

La PCR quantitative : un nouvel outil pour l'analyse médicale

Jean Peccoud

Depuis 1988, des méthodes de mesure quantitative de l'ADN et de l'ARN ont été décrites, à partir d'une amplification par PCR. La quantification du produit est le premier problème à résoudre, la reproductibilité et l'étalonnage sont critiques du fait de la très grande sensibilité de cette technique. L'ajout d'une référence interne ou externe, la plus proche possible du produit à mesurer, est indispensable. Des méthodes sont en plein développement, telles que quantification par compétition et immuno-PCR, qui permettent d'envisager que la PCR quantitative devienne une méthode de mesure de routine clinique.

Initialement mise au point à des fins de diagnostic [1, 2], la *polymerase chain reaction* (PCR), que l'on peut traduire en français par « réaction de polymérisation en chaîne », s'est progressivement imposée comme un des outils essentiels du biologiste moléculaire (*m/s* n° 8, vol. 4, p. 515). Elle procède par cycles de température, chaque cycle pouvant être décomposé en trois étapes. La fusion, ou dénaturation, s'effectue à une température supérieure à 90° C et permet d'obtenir des matrices d'ADN simple brin. L'hybridation suit à une température nettement plus basse qui dépend beaucoup de l'expérience. Au cours de cette étape, les oligonucléotides de synthèse qui délimitent la séquence à amplifier s'apparient à la matrice simple brin. La température de cette étape doit être calculée précisément afin d'éviter les hybridations non spécifiques. Au terme de cette étape, des amorces de polymérisation sont formées. Elles pourront être complétées au cours de l'étape suivante, dite d'élongation, dont la température est généralement d'environ 72° C; c'est ainsi que s'achève un cycle au cours duquel la quantité d'ADN a pratiquement doublé. La disponibilité d'ADN polymérases thermorésistantes permet d'enchaîner plusieurs dizaines de ces cycles. C'est cet enchaînement lui-même que l'on nomme PCR. De très nombreuses autres applications ont été trouvées à la PCR. En fournissant de grandes quantités d'ADN à partir de petits échantillons biologiques, elle

permet de caractériser certaines séquences génomiques d'un intérêt particulier. Grâce à cette méthode, il est possible de séquencer de petits fragments génomiques sans devoir passer par une étape de clonage préalable. De ce fait, la PCR s'est affirmée comme un moyen privilégié de diagnostic des maladies d'origine génétique. La faible quantité de matériel nécessaire à l'amplification permet, par exemple, de procéder à un diagnostic sur un foetus issu de fécondation *in vitro* avant son implantation. La PCR a permis de proposer des méthodes nouvelles de typage HLA, fondées non plus sur des spécificités antigéniques mais directement sur la détection, par hybridation d'oligonucléotides, des séquences des différents haplotypes. Enfin, les méthodes d'identification génétique ont beaucoup progressé grâce à la PCR [3, 4].

Par ailleurs, la PCR est venue renouveler quelques-unes des techniques de base de la biologie moléculaire. De nouveaux protocoles de mutagenèse dirigée, de séquençage, de clonage, etc. nécessitant une étape d'amplification enzymatique ont vu le jour et se sont révélés particulièrement puissants.

A côté de ces applications, déjà largement répandues, émerge, plus lentement, un nouveau domaine: celui de la PCR dite quantitative. Sous certaines conditions, il est en effet possible de relier la quantité d'ADN produite par amplification à la quantité présente initialement, dans le milieu réactionnel. Du fait

Jean Peccoud

TIMC-IMAG, URA Cnrs D 1618,
faculté de médecine de Grenoble,
38700 La Tronche, France.

TIRÉS A PART

J. Peccoud.

de la très grande sensibilité de la procédure, il y a au moins une possibilité théorique d'un dosage de quantités très faibles d'ADN par PCR. Toutefois, du fait même de cette grande sensibilité, de nombreux problèmes surgissent lors de la réalisation du dosage ; de faibles variations des conditions expérimentales provoquent de faibles variations du rendement de l'amplification qui se traduisent par de grandes fluctuations de la quantité finale d'ADN produite par l'amplification. Il y a donc un problème de reproductibilité et d'étalonnage de ces dosages fondés sur une réaction en chaîne. En fait, la mise au point d'un dosage par PCR est un domaine de recherche très actif ; l'activité déployée dans cette direction est justifiée par l'étendue des applications possibles en recherche fondamentale et surtout en analyse médicale. La PCR prend de plus en plus d'importance comme outil de diagnostic. La maîtrise du dosage par PCR étendrait encore considérablement le champ des applications cliniques de cette méthode. Ses enjeux économiques expliquent l'intensité des efforts de recherche et de développement déployés par d'importants acteurs industriels autour de la quantification des produits de PCR et de l'automatisation de la procédure.

