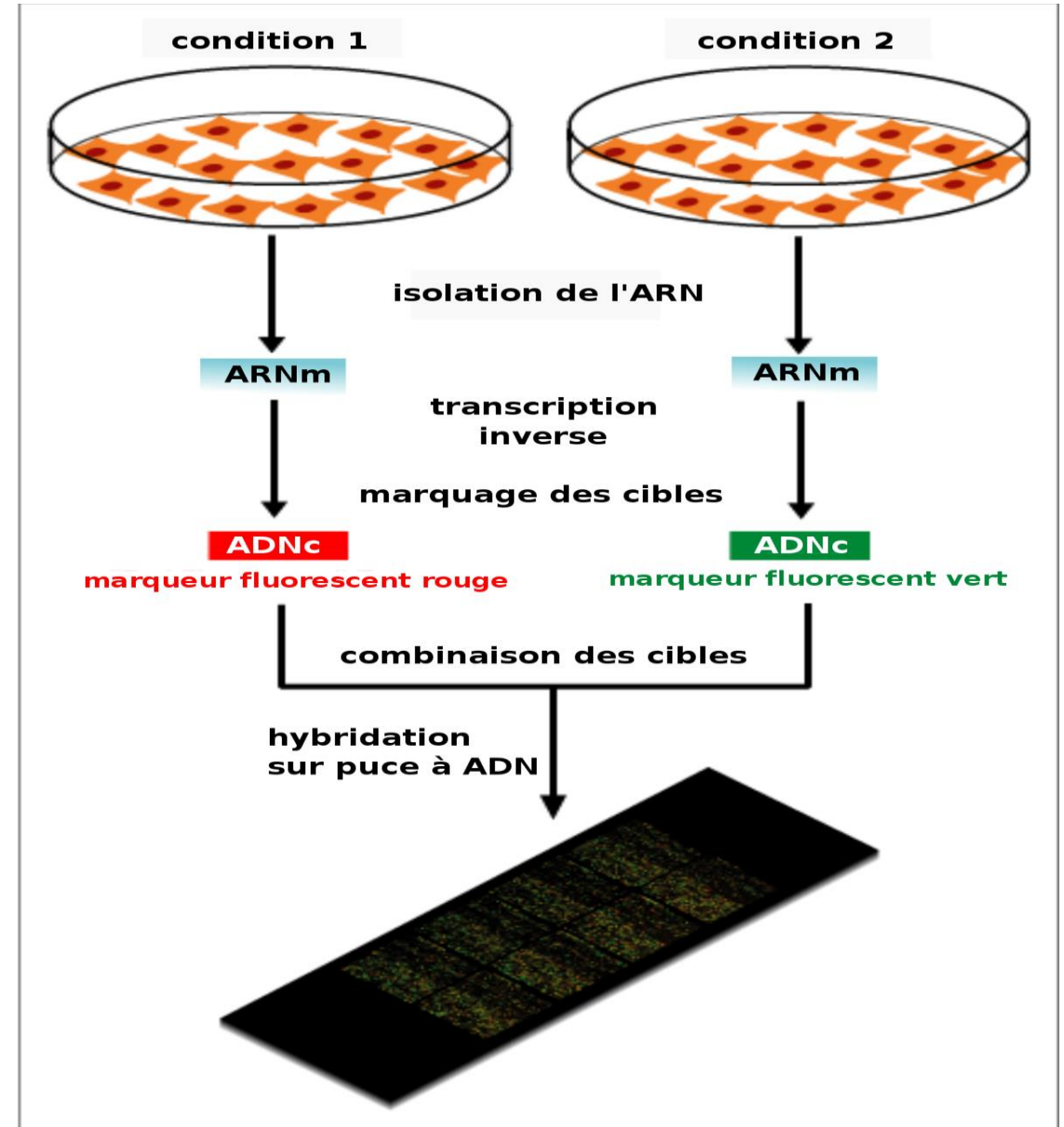
Marquage aux Fluorophore Cy3 (vert à 532 nm) et Cy5 (rouge à 635 nm) et hybridation sur puce ADN

Les ADNc vert (référence) et rouge (expérience) sont mélangés et hybridés au même microarray. Compétition entre les ADNc vert et rouge pour n'importe quel gène pour se lier à la sonde.

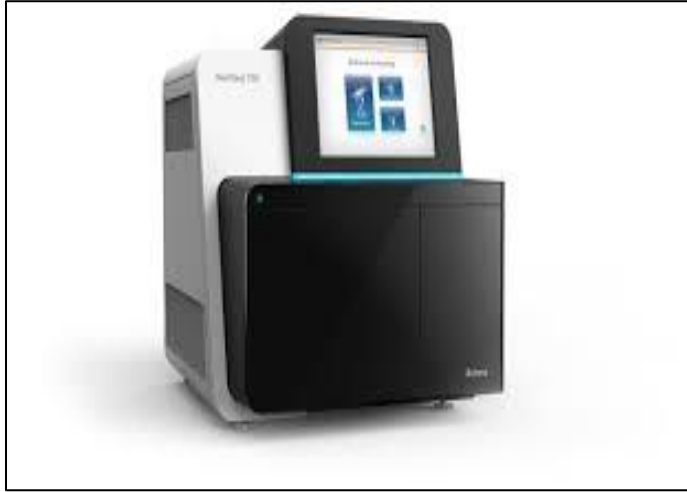
Tache jaune: nombre à peu égal de rouge et vert se ont liés: pas de changement dans le niveau d'expression

Tache rouge: surexpression du gène

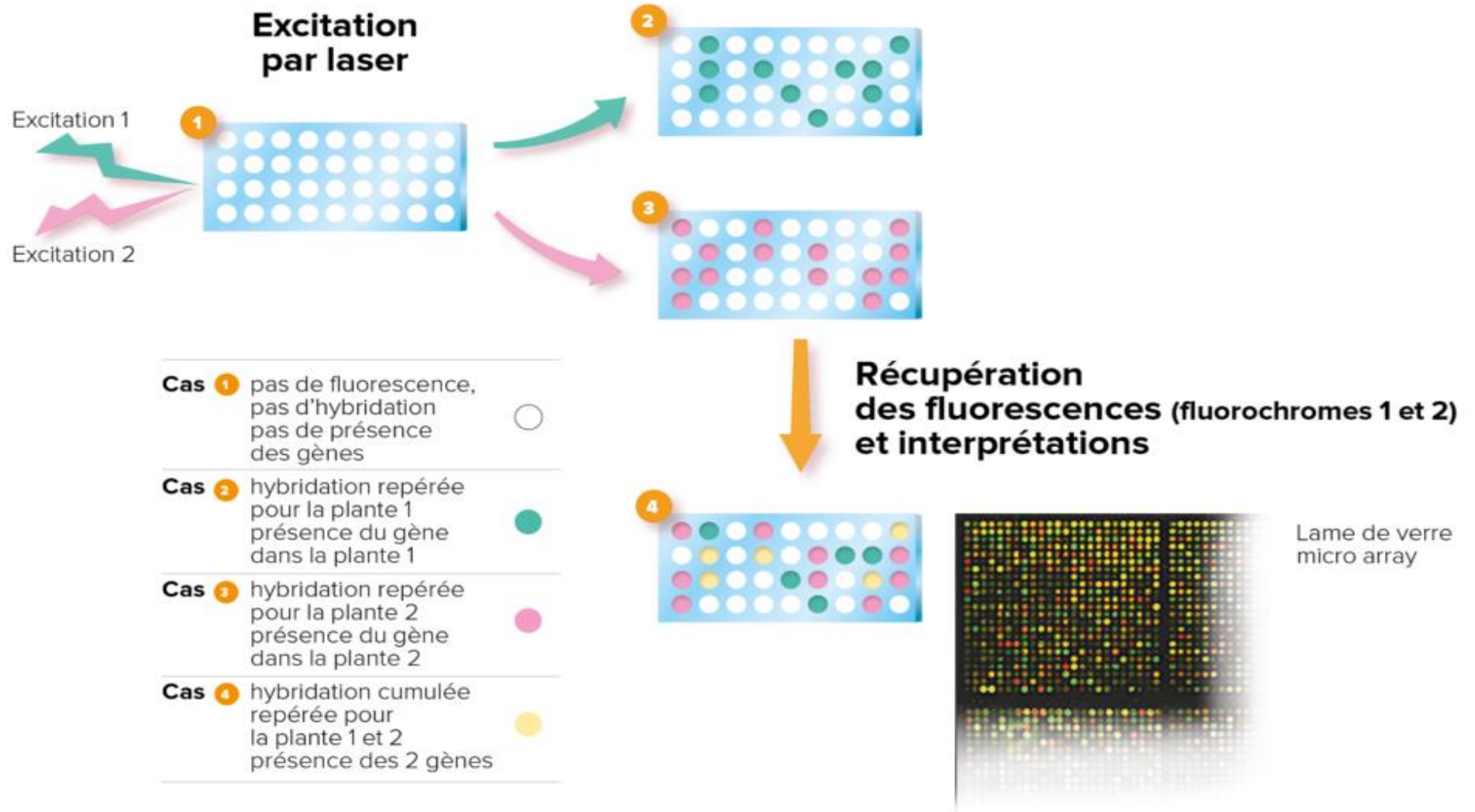
Tache verte: sous expression (répression) du gène



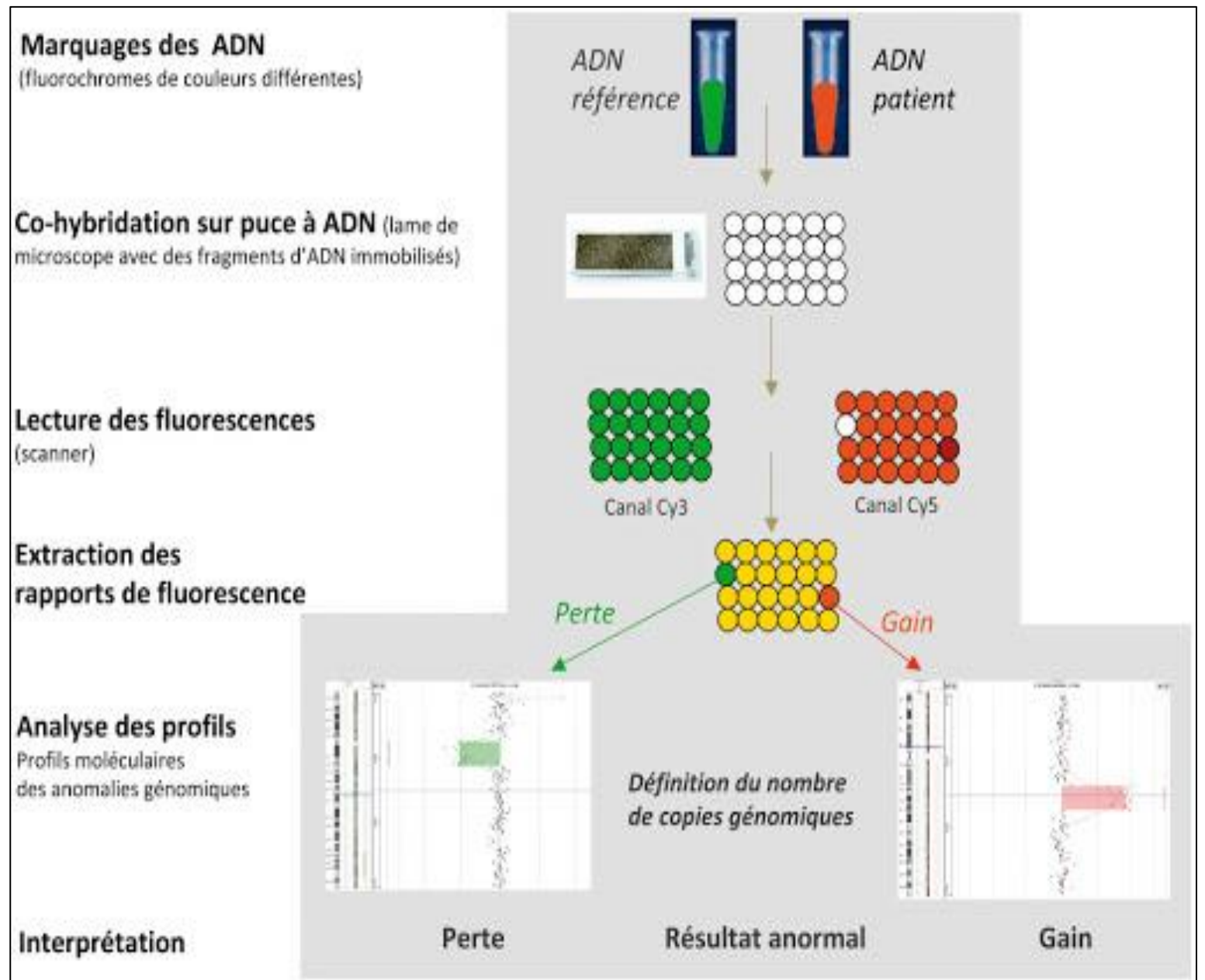
Equipements Microarray



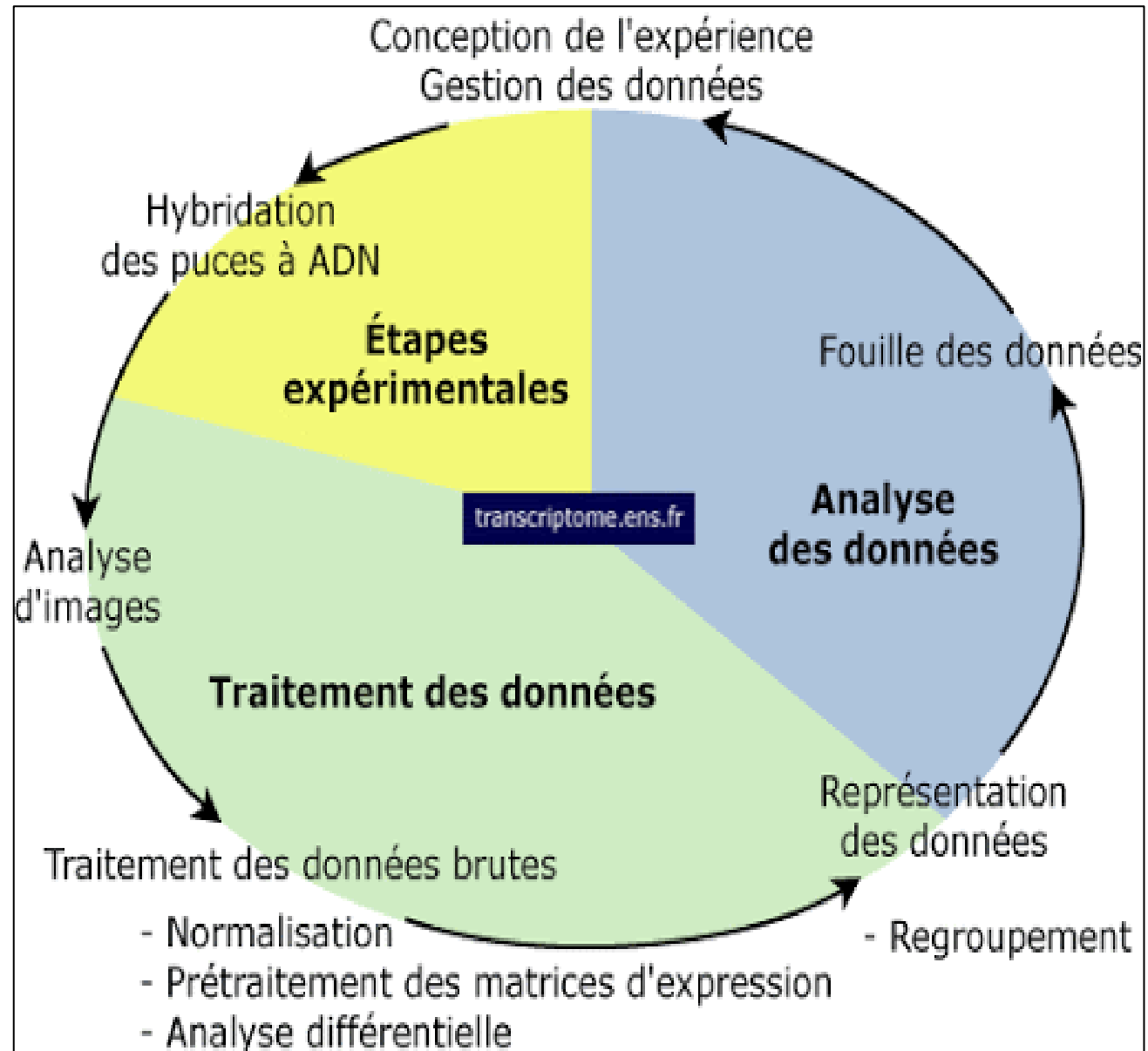
Lecture d'une puce à ADN



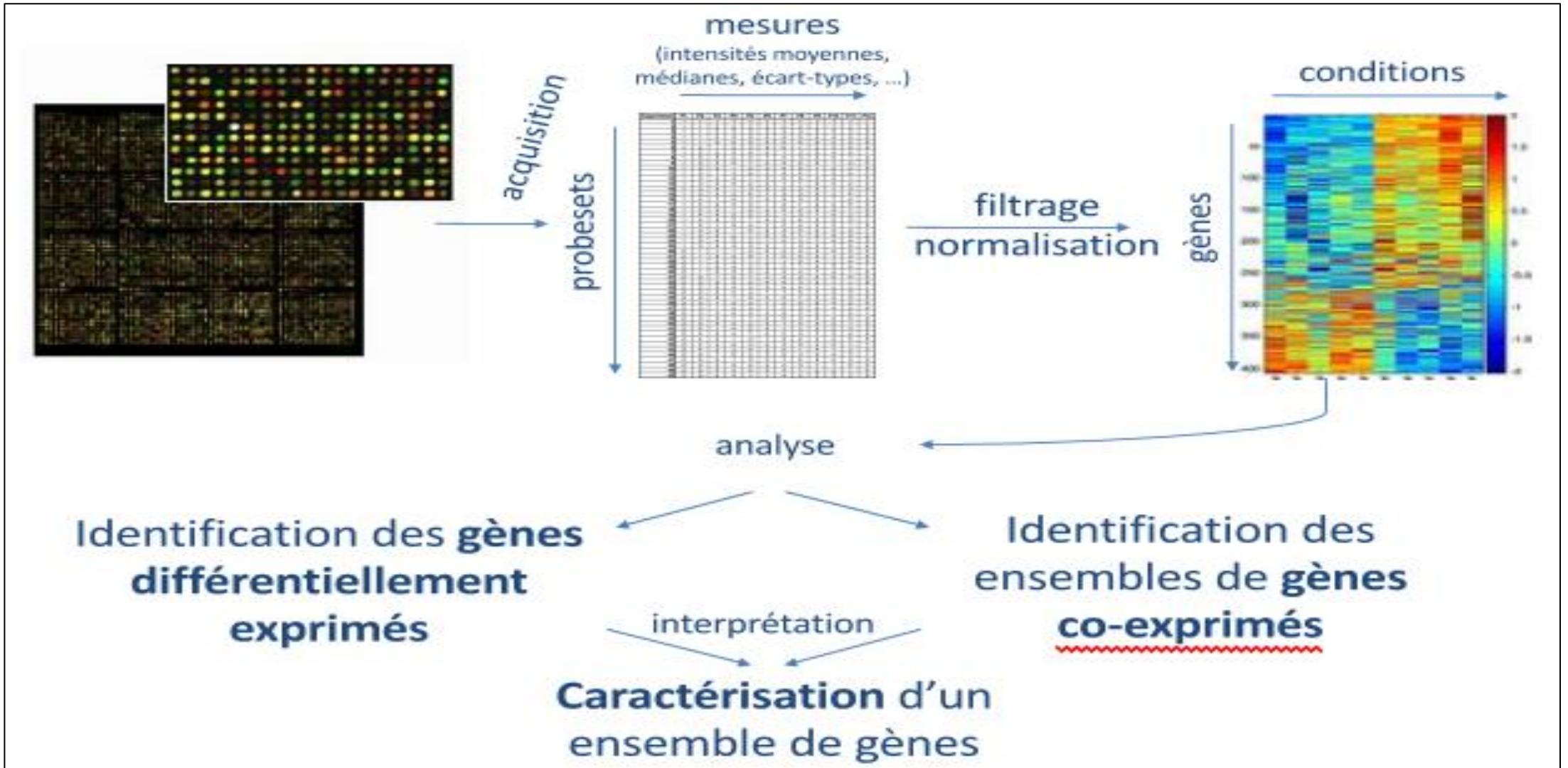
- Analyse et interprétation des profils moléculaires



Cycles d'analyse transcriptomique



Analyse et interprétation des données



Données de transcriptome

- **Accès au niveau d'expression de milliers de gènes simultanément**
 - Intensité de fluorescence par spot
 - Proportionnelle à la quantité d'ADN hybridé
 - abondance relative des transcrits : ratio
(quantification absolue encore difficile)

Mesure du niveau d'expression

- ♦ échantillon 1 = fluorochrome vert (Cy3)
- ♦ échantillon 2 = fluorochrome rouge (Cy5)



2 canaux :

- intensité de vert
- intensité de rouge

- ⚠ 1 spot = ensemble d'oligonucléotides
 - ♦ tous les mêmes
 - ♦ variations de séquence
 - ♦ plusieurs séquences spécifiques d'un gène
- ⚠ des spots différents peuvent correspondre au même gène
- ⚠ un spot peut correspondre à plusieurs gènes

Données de transcriptome

❑ De nombreuses sources d'erreur et de variabilité

- ✓ Variabilité biologique
 - ❖ Population de cellules ou patients/tissus différents
- ✓ Variabilité technique
 - ❖ Étape d'amplification
 - ❖ Incorporation des fluorochromes
 - ❖ Bruit (artefacts, bruit de fond)
 - ❖ Données manquantes (mesures absentes pour certains réplicats)
- ✓ Erreur, exemple : Saturation
 - ❖ du scanner pour les fluorochromes
 - ❖ de la plaque pour la radioactivité
 - ❖ du spot sur la puce

Filtrage

❑ valeurs de (trop) faible intensité

✓ non exprimé ou valeur manquante
(problème sur la puce) ?