Principe

Au cours d'un cycle de PCR, chaque molécule est susceptible de se dupliquer. Le rendement, ou taux d'amplification, noté r , est la proportion moyenne des molécules se dupliquant au cours d'un cycle. L'expérience montre que cette proportion est souvent élevée, typiquement d'environ 80 % à 90 %. Le nombre initial de molécules de type X dans la solution est noté X_0 et, plus généralement, X_n est le nombre de molécules de type X présentes dans le milieu réactionnel à l'issue du n^{e} cycle. Après le premier cycle d'amplification, toutes les molécules initialement présentes sont toujours là et une fraction r

d'entre elles a donné une descendance d'une molécule ; cela s'exprime par :

$$(1) X_1 = X_0 + rX_0 = X_0(1+r).$$

Le même raisonnement s'applique au deuxième cycle :

$$(2) X_2 = X_1(1+r) = X_0(1+r)^2.$$

Plus généralement, la relation suivante décrit la manière dont évolue le nombre de molécules au cours des différents cycles d'amplification :

$$(3) X_n = X_0(1+r)^n.$$

De cette première relation en découle une seconde sur laquelle repose la possibilité d'étalonner un dosage par amplification. Si Y est une seconde séquence amplifiée dans les mêmes conditions que X , de telle sorte que le taux d'amplification de Y puisse être supposé égal à celui de X , il vient :

$$(4) \frac{X_n}{Y_n} = \frac{X_0}{Y_0}.$$

Le rapport des deux quantités reste donc constant au cours de l'amplification. Si Y_0 est connu, il est possible d'en déduire X_0 sans connaître le taux d'amplification.

En réalité, cette croissance de la quantité des produits de l'amplification n'est observée que pendant les premiers cycles. Au bout d'un certain temps, la croissance se ralentit et la quantité des produits tend vers une limite. C'est le « plateau » de l'amplification. La quantification est possible dans la phase de croissance exponentielle en vertu de la relation linéaire suivante déduite de l'égalité (3) :

$$(5) \text{Log}(X_n) = \text{Log}(X_0) + n\text{Log}(1+r).$$

Quantification

Si le principe sur lequel repose le dosage est unique, la mise en œuvre d'un dosage est possible selon différentes modalités. Une méthode de mesure de la quantité d'ADN, et généralement une méthode de séparation, doivent être choisies. Le type d'observation peut aussi varier. La mesure de la quantité d'ADN peut être faite à la fin de l'amplification ou à plusieurs reprises au cours de l'amplification. Dans tous les cas, un étalonnage de la méthode par rap-

port à une référence de quantité connue est nécessaire. Un point important doit aussi être souligné. La limite inférieure de sensibilité — la quantité minimale détectable par une méthode — est habituellement un facteur critique dans l'étude de séquences rares (séquences génomiques, ARN messagers). Pour la détection de produits d'amplification en vue d'un dosage, la limite de sensibilité d'une méthode de séparation-quantification est un critère secondaire. Un produit de PCR n'est jamais rare puisqu'il suffit d'adapter le nombre de cycles d'amplification à la quantité initiale de la séquence étudiée. Pratiquement, il est toujours possible de trouver des conditions permettant d'obtenir des quantités de l'ordre du microgramme des séquences amplifiées. En revanche, une attention particulière doit être portée à l'étendue de la gamme de concentration sur laquelle une méthode de quantification est reproductible et linéaire ; la précision du dosage en découle.

La séparation des produits n'est pas forcément nécessaire dans le cas de l'amplification d'une séquence unique et certains protocoles se dispensent de cette étape [5, 6]. Toutefois, très couramment, les protocoles comportent une phase de séparation qui permet de vérifier que l'amplification a été spécifique ou de séparer les produits de l'amplification de différentes séquences cibles. La méthode de séparation la plus classique pour les fragments d'ADN est l'électrophorèse sur gel d'acrylamide ou d'agarose. L'ADN peut être coloré par le bromure d'éthidium et analysé par des techniques de spectroscopie performantes [7, 8] ; la limite de détection de ces techniques est de l'ordre du nanogramme. De nouvelles colorations ont même été récemment mises au point en vue d'une quantification précise de petites quantités. Par exemple, le couplage d'une des amorces de la PCR à un agent chélatant de l'ion Eu^{3+} permet d'obtenir une fluorescence ayant un fort rapport signal/bruit bien adapté à une

quantification précise [9]. Sa limite de sensibilité se situe autour de 5 ng.

L'usage de radio-isotopes est très répandu. L'amplification peut être conduite dans un milieu contenant un des nucléotides marqué au ^{32}P [10-12]; le signal est, dans ce cas, proportionnel à la longueur de la cible. Les oligonucléotides amorces peuvent aussi être marqués par kination [13]. Après migration, le gel est exposé contre un film d'autoradiographie et l'intensité du signal estimée à l'œil ou mesurée par densitométrie [11]. Il est aussi possible d'exciser les bandes et de mesurer leur radioactivité par scintillation [11]. L'utilisation de plaques au phosphore et des outils radiologiques numériques diminue les temps d'exposition d'un facteur 50, permet d'étendre la zone de linéarité à quatre ordres de grandeur, de traiter et d'analyser les signaux enregistrés [12].

Le marquage froid des amorces se révèle d'un intérêt particulier en vue de la généralisation du dosage par PCR. De nombreux protocoles ont été mis au point. Le couplage d'une amorce à la fluorescéine permet l'utilisation d'un séquenceur automatique [14]. La très grande spécificité des interactions biotine-streptavidine permet d'imaginer de nouvelles méthodes de séparation. Il est, par exemple, possible d'utiliser deux amorces dont l'une est marquée à la biotine et l'autre à la fluorescéine. Les produits de l'amplification sont séparés au moyen de billes magnétiques recouvertes de streptavidine; la dénaturation en milieu alcalin libère le brin marqué par la fluorescéine dont la fluorescence permet de quantifier les produits fixés sur les billes [15]. Cette méthode ne permet pas de contrôler la spécificité de l'amplification et le signal mesuré n'est pas linéaire en fonction de la quantité à détecter, mais l'ensemble de la manipulation — c'est-à-dire PCR et quantification — peut être conduit en plaque de microtitration, ce qui facilite grandement l'automatisation de la procédure.