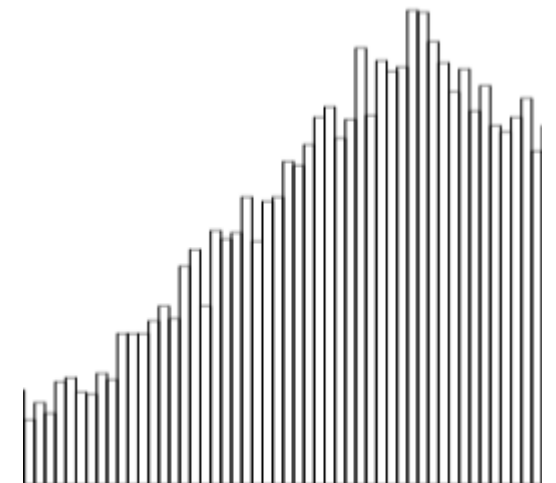
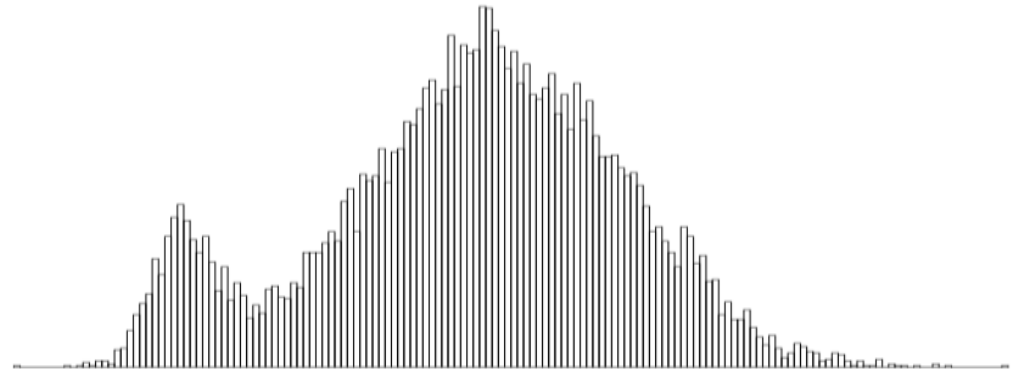
❖ les valeurs dépassant légèrement le bruit de fond
ont plus de chance d'être imprécises ou de
mauvaise qualité

❖ Filtrage : on élimine les valeurs inférieures à

- $I_{\text{médiane du bruit de fond}} + 2 \times \sigma(\text{bruit de fond})$
- $I_{\text{moyenne du bruit de fond}} + 2 \times \sigma(\text{bruit de fond})$

❑ outlier (valeurs aberrantes)

❑ valeurs de trop forte intensité (saturation)



Normalisation

□ Raisons

- ✓ rendre comparables les intensités provenant
 - ❖ des différents canaux d'une même hybridation
 - ❖ de différentes hybridations
- ✓ quantité d'ARN différentes dans les échantillons
- ✓ efficacité de la détection de fluorescence
- ✓ biais systématiques, artefacts

□ Normalisation : transformation des données pour corriger ces effets.

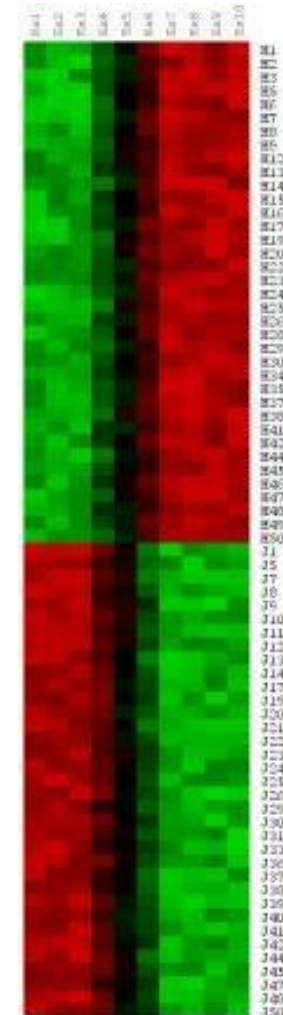
Gènes différentiellement exprimés

□ Raisons

- ✓ Gènes activés (induits) ou inactivés (réprimés) dans certaines conditions expérimentales/environnementales

□ Identification des gènes différentiellement exprimés

- ✓ Fold change
- ✓ Modèles statistiques
- ✓ Modèles probabilistes



Fold-change

- ❑ seuil au-delà duquel un gène est considéré comme différentiellement exprimé
 - ✓ Ex : 2x plus ou 2x moins exprimé
 - ✓ s'écarte de plus de 2x l'écart type
- ❑ Pas un test statistique, pas de niveau de confiance
- ❑ Ne tient pas compte de la variance au sein des réplicats

Modèles statistiques

- Test de Student (t-test)

 - ✓ 2 conditions

- Analyse de variance (ANOVA)

 - ✓ >2 conditions

- Bayésiens, modèles de mélange (mixture models), ...

Test de Student (2 conditions)

□ But : déterminer si un gène est différentiellement exprimé entre 2 conditions

□ Raisons

- ✓ Le niveau d'expression du gène est mesuré dans les 2 conditions en faisant n répétitions

Ex: ex : R_1, R_2, \dots, R_n et G_1, G_2, \dots, G_n

- ✓ Si le gène n'est pas différentiellement exprimé, la moyenne des ratios d'expression du gène vaut 1

- ❖ $\text{moyenne}(R_i) = \text{moyenne}(G_i)$?

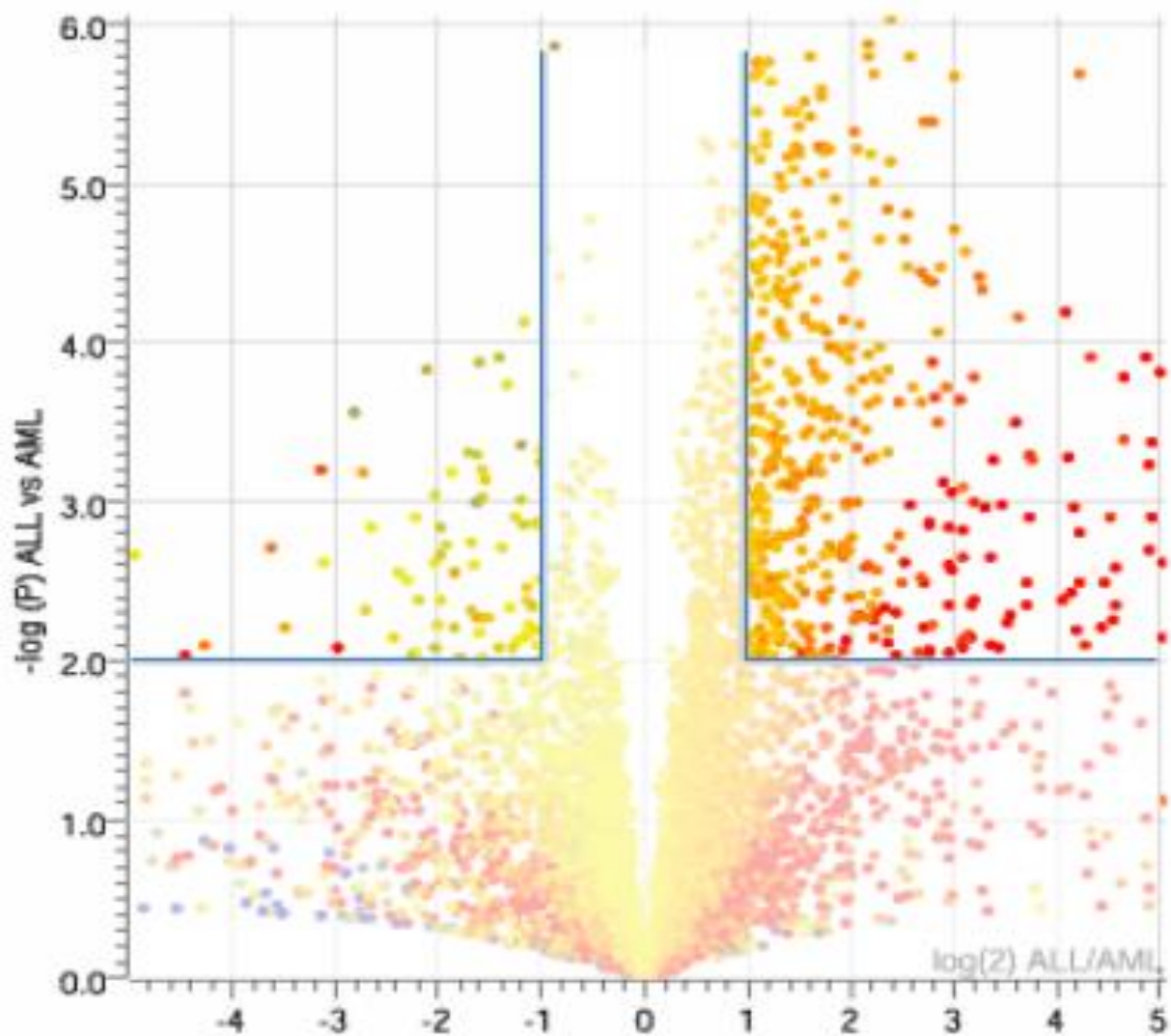
- ❖ two sample t-test permet de déterminer si les valeurs observées proviennent de distributions ayant la même moyenne

Volcano plot

fold change
(variation
d'expression
en abscisses x)

vs.