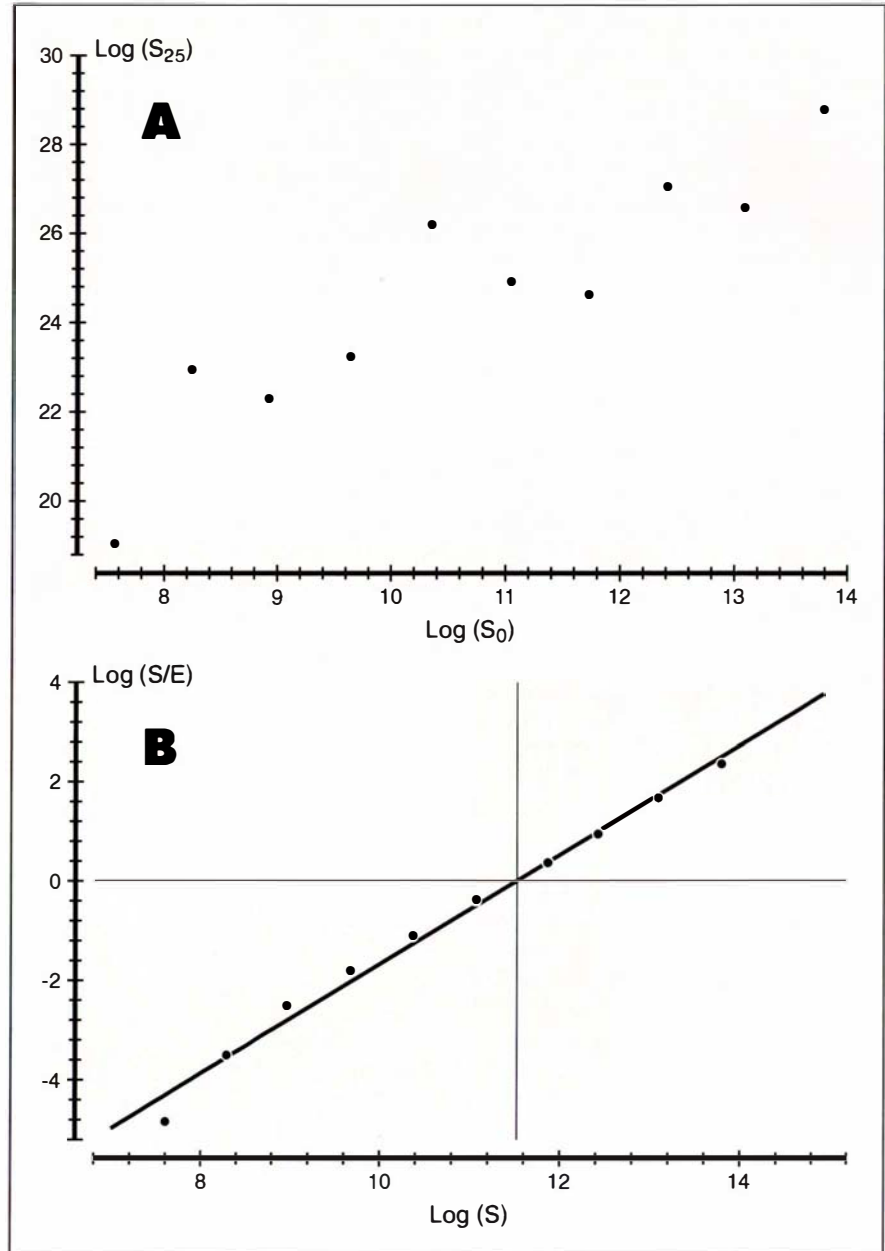


Figure 1. **Avantage de la PCR compétitive.** Les données utilisées dans ce graphe sont produites par simulation [33]. Une gamme de 10 dilutions d'un étalon S est mélangée avec une quantité unique d'échantillon à doser E . L'amplification est conduite pendant 25 cycles, le rendement d'amplification est constant au cours des 25 cycles pour un mélange donné, mais varie aléatoirement d'un mélange à l'autre entre 60 % et 90 %. Au terme des 25 cycles, les produits d'amplification sont séparés et quantifiés. En **A**, est reporté le logarithme de la quantité de produit obtenu après 25 cycles, $\text{Log}[S_{25}]$, en fonction de la quantité initiale de S , $\text{Log}[S_0]$. Du fait des variations de rendement, ce nuage de points est assez dispersé. En **B**, est reporté le $\text{Log}[S/E]$ des quantités après amplification en fonction du $\text{Log}[S]$ avant amplification. L'effet de cette standardisation est assez spectaculaire. Il doit être noté que les données produites dans cette simulation étaient bruitées avec une erreur d'environ 5 %.

De nombreux protocoles reposent sur une étape d'hybridation des produits de PCR [2, 16-20]. Ces méthodes offrent l'avantage d'une plus grande sensibilité avec des seuils de détection de l'ordre du picogramme mais leur linéarité est difficile à établir.