$-\log(p\text{-valeur})$
(significativité :
t-test
ou autre en
ordonnées y)

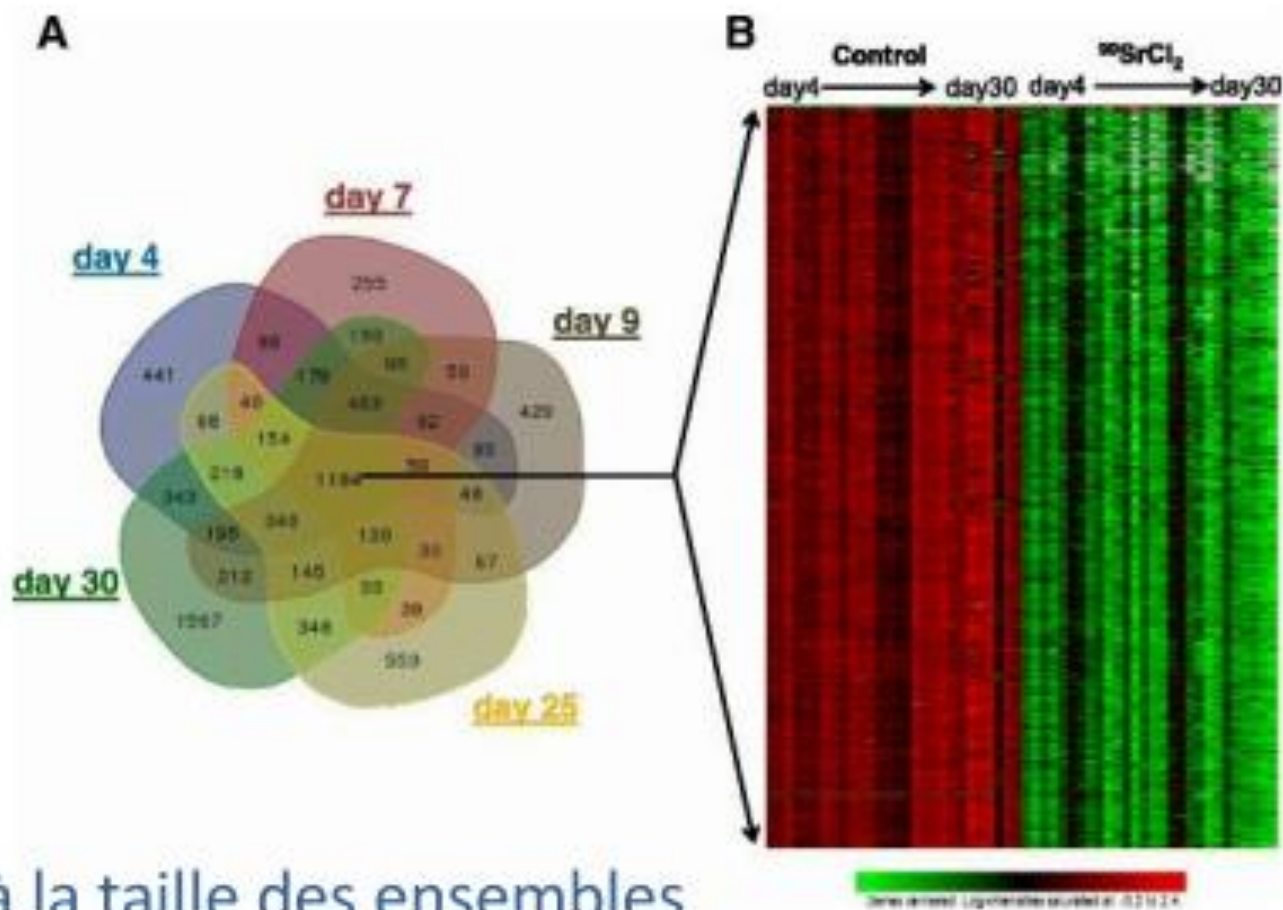
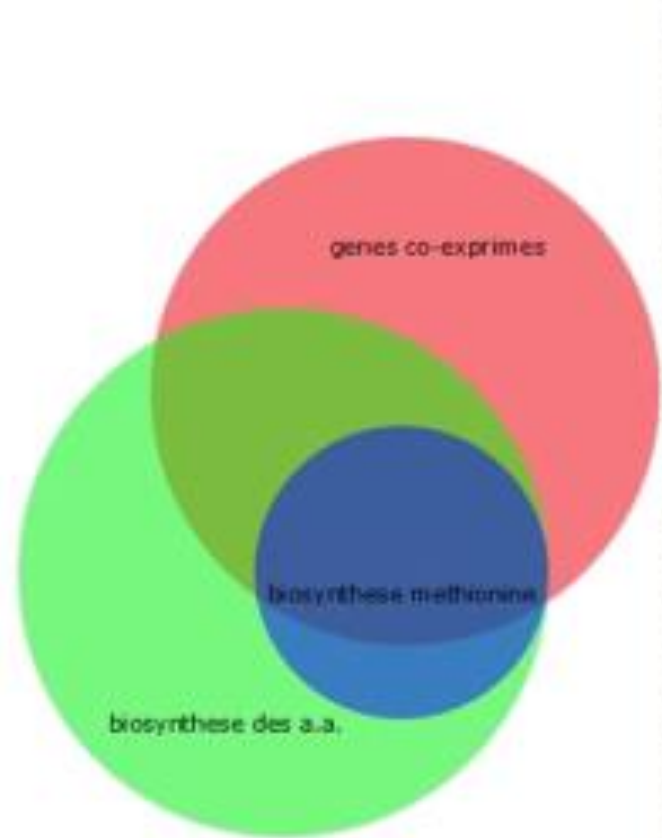


ANOVA (≥ 2 conditions)

- But : déterminer si **un gène** est différentiellement dans (au moins) une des conditions
- Hypothèse testée : les moyennes des niveaux d'expression du gène dans les différentes conditions sont égales
- Autrement dit, H_0 : le gène a le même niveau d'expression dans toutes les conditions

- Mise en œuvre du test sur chaque gène séparément
 - Obtention de la p -valeur
 - Comparaison au seuil α (généralement 0.05)
 - Décision : Acceptation ou rejet de H_0
 - p -valeur $\geq \alpha$: le gène a le même niveau d'expression dans toutes les conditions
 - p -valeur $< \alpha$: le gène a un niveau d'expression différent dans au moins une condition
- Remarque: pour 2 conditions, cela équivaut au t -test

Diagramme de Venn



- Aire proportionnelle à la taille des ensembles
- Chevauchement proportionnel aux gènes communs
- possible pour un petit nombre d'ensembles

Gènes co-exprimés

Raisons : les gènes ayant des profils d'expression similaires sont potentiellement co-régulés et participent à un même processus biologique

But : regrouper les gènes impliqués dans un même processus biologique



Le clustering

Le clustering

- analyse de clustering
 - regroupement des objets en clusters (groupes)
- un cluster : une collection d'objets
 - similaires au sein d'un même cluster
 - dissimilaires aux objets appartenant à d'autres clusters
- classification non supervisée : pas de classes prédéfinies
- Applications typiques
 - afin de mieux comprendre les données
 - comme prétraitement avant d'autres analyses

Principales approches

Partitionnement

- partitionne les objets et évalue les partitions (les ensembles)

- ex: k-means

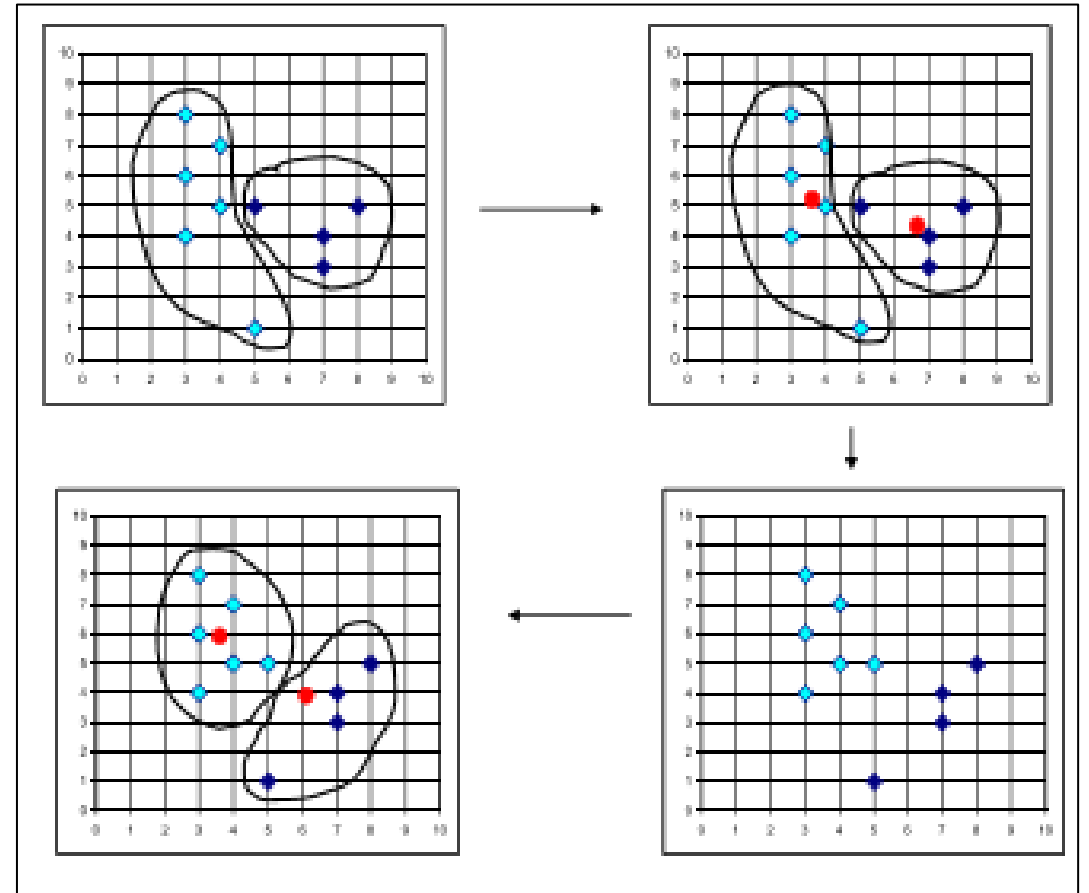
Hiérarchique

- décomposition hiérarchique d'ensembles d'objets

Partitionnement

k-means

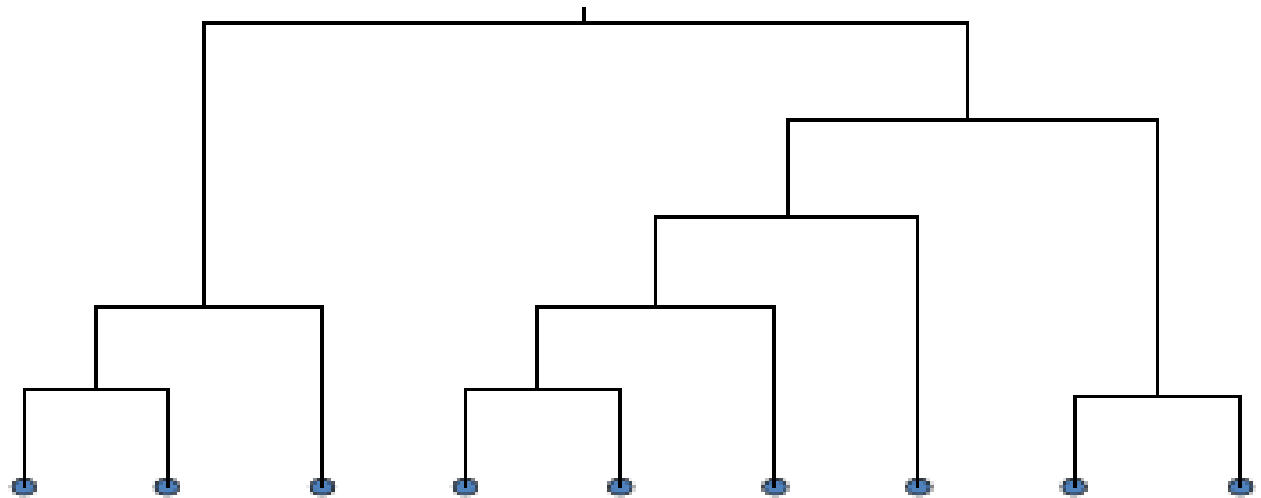
- 4 étapes
 1. Partitionne les objets en k ensembles non vides
 2. Calcule le centroïde de chaque partition/cluster
 3. Assigne à chaque objet le cluster dont le centroïde est le plus proche
 4. refaire à partir de 2 jusqu'à ce les clusters soient stables.



Clustering hiérarchique

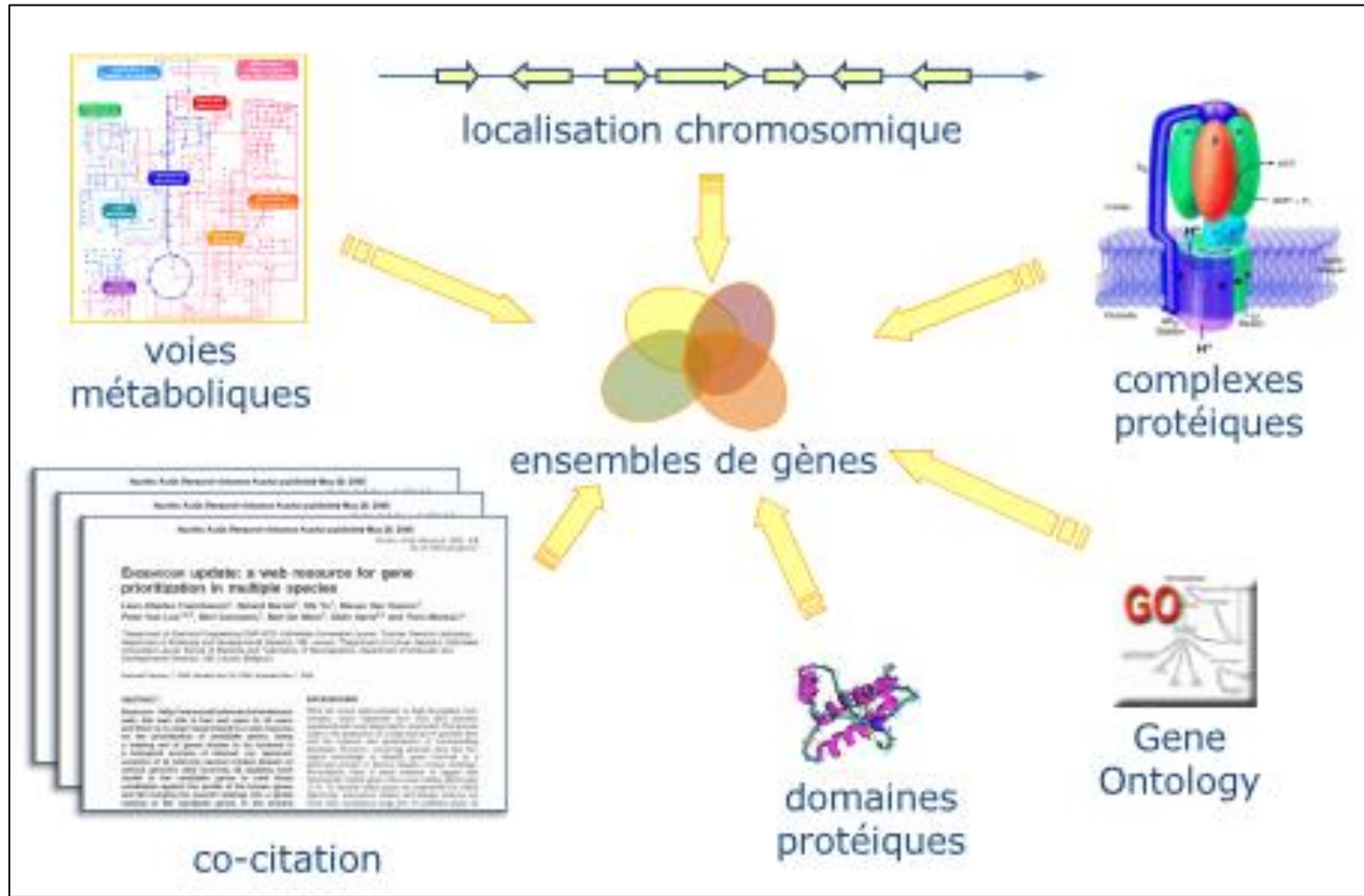
Utilisation d'une matrice de distance : ne nécessite pas de spécifier le nombre de clusters

- Décompose les données en plusieurs niveaux imbriqués de partitionnement
- Un clustering est obtenu en coupant le dendrogramme au niveau choisi



Utilisation de Sources de données

Donner un sens biologique à vos données



KEGG Pathways

Classification de processus biologiques

1. Metabolism

Carbohydrate Metabolism

Glycolysis / Gluconeogenesis Citrate cycle (TCA cycle)

...

2.

...

2. Genetic Information Processing

3. Environmental Information Processing

4. Cellular Processes

5. Human Diseases

6. Drug Development

Mots-clés Uniprot/Swissprot

à chaque mot-clé correspond un ensemble de protéines annotées avec ce mot-clé

```
DR EMBL; M73748; AAA39866.1; -; mRNA.
DR EMBL; M96645; AAA37724.1; -; mRNA.
DR EMBL; AJ250246; CAB58997.1; -; mRNA.
DR EMBL; AJ297944; CAC16152.1; -; mRNA.
DR EMBL; AY115493; AAM66761.1; -; Genomic_DNA.
DR EMBL; AK158855; BAE34695.1; -; mRNA.
DR EMBL; BC026551; AAH26551.1; -; mRNA.
DR Ensembl; ENSMUSG00000028583; Mus musculus.
DR KEGG; mmu:14726; -.
DR MGI; MGI:103098; Podpn.
DR ArrayExpress; Q62011; -.
DR RSPD-ProtExp; IOM20239; -.
DR GO; GO:0030175; C:filopodium; IDA.
DR GO; GO:0030027; C:lamellipodium; IDA.
DR GO; GO:0005886; C:plasma membrane; IDA.
DR GO; GO:0001726; C:ruffle; IDA.
DR GO; GO:0000902; F:cellular morphogenesis; IDA.
DR GO; GO:0030324; F:lung development; IMP.
DR GO; GO:0001946; F:lymphangiogenesis; IMP.
DR GO; GO:0051272; F:positive regulation of cell motility; IDA.
DR InterPro; IPR008783; Podoplanin.
DR PANTHER; PTHR16861; Podoplanin; 1.
DR Pfam; PF05808; Podoplanin; 1.
KW Cell shape; Developmental protein; Direct protein sequencing;
KW Glycoprotein; Membrane; Sialic acid; Signal; Transmembrane.
FT SIGNAL 1 22 Potential.
FT CHAIN 23 172 Podoplanin.
FT /FTId=PRO_0000021352.
FT TOPO_DOM 23 141 Extracellular (Potential).
FT TRANSMEM 142 162 Potential.
FT TOPO_DOM 163 172 Cytoplasmic.
.....
FT CONFLICT 29 31 EDD -> KNN (in Ref. 2).
FT CONFLICT 38 39 GD -> EN (in Ref. 1).
SQ SEQUENCE 172 AA; 18233 MW; C035ED251918CE6F CRC64;
MWTVPVLEFW LGSVWFWSA QGGTIGVNE DVIPTGTGDG MVPPGIEDKI TTTGATGGLN
ESTGKAPLVE TQRRERGTKPP LEELSTSATS DHDHREHST TTVKVVTSMS VDKKTSHPNR
DNAGDETQTT DKKDGLPVVT LVGIIIVGVL AIGFVGGIFI VVMKKISGRF SP
```

//

InterPro: EMBL-EBI

InterPro intègre les principales banques de domaines (Pfam, ProSite, SMART) à un domaine correspond un ensemble de protéines

EMBL-EBI EB-eye Search All Databases Enter Text Here Go Reset Advanced Search Give us feedback

Databases Tools EBI Groups Training Industry InterPro Site Index

EBI > Databases > InterPro

Jump to: [InterProScan](#) [Databases](#) [Documentation](#) [ETP site](#) [Help](#) [Advanced search](#)

Search InterPro:

InterPro: IPR000254 Cellulose-binding region, fungal

Protein matches

UniProtKB Matches: 504 proteins

Overview: [sorted by AC](#), [sorted by name](#), [of known structure](#), [proteins with splice variants](#)

Detailed: [sorted by AC](#), [sorted by name](#), [of known structure](#), [proteins with splice variants](#)

Table: [For all matching proteins](#), [of known structure](#)

[Architectures](#)

[Accession List](#)

Accession IPR000254 CBD_fun

Type Domain

Database	ID	Name	Proteins
Pfam	PF00734	CBM_1	487
PROSITE pattern	PS00562	CBM1_1	417
PROSITE profile	PS51164	CBM1_2	480
SMART	SM00236	ICBD	454
SuperFamily	SSF57180	CBD_fun	485

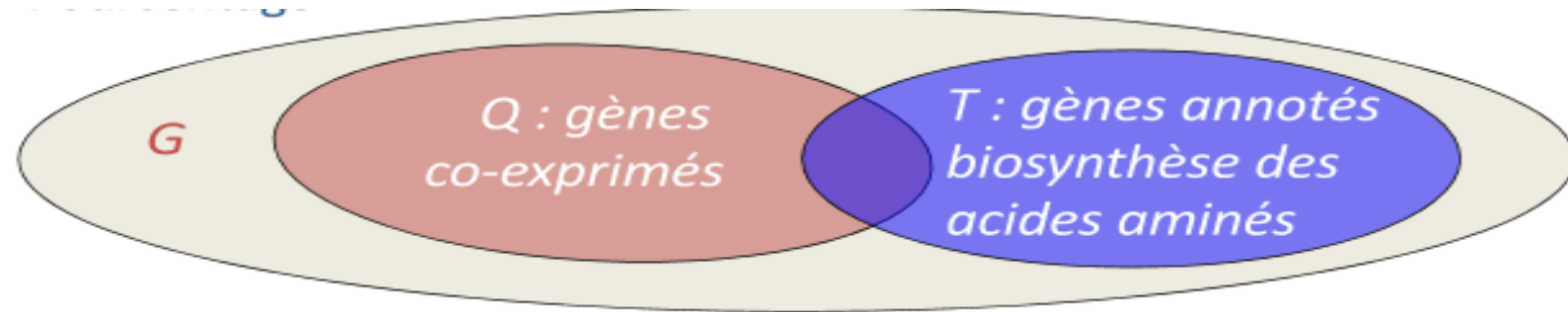
Signatures

GO Term annotation

Process	GO:0005975 carbohydrate metabolic process
Function	GO:0004553 hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds GO:0030248 cellulose binding
Component	GO:0005576 extracellular region