La séparation par chromatographie liquide haute performance (HPLC) pourrait devenir rapidement un moyen particulièrement bien adapté à la quantification des produits de PCR [21-23]. L'utilisation de colonnes échangeuses d'anions permet une séparation de résolution au moins équivalente aux plus fines résolutions obtenues par électrophorèse. La quantification se fait par intégration numérique des pics de densité optique à 260 nm en sortie de colonne. Ce signal a l'avantage de présenter une bonne linéarité sur plusieurs ordres de grandeur, tout en ayant une limite de sensibilité inférieure au nanogramme. Elle ne nécessite aucun marquage particulier des amorces, ni de procédure particulière en cours d'amplification. De plus, comme la mesure est directe, cette méthode est la seule à mesurer de manière absolue des quantités d'ADN. Les autres méthodes reposant sur des « colorations » au sens large (comprenant aussi par exemple les méthodes de détection par hybridation d'une sonde marquée) donnent des signaux qui dépendent de cette coloration. Il faut donc les comparer à des signaux provenant de quantités connues. De surcroît, une chromatographie HPLC est facilement automatisable, elle est rapide et permet, éventuellement, la récupération pour une utilisation ultérieure des fragments après séparation.

Étalonnage

Les méthodes d'estimation de la quantité initiale sont presque aussi nombreuses que les utilisateurs de PCR quantitative. Des familles de méthodes peuvent néanmoins être distinguées en établissant les regroupements en fonction des paramètres suivants. Pour une amplification, la

mesure peut être faite sur des échantillons prélevés en cours d'amplification; le dosage repose alors sur l'observation cinétique de l'amplification. La mesure peut aussi être faite une fois, dans la phase de croissance exponentielle. Le dosage doit alors être calibré par des expériences préliminaires de façon que l'observation soit faite à un stade suffisamment avancé de l'amplification pour que la quantité d'ADN amplifiée soit facilement détectable. Cependant, l'observation ne doit pas être faite trop tardivement afin de ne pas atteindre la phase de plateau. La très grande sensibilité de l'amplification à de petites variations du taux d'amplification nécessite d'amplifier des références de quantités connues en même temps que l'échantillon à doser. Une incertitude de 10 % sur le taux d'amplification se traduit par une variation d'un facteur 5 environ de la quantité amplifiée après 30 cycles. Les échantillons de référence peuvent être amplifiés dans des tubes différents de celui où se trouve l'échantillon à doser; il s'agit alors de standards externes [11]. Mais il est possible d'ajouter au tube où se trouve l'échantillon de concentration inconnue, un échantillon de référence dit standard interne [13, 24]. Une autre forme de standard interne peut être utilisée en prenant comme référence une séquence unique ou ARN messager [17, 19, 20].

Que le standard soit interne ou externe, la référence doit être une séquence d'ADN aussi proche que possible de celle à doser. Les amorces d'amplification doivent être identiques et les longueurs des séquences amplifiées doivent être proches pour qu'il n'y ait pas *a priori* de différence dans les taux d'amplification de l'échantillon à doser et du standard. Il est aussi possible d'utiliser une référence n'ayant pas de rapport direct avec l'échantillon et de montrer que les taux d'amplification de l'échantillon et du standard sont égaux. Enfin, un protocole permet de tenir compte de faibles différences dans les taux d'amplification de l'échantillon et

du standard [19, 20]. La standardisation externe demande de grandes précautions pour sa mise en œuvre. Un seul mélange réactionnel doit être constitué puis réparti entre les différents tubes contenant les points de la gamme étalon et ceux contenant les échantillons. Il convient de veiller à éviter les effets de bord et de porter une attention particulière à tout facteur pouvant entraîner des variations de rendement d'un tube à l'autre.

Une méthode faisant appel à un standard interne mérite d'être détaillée car c'est probablement la seule à avoir été réellement reconstruite et utilisée par de nombreux auteurs. Elle est nommée PCR quantitative par compétition ou PCR compétitive [10]. Un échantillon de concentration fixe E est amplifié en présence d'un standard interne S de concentration connue. Plusieurs tubes sont ainsi constitués avec une gamme de dilution de S. Après mesure des signaux correspondant à S et à E, la courbe $\text{Log}(S/E)$ en fonction de $\text{Log}(S)$ est tracée. Par extrapolation, il est possible de déterminer la quantité de S pour laquelle le rapport $\text{Log}(S/E)$ vaut 0; cette quantité est bien évidemment celle de l'échantillon de départ. En toute rigueur, le rapport S/E devrait permettre de retrouver, pour n'importe quelle valeur de S, la valeur de E puisque si $S/E = r$ alors $E = S/r$, et donc une seule mesure devrait suffire. L'intérêt de cette méthode réside dans le fait que la mesure est répétée. La régression linéaire de $\text{Log}(S/E)$ sur $\text{Log}(S)$ permet de réduire l'influence de l'erreur de mesure. De plus, le fait que la régression porte sur les logarithmes est commode car il permet d'amortir l'éventuelle non-linéarité du système de quantification des produits. Seule une analyse fine des résidus pourrait mettre en évidence cette non-linéarité mais elle ne semble jamais avoir été conduite.

Une deuxième catégorie de méthodes est basée sur des prélèvements d'une fraction de la réaction à intervalles réguliers au cours de l'amplification. Il est possible de tracer une

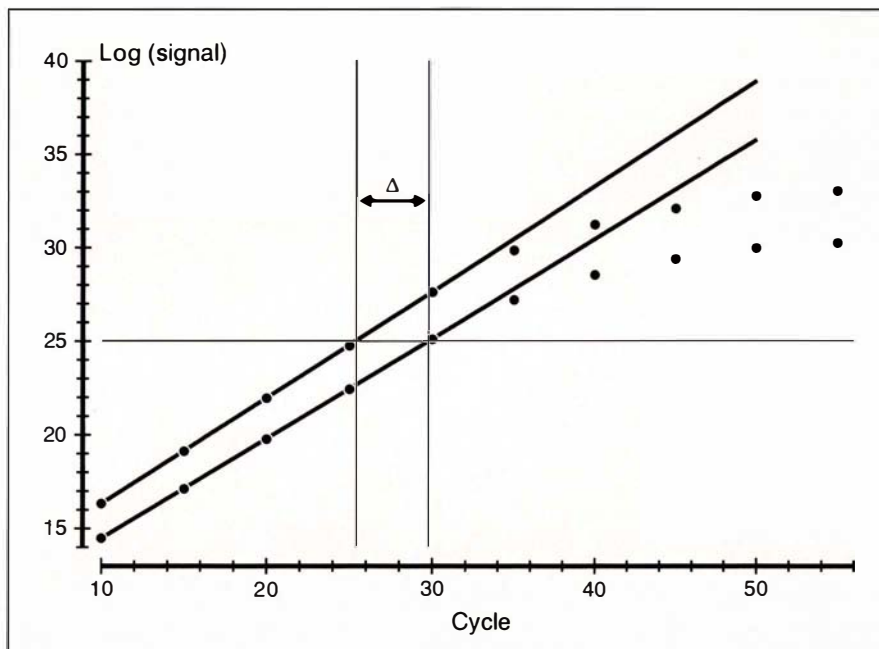


Figure 2. **Quantifications par observation cinétique de l'amplification.** Comme dans la figure 1, les données représentées sur cette figure sont issues de simulations. Un mélange contenant une référence S et un échantillon est utilisé en vue d'un dosage. Le mélange est divisé en dix aliquotes de volumes égaux et l'amplification est conduite pour chacun pendant un nombre de cycles multiple de 5. Au terme de l'amplification de chacun des aliquotes, les produits d'amplification sont séparés et quantifiés. On reporte sur un graphe le logarithme du signal obtenu par quantification en fonction du nombre de cycles. Un ajustement linéaire sur les premiers points permet de calculer l'équation de chacune des deux droites: $9,211 + 0,530 n$ et $10,827 + 0,559 n$. Les deux rendements d'amplification semblent donc ne pas être égaux; il est facile de les calculer: $\text{Exp}[0,559] = 1,748$ et $\text{Exp}[0,530] = 1,698$. Le rendement de la courbe inférieure est donc d'environ 70 % et celui de la courbe supérieure de 75 %. De même, le rapport S/E des quantités initiales du standard et de l'échantillon est donné par $\text{Exp}[10,827-9,211] = 5,032$. Il doit être noté que les données simulées n'étaient pas bruitées et que l'on retrouve les paramètres de la simulation 70 %, 75 % et un rapport de 5 avec une excellente précision. Par ailleurs, la grandeur ΔCycle , qui est parfois utilisée comme variable quantitative, est indiquée sur le graphique. Dans ce cas particulier, elle vaut 4,41. Il doit être noté que lorsque ce type de grandeur est utilisé, si elle n'est déterminée que graphiquement, des différences sensibles dans les taux d'amplification peuvent passer inaperçues et conduire à d'importantes erreurs. C'est le cas sur cette figure où la différence de 5 % dans les rendements n'est pas visible. En supposant que graphiquement le rendement ait été estimé à 1,72, l'égalité $\Delta\text{Cycle} \cdot \text{Log}[1,72] = \text{Log}[S/E]$ indiquerait un rapport S/E de 10 environ.

courbe étalon dans laquelle, en face de références de quantités connues, on reporte le nombre de cycles qu'il faut pour obtenir une quantité fixe de produits d'amplification [11]. Cette méthode offre l'avantage de pouvoir répéter la mesure et donc de la préciser en n'amplifiant qu'un seul échantillon. Cela peut être particulièrement précieux si l'échantillon est unique. Une deuxième solution, peut-être un peu plus simple, consiste à reporter sur un graphique, en face du nombre de cycles d'amplification, le logarithme de la mesure de la quantité d'ADN prélevée [12]. Dans la phase exponentielle de l'amplification, ces courbes sont droites et apparaissent décalées les unes par rapport aux autres de quelques cycles Δcycles . Si l'on amplifie Q molécules, il faudra c cycles pour obtenir un certain niveau de signal s . A partir de $Q/2$ molécules initiales, il faudra c cycles plus Δcycles (≈ 1) pour atteindre le même signal s . Il existe une très forte corrélation linéaire entre Δcycles et la quantité initiale.

Reste une dernière catégorie de méthode qui est d'un type intermédiaire. Elle permet une quantification sur la base d'une observation en fonction du nombre de cycles d'amplification mais chaque amplification n'est observée qu'une seule fois [19, 20]. L'échantillon étudié est divisé avant l'amplification en plusieurs aliquotes de taille égale. Chaque aliquote est amplifiée pendant un nombre de cycles qui lui est propre et la totalité des produits d'amplification est ensuite quantifiée. En traçant les courbes ainsi obtenues et en calculant les pentes, il est possible d'obtenir une estimation de la quantité initiale.