Test de surreprésentation

Loi binomiale
 χ^2
Pourcentage



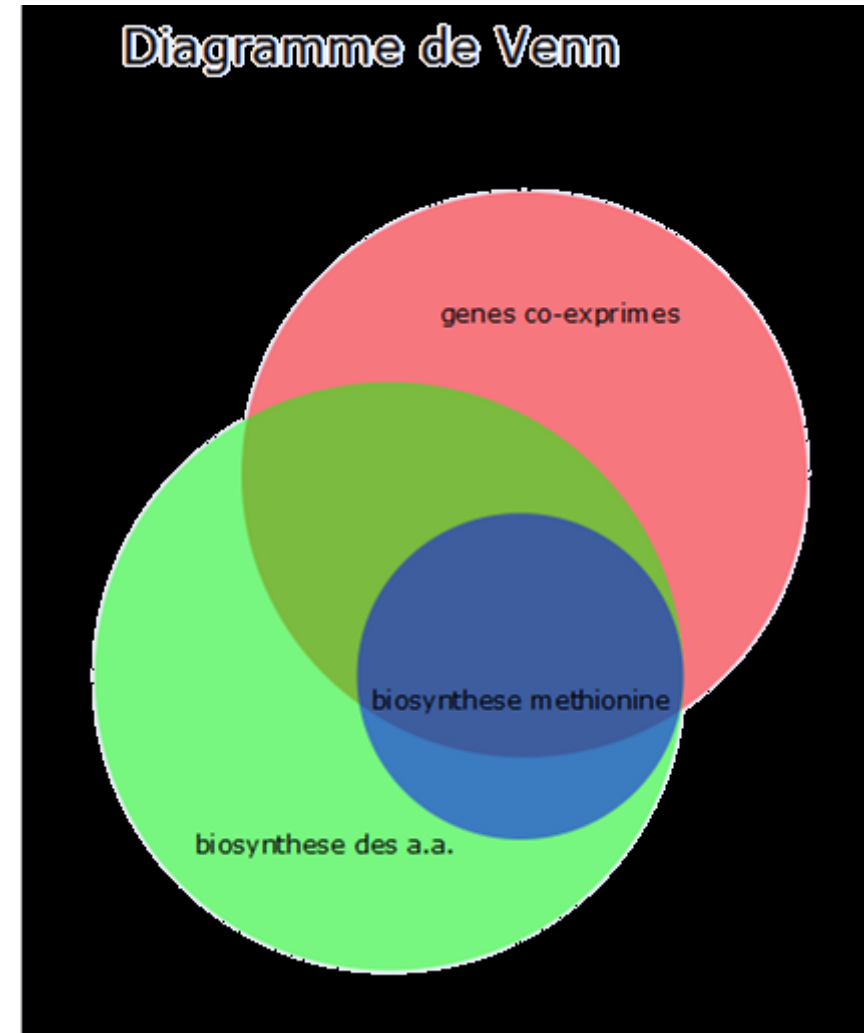
Loi binomiale : probabilité d'avoir au moins le nombre d'éléments communs observé entre 2 échantillons (tirés aléatoirement avec remise) issus d'une même population

Autrement dit, la fréquence de gènes annotés biosynthèse des acides aminés dans les gènes co-exprimés est-elle supérieure à celle dans le génome de référence?

Visualisation

Diagramme de Venn

- ❑ Aire proportionnelle à la taille des ensembles
- ❑ Chevauchement proportionnel aux gènes communs
- ❑ possible pour un petit nombre d'ensembles



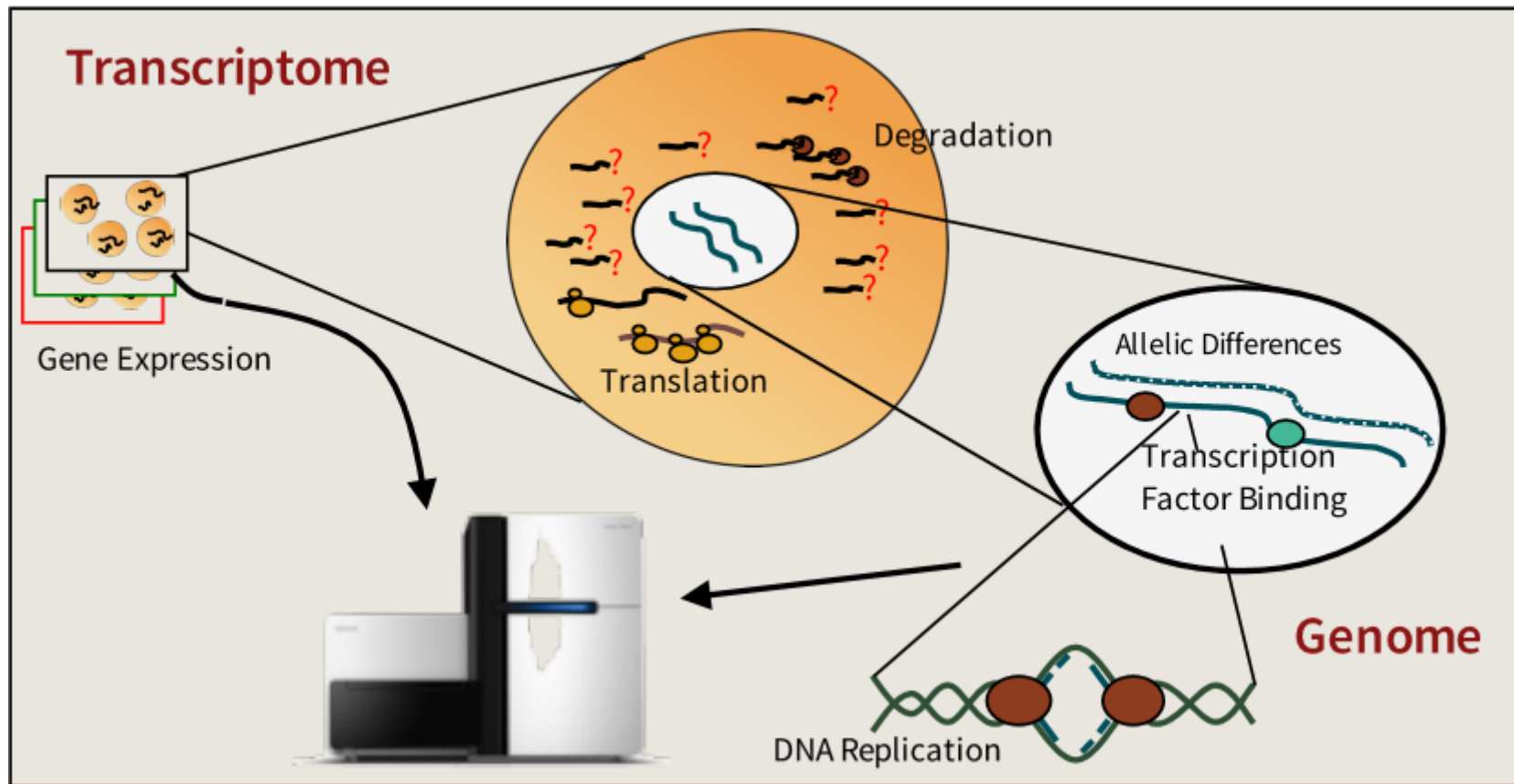
Communauté, standards et banques de données

- Microarray Gene Expression Data (MGED) society
- MIAME (Minimum Information About a Microarray Experiment)
 - interprétation non ambiguë
 - reproductibilité
- MGED (MicroArray Gene Expression Data)
 - MAGE-ML (Markup Language): format d'échange
 - MAGE-OM (Object Model)
 - MGED Ontology: vocabulaire contrôlé
- Entrepôts
 - GEO (Gene Expression Omnibus) au NCBI
 - ArrayExpress
 - SMD (Stanford Microarray Database)

RNAseq

RNAseq

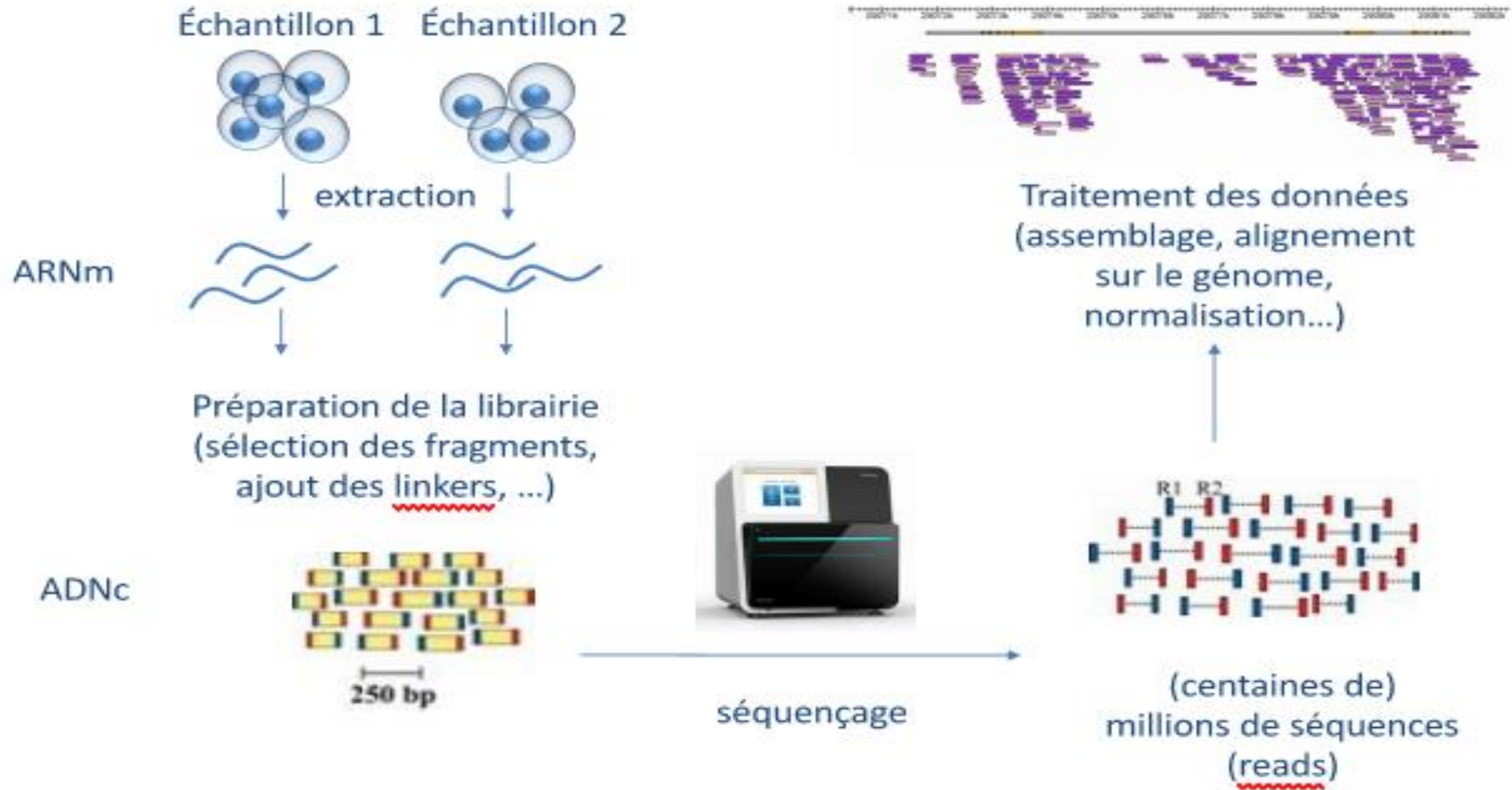
- 1. Qu'est-ce que ARN-Seq?**
 - a. Comment générer les bibliothèques de séquences?**
 - b. Comment analyser les données de séquençage?**
- 2. Comment regrouper (clusters) les données d'expression?**