Applications

Les applications de la PCR quantitative sont déjà nombreuses, tant en recherche biologique qu'en analyse médicale; nous parlerons essentiellement des applications médicales. La PCR se révèle particulièrement utile au dosage des ARN messagers. Il est en effet possible de faire pré-

céder l'amplification d'une transcription inverse. Elle produira, à partir d'un ARN, un ADN simple brin qui sera amplifié comme une séquence d'ADN ordinaire [13]. Cette technique appelée RT-PCR (*reverse transcription PCR*) tend à se généraliser comme outil d'observation clinique. Très récemment, elle a été utilisée comme moyen de dosage du nombre de virions HIV-1 contenus dans le plasma de patients à tous les stades de l'infection [25]. La méthode s'est révélée capable de détecter avec fiabilité des concentrations faibles s'étendant de 200 copies par millilitre de plasma à 10^7 copies par millilitre. Elle donne des résultats très bien corrélés avec les méthodes classiques de titration du virus (dilution limite et remise en culture, ou dosage de l'antigène p24). Les résultats obtenus sont aussi en rapport avec les comptages par microscopie électronique. Or, alors que ces résultats ne paraissent pas biaisés, l'estimation du nombre de virions par RT-PCR est 1 000 à 10 000 fois supérieure, en moyenne, à celle obtenue par titration de p24, et 60 000 fois supérieure à celle obtenue par dilution limite et remise en culture. Le dosage du virion par RT-PCR peut sembler donc plus « juste » ; les autres méthodes sous-estimeraient le nombre réel de virions dans le plasma. Mais la justesse d'une telle estimation est une notion qui peut être discutée. L'estimation par PCR et celle par remise en culture, par exemple, sont deux moyens d'estimer l'importance d'une infection, mais ce sont aussi des mesures différentes, la première est chimique tandis que la seconde est biologique. L'intérêt opérationnel de chacune d'entre elles permettra de déterminer quelle est celle qui est la plus adaptée aux besoins du médecin.

La RT-PCR quantitative pourrait se révéler d'un grand intérêt pour la titration du virus dans les phases précoces de la maladie, lorsque les autres moyens d'observation ne détectent encore rien. Elle pourrait ainsi offrir la possibilité d'apprécier l'efficacité d'agents antiviraux, de mieux caractériser les différentes

évolutions possibles de l'infection, etc.

Une étude analogue avait déjà été conduite, bien que de manière moins approfondie [26]. De même, au lieu du dosage de l'ARN viral dans le plasma, l'étude d'autres auteurs a pu porter sur le dosage de séquences HIV-1 dans les mononucléaires périphériques [24]. Ce type de technique peut avoir aussi un rôle particulier à jouer dans les études épidémiologiques [27].

Les applications cliniques du dosage d'ADN ou d'ARN par PCR ne se limitent pas au cas du SIDA. Par PCR il a été possible de tirer des bactéries *Pneumocystis* et d'évaluer des colonisations subcliniques de cet agent [28]. La réponse inflammatoire a aussi été étudiée par amplification quantitative des ARN messagers de différentes interleukines [29]. En cancérologie, la PCR permet d'évaluer les risques de rechute de certaines leucémies après une chimiothérapie [30, 31]. La distinction entre porteurs homozygotes et porteurs hétérozygotes est importante pour certaines maladies génétiques et la PCR quantitative apporte un moyen élégant de procéder à ce test [27].

Limites et perspectives

Le dosage par PCR semble aujourd'hui plus prometteur que définitivement établi. L'amplification enzymatique a fait la preuve expérimentale qu'elle pouvait constituer un nouveau principe de dosage, mais elle présente encore certains défauts d'importance. La nécessité d'un standard, interne ou externe, ayant le même taux d'amplification, reste la contrainte majeure.

S'il existait un moyen d'estimer avec précision le taux d'une amplification, il ne serait plus nécessaire d'inclure un standard car la quantité initiale pourrait être déduite de la quantité obtenue après amplification. Il convient à ce stade de faire une remarque. Au vu des bons ajustements linéaires observés entre le nombre de cycles et le logarithme de la quantité d'ADN produite par

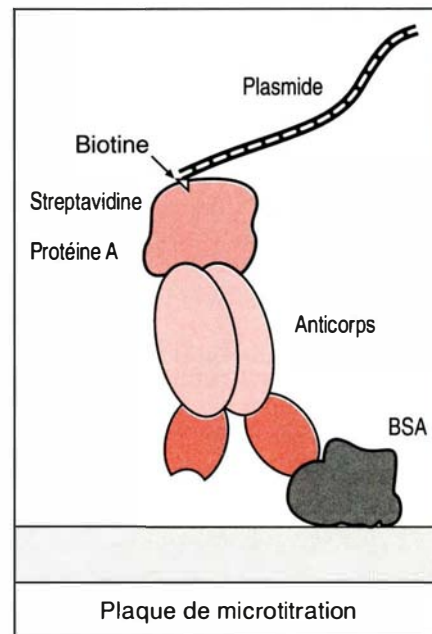


Figure 3. **Immuno-PCR.** La PCR peut être utilisée comme une méthode de révélation particulièrement sensible de dosage ELISA. L'antigène est fixé et marqué par un anticorps monoclonal dans une plaque de microtitration selon les méthodes habituelles. Dans un deuxième temps, cet anticorps est à son tour marqué par le complexe suivant : une protéine chimère comportant une moitié issue de la protéine A, capable de fixer la région Fc des immunoglobulines G, et une seconde moitié issue de la streptavidine, et donc capable de fixer la biotine. Cette caractéristique permet de réaliser un complexe entre la protéine chimérique et un plasmide biotinylé à l'une de ses extrémités. Ce complexe est utilisé pour le marquage de l'anticorps monoclonal. Après lavage, un mélange réactionnel de PCR est réparti dans les puits et l'amplification y est conduite. La mesure de l'ADN produit indique la présence de l'antigène. Des quantités très faibles (500 molécules environ) d'albumine sérique bovine ont été détectées par cette méthode, méthode qui n'a cependant pas encore été utilisée à des fins quantitatives.