ARN-seq

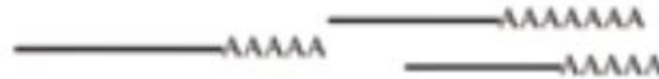
- Plusieurs investigations possibles avec RNAseq
 - Evaluer l'expression différentielle entre deux ou plusieurs conditions
 - Permet de découvrir des sites d'épissage
 - Cartographie UTR 5' et 3'
 - Expression spécifique d'allèles
 - Facteur de transcription obligatoire
 - Découverte de nouveaux transcrits
 - Découverte de nombreuses isoformes de transcrits ...

Acquisition des données (RNAseq)



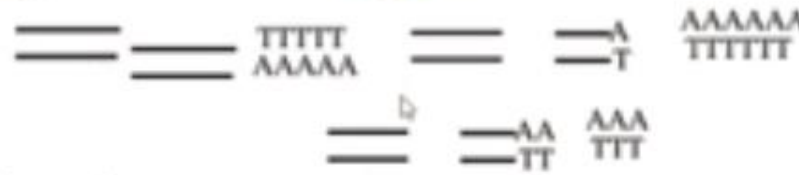
Comment produire les librairies?

extraction of poly-A RNAs



PolyA purification

conversion into ds-cDNA
and shearing



cDNA generation
& fragmentation

amplification and
adapter ligation

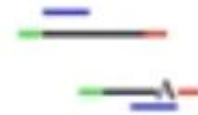


Library construction

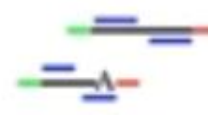
Size selection

sequencing

single end (SET)



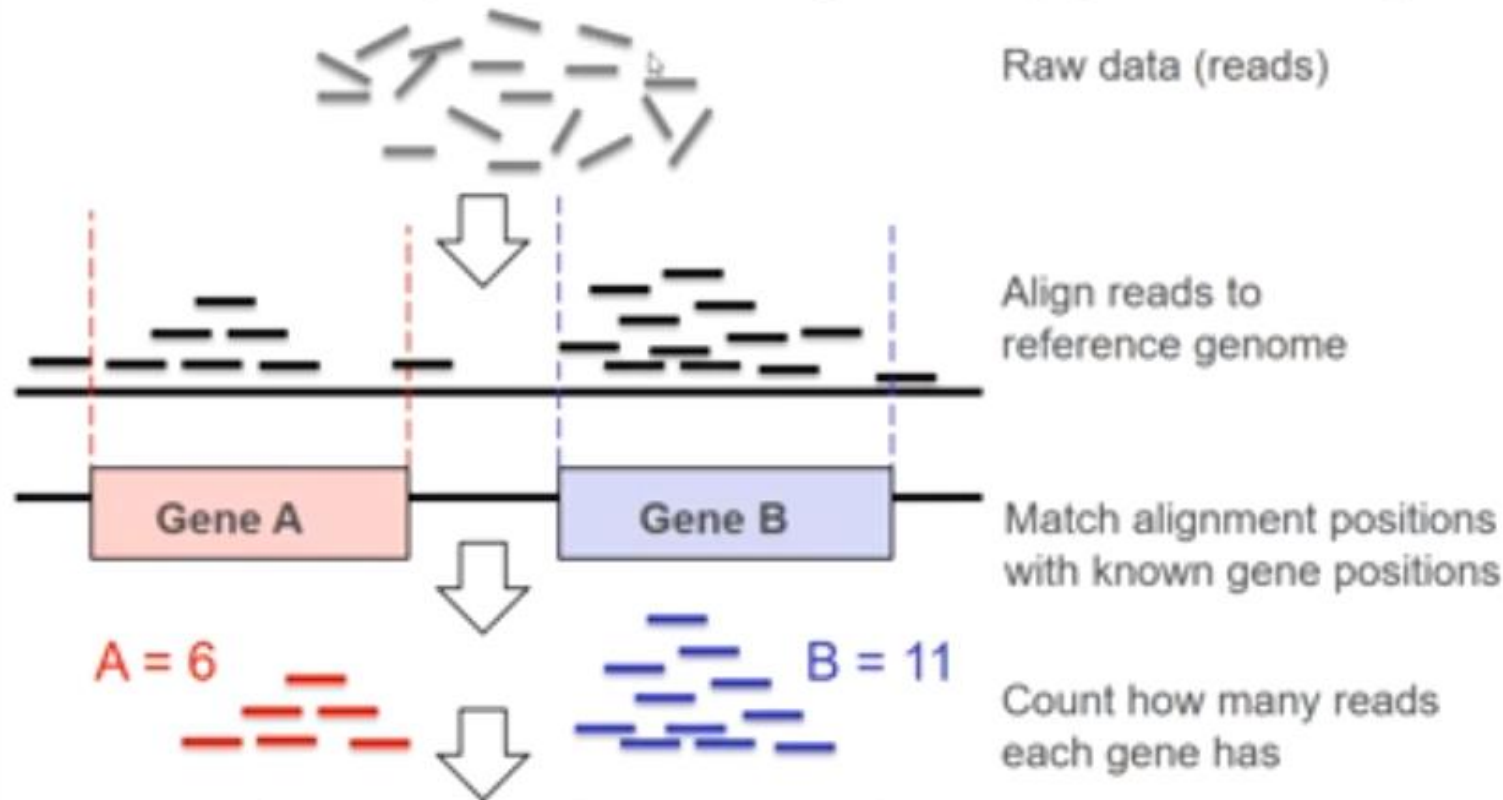
paired-end (PET)



Que faire avec les données ?

- Les données sont de courtes (50-100bp) lectures séquentielles de morceaux de transcriptions
- L'objectif est de trouver l'abondance de chaque transcription
 - Cartographier les fragments de lectures sur le génome
 - Déterminer quel est le transcrit du gène qui a généré la séquence lue
 - Pour chaque gène, compter combien de lectures correspondent à ce gène
 - Normaliser le nombre de copies en fonction de la longueur de gène
 - Parce qu'un gène plus long aura plus de fragments lus qu'un gène plus court, même s'il est exprimé exactement au même niveau
 - Normaliser le nombre de copies par le nombre total de fragments de lectures cartographiées
 - Pour que vous puissiez comparer les différentes expériences

Analyses des données de RNAseq: Expression différentielle



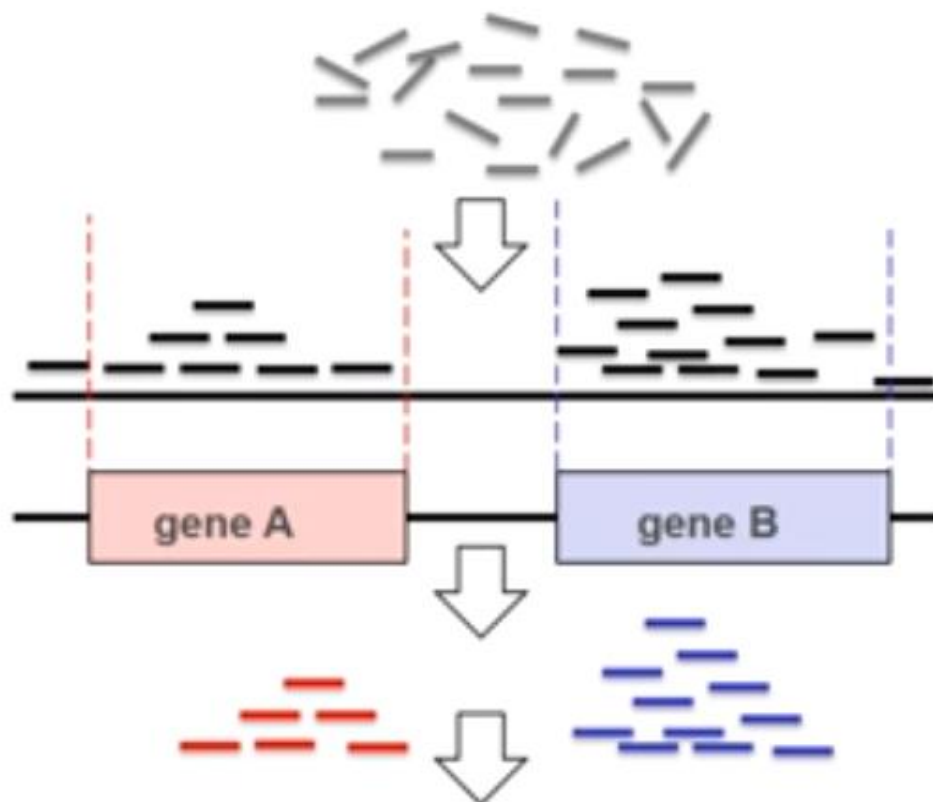
	Control 1	Control 2	Control 3	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Gene A	6	5	7	170	100	110
Gene B	11	11	10	3	4	2
Gene C	200	150	355	50	1	3
Gene D	0	1	0	2	0	1

Compare sample groups:
differential expression
analysis



Ac
Acc

Analyses des données de RNAseq: Etapes, outils et Fichiers



	Control 1	Control 2	Control 3	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Gene A	6	5	7	170	100	110
Gene B	11	11	10	3	4	2
Gene C	200	150	355	50	1	3
Gene D	0	1	0	2	0	1

STEP	TOOL	FILE
Quality control	FastQC	FASTQ
Pre-processing	Trimmomatic	FASTQ
Alignment	HISAT2	BAM
Quality control	RSeQC	
Quantitation	HTSeq	Read count file (TSV)
Combine count files to table	Define NGS experiment	Read count table (TSV)
Quality control	PCA, clustering	
Differential expression analysis	DESeq2, edgeR	Gene lists (TSV)

CSC

Act...
Acc... paramètres pour activer Windows.