amplification, il serait très tentant de procéder à une régression linéaire. Il est certes possible de trouver la droite qui minimise la somme des carrés des écarts entre les valeurs observées et les valeurs calculées, mais la pente de cette droite ne donne pas forcément une bonne estimation du taux de l'amplification. En effet, les hypothèses à la base des techniques de régression linéaire ne sont pas vérifiées dans le cas d'une amplification. En particulier, les différentes observations ne sont pas indépendantes les unes des autres. Les conséquences de ce point n'ont jamais vraiment été clarifiées. Par ailleurs, à très faibles concentrations, des variations aléatoires des résultats d'amplification mal expliquées ont été décrites [25, 32]; elles sont responsables d'une limite pratique du dosage par PCR qui ne correspond pas à une limite de sensibilité, mais probablement plus à une limite théorique. Il est raisonnable de penser que, lorsque l'amplification porte sur quelques molécules, il faille prendre en compte le caractère aléatoire et discret du comportement des petites populations moléculaires (J. Peccoud, C. Jacob, résultats non publiés).

Enfin, aucun protocole ne s'est encore véritablement imposé. Celui qui envisage d'utiliser un dosage par PCR doit d'abord choisir une méthode de standardisation et une méthode de séparation et de quantification des produits de l'amplification. Il n'existe à ce jour aucun appareil permettant un dosage automatisé des produits de PCR, ce qui rend la PCR quantitative assez astreignante en terme de quantité de travail. Il reste aussi des inconnues concernant le caractère quantitatif des étapes précédant l'amplification, qu'il s'agisse de la préparation de l'échantillon lorsque de l'ADN est amplifié, ou de la transcription inverse lorsque le matériel de départ est l'ARN. Il conviendrait de préciser la part d'erreur imputable à ces étapes et le biais éventuel qu'elles sont susceptibles d'introduire dans les quantifications.

Néanmoins, les applications de la PCR quantitative qui ont déjà été

trouvées dans le domaine médical, ainsi que les efforts industriels en cours pour développer des technologies de séparation et de quantification adaptées à la PCR peuvent laisser penser que son champ d'application s'étendra rapidement et que cette technique pourrait peut-être même devenir un outil essentiel en analyse médicale courante. On ne peut aussi manquer de s'interroger sur les conséquences qu'aura une technique récemment décrite, appelée immuno-PCR [32], et dont le principe est exposé dans la figure 3. L'utilisation quantitative de l'immuno-PCR n'a pas encore été décrite, mais elle devrait être possible à terme. Comme dans un test ELISA, l'antigène est d'abord fixé sur une plaque de microtitration puis marqué par un anticorps monoclonal. Au lieu d'utiliser un anticorps secondaire couplé à une enzyme, une protéine chimérique, d'une part capable de reconnaître la région Fc du monoclonal, et d'autre part complexée à un plasmide à son autre extrémité, est utilisée comme second marqueur. La coloration consiste à amplifier le plasmide complexé à la protéine chimérique. La possibilité prochaine de doser quelques centaines de molécules de protéines, de doser plusieurs protéines dans un même puits aura des conséquences qui sont encore difficiles à prévoir. L'utilisation qui sera faite de techniques aussi neuves reste d'ailleurs largement à imaginer ■

Third Conference of the European Society for Analytical Cellular Pathology (3rd ESACP)
16-20 Mai 1994

Europole, World Trade Center,
Grenoble

Colloque Satellite : Colloque commun de l'Association de Cytométrie en Flux (ACF) et du Cercle Français de Microscopie Quantitative (CFMQ), 18-19 Mai 1994

Inscription : Destination Congrès, BP56 38242 Meylan Cedex, France. Tél. : (33) 76.90.18.12. - Fax : (33) 76.90.33.26

Information scientifique : Pr. Gérard Brugal, Université Joseph Fourier, CERMO BP53, 38041 Grenoble, Cedex 9, France. Tél. : (33) 76.63.14.02 - Fax : (33) 76.51.49.48.

RÉFÉRENCES

1. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155 : 335-50.
2. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, *et al.* Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230 : 1350-4.
3. Erlich HA, Gelfand D, Sninsky JJ. Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science* 1991; 252 : 1643-51.
4. Delpuch M, Wain-Hobson S, Vartanian JP, Pannetier C, Kourilsky P. Les applications de la PCR. *La Recherche* 1992; 249 : 1460-74.
5. Vlieger AM, Medenblik AM, van Gijls-wijk RP, *et al.* Quantitation of polymerase chain reaction products by hybridization-based assays with fluorescent, colorimetric, or chemiluminescent detection. *Anal Biochem* 1992; 205 : 1-7.
6. Landgraf A, Reckmann B, Pingoud A. Direct analysis of polymerase chain reaction products using enzyme-linked immunosorbent assay techniques. *Anal Biochem* 1991; 198 : 86-91.
7. Nakayama H, Yokoi H, Fujita J. Quantification of mRNA by non-radioactive RT-PCR and CCD imaging system. *Nucleic Acids Res* 1992; 20 : 4939.
8. Christopoulos TK, Diamandis EP, Wilson G. Quantification of nucleic acids on nitrocellulose membranes with time-resolved fluorometry. *Nucleic Acids Res* 1991; 19 : 6015-9.
9. Chan A, Diamandis EP, Krajden M. Quantification of polymerase chain reaction products in agarose gels with a fluorescent europium chelate as label and time-resolved fluorescence spectroscopy. *Anal Chem* 1993; 65 : 158-63.
10. Gilliland G, Perrin S, Blanchard K, Bunn HF. Analysis of cytokine mRNA and DNA: detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87 : 2725-9.
11. Hoof T, Riordan JR, Tummeler B. Quantitation of mRNA by the kinetic polymerase chain reaction assay: a tool for monitoring P-glycoprotein gene expression. *Anal Biochem* 1991; 196 : 161-9.
12. Kinoshita T, Imamura J, Nagai H, Shimotohno K. Quantification of gene expression over a wide range by the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 1992; 206 : 231-5.
13. Wang AM, Doyle MV, Mark DF. Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction (published erratum appears in *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87 : 2865). *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86 : 9717-21.

14. Porcher C, Malinge MC, Picat C, Grandchamp B. A simplified method for determination of specific DNA or RNA copy number using quantitative PCR and an automatic DNA sequencer. *Biotechniques* 1992; 13: 106-14.
15. Landgraf A, Reckmann B, Pingoud A. Quantitative analysis of polymerase chain reaction (PCR) products using primers labeled with biotin and a fluorescent dye. *Anal Biochem* 1991; 193: 231-5.
16. Ballagi-Pordany A, Funa K. Quantitative determination of mRNA phenotypes by the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 1991; 196: 89-94.
17. Kellogg DE, Sninsky JJ, Kowk S. Quantitation of HIV-1 proviral DNA relative to cellular DNA by the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 1990; 189: 202-8.
18. Becker-Andre M, Hahlbrock K. Absolute mRNA quantification using the polymerase chain reaction (PCR). A novel approach by a PCR aided transcript titration assay (PATTY). *Nucleic Acids Res* 1989; 17: 9437-46.
19. Chelly J, Kaplan JC, Maire P, Gautron S, Kahn A. Transcription of the dystrophin gene in human muscle and non-muscle tissue. *Nature* 1988; 333: 858-60.
20. Chelly J, Montarras D, Pinset C, Berwald-Netter Y, Kaplan JC, Kahn A. Quantitative estimation of minor mRNAs by cDNA-polymerase chain reaction. Application to dystrophin mRNA in cultured myogenic and brain cells. *Eur J Biochem* 1990; 187: 691-8.
21. Warren W, Wheat T, Knudsen P. Rapid analysis and quantitation of PCR products by high-performance liquid chromatography. *Biotechniques* 1991; 11: 250-5.
22. Katz ED, Dong MW. Rapid analysis and purification of polymerase chain reaction products by high-performance liquid chromatography. *Biotechniques* 1990; 8: 546-55.
23. Schmitt JF, Guthridge M, Economou C, Bertolini J, Hearn MT. A new quantitative polymerase chain reaction-high performance ion exchange liquid chromatographic method for the detection of fibroblast growth factor-beta (FGF-beta) gene amplification. *J Biochem Biophys Methods* 1992; 24: 119-33.
24. Telenti A, Imboden P, Germann D. Competitive polymerase chain reaction using an internal standard: application to the quantitation of viral DNA. *J Virol Methods* 1992; 39: 259-68.
25. Piatak M, Saag MS, Yang LC, et al. High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science* 1993; 259: 1749-54.
26. Holodniy M, Katzenstein DA, Sengupta S, et al. Detection and quantification of human immunodeficiency virus RNA in patient serum by use of the polymerase chain reaction. *J Infect Dis* 1991; 163: 862-6.
27. Eron JJ, Gorczyca P, Kaplan JC, D'Aquila RT. Susceptibility testing by polymerase chain reaction DNA quantitation: a method to measure drug resistance of human immunodeficiency virus type 1 isolates. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 3241-5.
28. Peters SE, Wakefield AE, Banerji S, Hopkin JM. Quantification of the detection of *Pneumocystis carinii* by DNA amplification. *Mol Cell Probes* 1992; 6: 115-7.
29. Bickler SW, Heinrich MC, Davey M, Harrison MW, Bagby GC. A method for rapid analysis of peripheral blood mononuclear leukocyte cytokine mRNA. *Exp Hematol* 1992; 20: 980-5.
30. Lion T, Izraeli S, Henn T, Gaiger A, Mor W, Gadner H. Monitoring of residual disease in chronic myelogenous leukemia by quantitative polymerase chain reaction. *Leukemia* 1992; 6: 495-9.
31. Wasserman R, Galili N, Ito Y, et al. Residual disease at the end of induction therapy as a predictor of relapse during therapy in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 1992; 10: 1879-88.
32. Sano T, Smith CL, Cantor CR. Immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of specific antibody-DNA conjugates. *Science* 1992; 258: 120-2.

Summary

Quantitative PCR : a new tool for clinical investigations

In 1988, a new kind of quantitative assay for DNA and RNA molecules was reported. It is based on an enzymatic amplification known as the polymerase chain reaction (PCR). The PCR procedure is widely used and its ability to give rise to quantitative signals has been developed. A number of quantitative PCR protocols have already been described. They differ in the way the amplified DNA is quantified. Since quantitative PCR is very sensitive to small variations in the amplification yield, some internal references have to be incorporated in the protocols. This standardization can also be achieved by a number of different methods. The use of internal and external standards is described in detail, as well as the principles of quantification by competition. The principal applications of this emerging technique for clinical investigations are summarised. Its present limits and its possible extension to the quantification of any kind of antigenic molecules are discussed.