Schéma analytique des données de RNA-seq

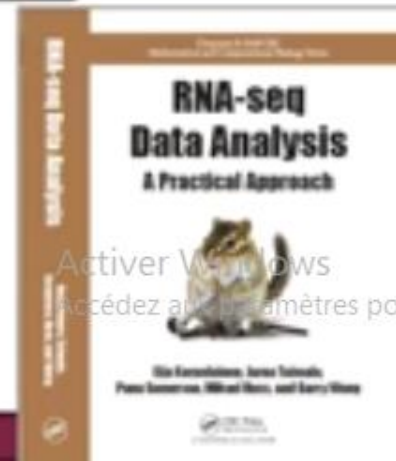
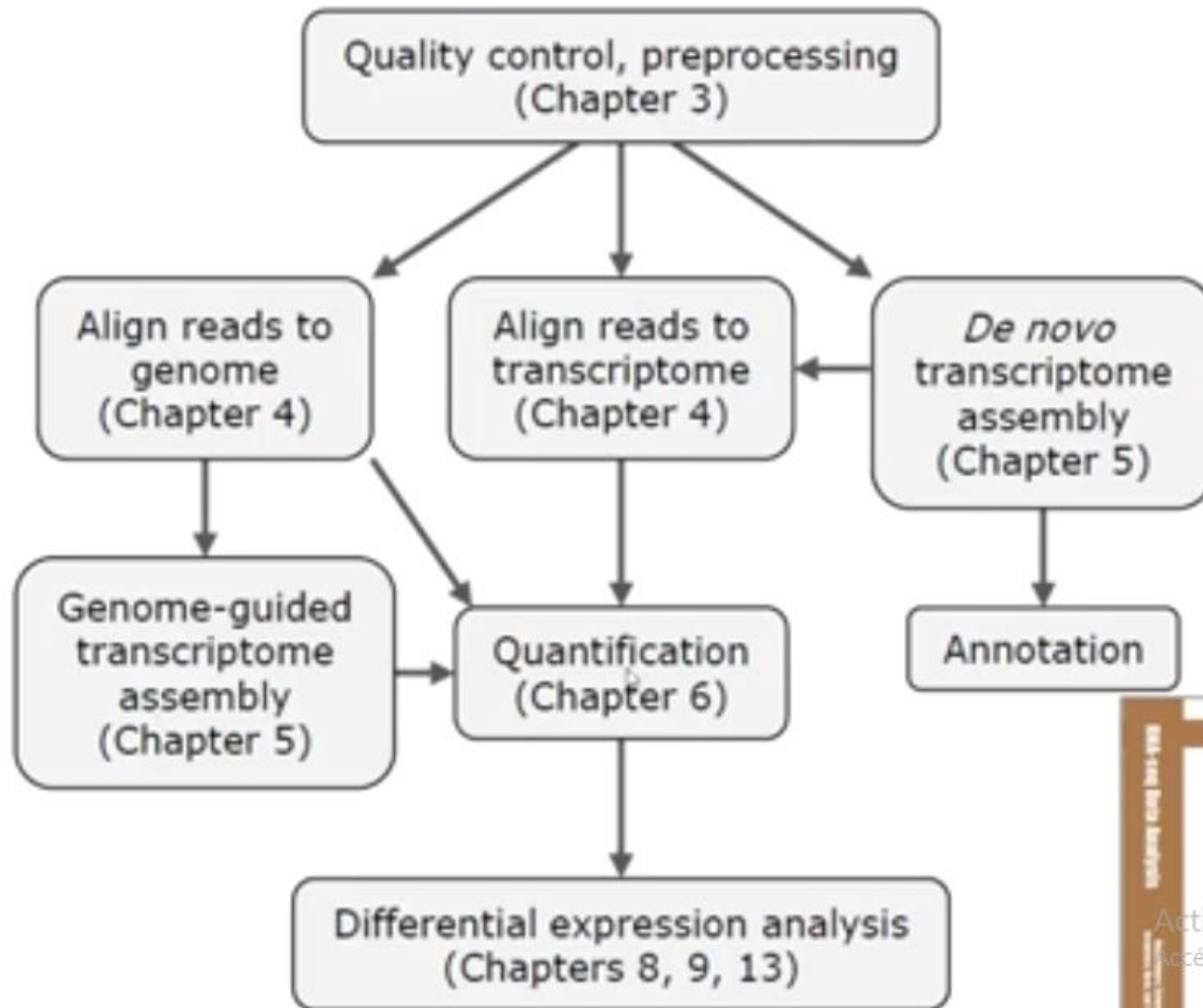


Schéma analytique des données de RNAseq

- 1. Contrôle de qualité de données brutes (Read)**
- 2. Prétraitement des données (si nécessaire): Trimming par exemple**
- 3. Alignement au génome de référence**
- 4. Contrôle de qualité de l'alignement**
- 5. Quantification (comptage du nombre de reads)**
- 6. Contrôle de qualité de l'expérience**
- 7. Analyse différentielle**
- 8. Visualisation des reads et des données des résultats analytiques**

Real Time Quantitative PCR

qRT-PCR

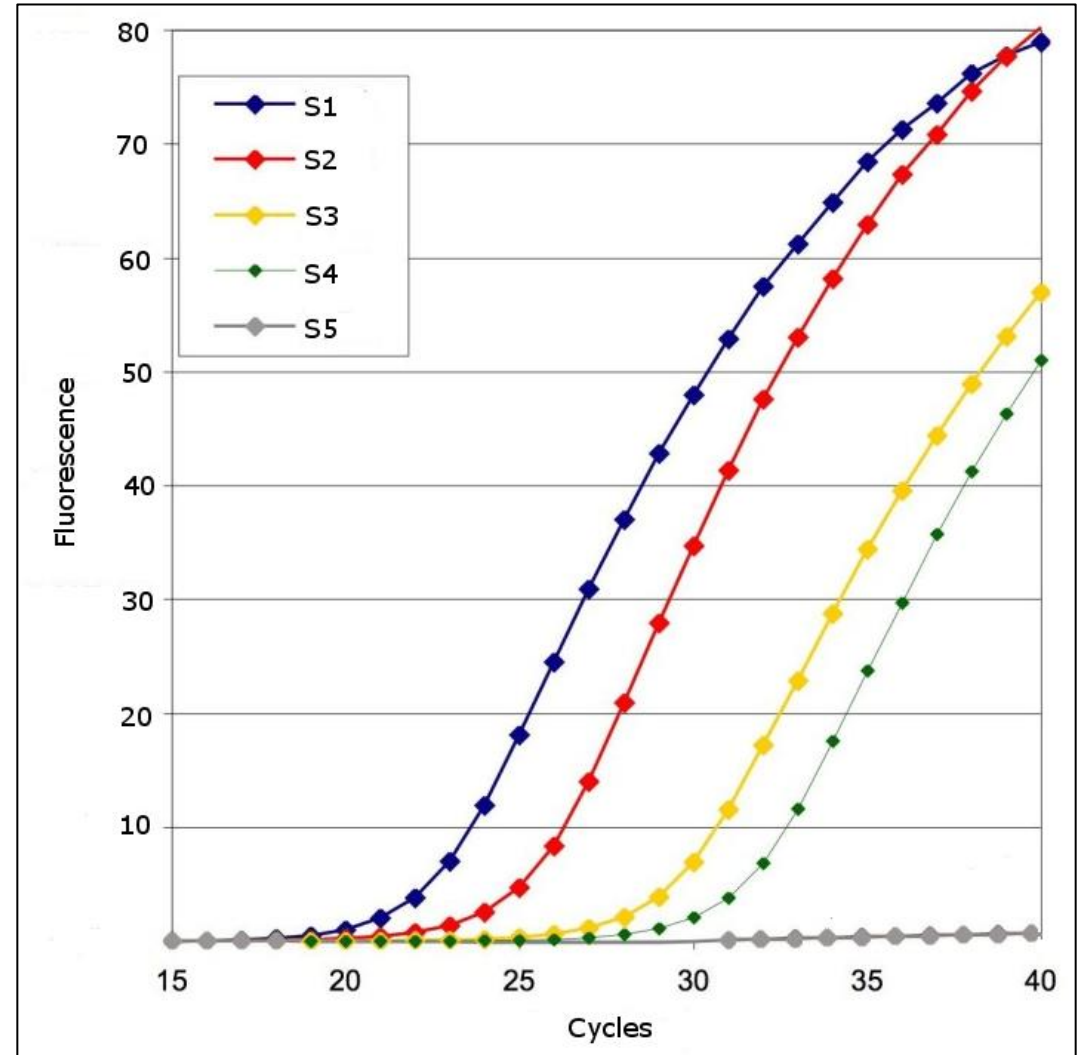
- La qRT-PCR est une technique largement utilisée pour l'analyse de l'expression des gènes. L'estimation précise de l'abondance des transcrits repose fortement sur une normalisation qui nécessite l'utilisation de gènes de référence qui sont exprimés de manière stable dans les conditions analysées.
- Si la qRT-PCR est utile pour quantifier l'expression de quelques gènes, elle ne peut détecter que des séquences connues

qRT-PCR workflow

- Retranscription de l'ARN en ADN (également appelé ADN complémentaire ou ADNc)
- Amplification par PCR en temps réel
 - Marquage de l'ADN amplifié par fluorescence (généralement avec des colorants fluorescents à base de cyanine)
 - La quantité de fluorescence libérée pendant l'amplification est directement proportionnelle à la quantité d'ADN amplifié. La fluorescence est surveillée tout au long du processus de PCR (tout au long des 30 à 45 cycles)
 - Plus le nombre initial de molécules d'ADN dans l'échantillon est élevé, plus la fluorescence augmentera rapidement au cours des cycles de PCR.

qRT-PCR workflow et principes

- En d'autres termes, si un échantillon contient plus de cibles, la fluorescence sera détectée au cours des cycles précédents. Le cycle nombre pendant lequel la fluorescence peut être détectée est appelé cycle de quantification (Cq en abrégé) et est le résultat de base de la qPCR : des valeurs Cq plus faibles signifient un nombre initial de copies plus élevé de la cible. C'est le principe de base de l'approche quantitative que fournit la PCR en temps réel.



qRT-PCR workflow et principes

- Le signal fluorescent pendant la réaction PCR, est quantifiable et directement proportionnel à la quantité initiale d'ADN
- **La figure 2** montre le tracé d'amplification avec cinq échantillons (S1 à S5).
- Dans l'exemple ci-dessus, **l'échantillon S1** contenait le nombre initial le plus élevé d'ADN cible, ce qui a entraîné l'augmentation la plus rapide de la fluorescence. **L'échantillon S4** contenait le nombre initial le plus faible de molécules d'ADN cible, tandis que **S5** n'en contenait aucune.

