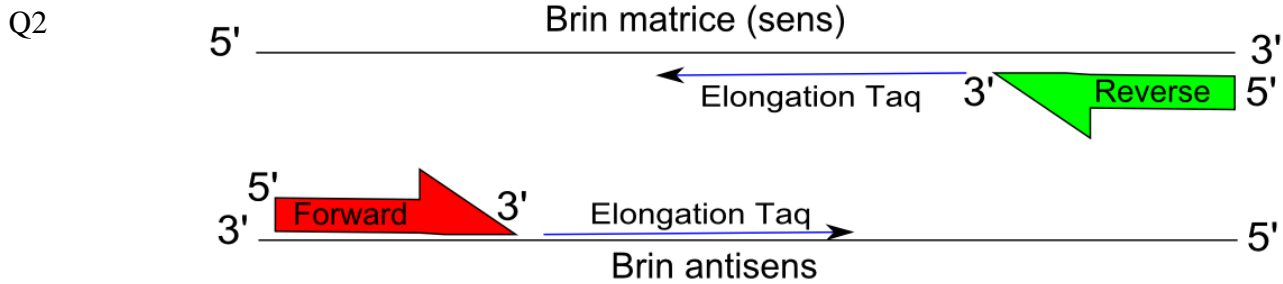


Proposition de corrigé :

Q1 Il est possible d'obtenir un résultat d'amplification PCR même si les bactéries sont en petit nombre et/ou non revivifiables alors qu'un isolement donnera un résultat uniquement avec des bactéries revivifiables et en concentration suffisante.



Q3 dATP, dCTP, dGTP, dTTP

Q4 Economie de la QCR multiplex

Ici on recherche 3 genres bactériens simultanément donc 1 PCR au lieu de 3 : **économies de temps** de technicien pour la manipulation ; le mix contient toutes les amorces donc pas d'économie d'amorces par contre on **économise de la Taq et des désoxy trinuécléotides** ; économie de place dans le thermocycleur, une seule électrophorèse ou lecture simultanée.

Q5 PCR témoins et identification biochimique classique

En observant les résultats de l'électrophorèse on peut remarquer que la PCR ne permet pas une identification à l'espèce pour les *Campylobacter* et que l'identification des *Salmonella* et des *Shigelle* peuvent donner des résultats similaires entre elles ou avec des *E.coli* :

⇒ Pour *Campylobacter*, le gène ARN 16S recherché est bien caractéristique du genre et mais les deux espèces testées (*Campylobacter jejuni et coli*) donnent un amplicon de même taille (dépôt/bande 2, 3 et 11). Donc une identification classique sera nécessaire pour connaître l'espèce.

⇒ La taille de l'amplicon obtenu pour 4, *Salmonella enteritidis*; 5, *S. infantis*; 6, *Salmonella spp.* 12, *S. enteritidis* , est comparable. On peut donc identifier le genre *Salmonella*, mais un sérotypage sera nécessaire pour différencier les sérovars.

⇒ On obtient un amplicon de taille comparable pour 7, *Salmonella boydii*; 8, *Shigella dysenteriae*; 9, *Shigella. flexneri*; 10, *Shigella sonnei*; 13, *Shigella flexneri ATCC 12022*; 18, *enteroinvasive E. coli*. Ces bactéries ont en commun le gène ipaH choisi pour mettre en évidence la présence de Shigelles. On constate que ce gène est également présent chez *Salmonella boydi* et chez *E.coli* entéroinvasifs. L'identification classique est indispensable pour confirmer le genre bactérien et le sérotypage à réaliser pour compléter l'identification.

Remarque : l'analyse complète peut nécessiter la réalisation d'un antibiogramme, donc dans tous les cas il faut une mise en culture. La PCR a pour intérêt de mettre en place une thérapie adaptée plus rapidement en attendant les résultats définitifs de l'analyse classique.

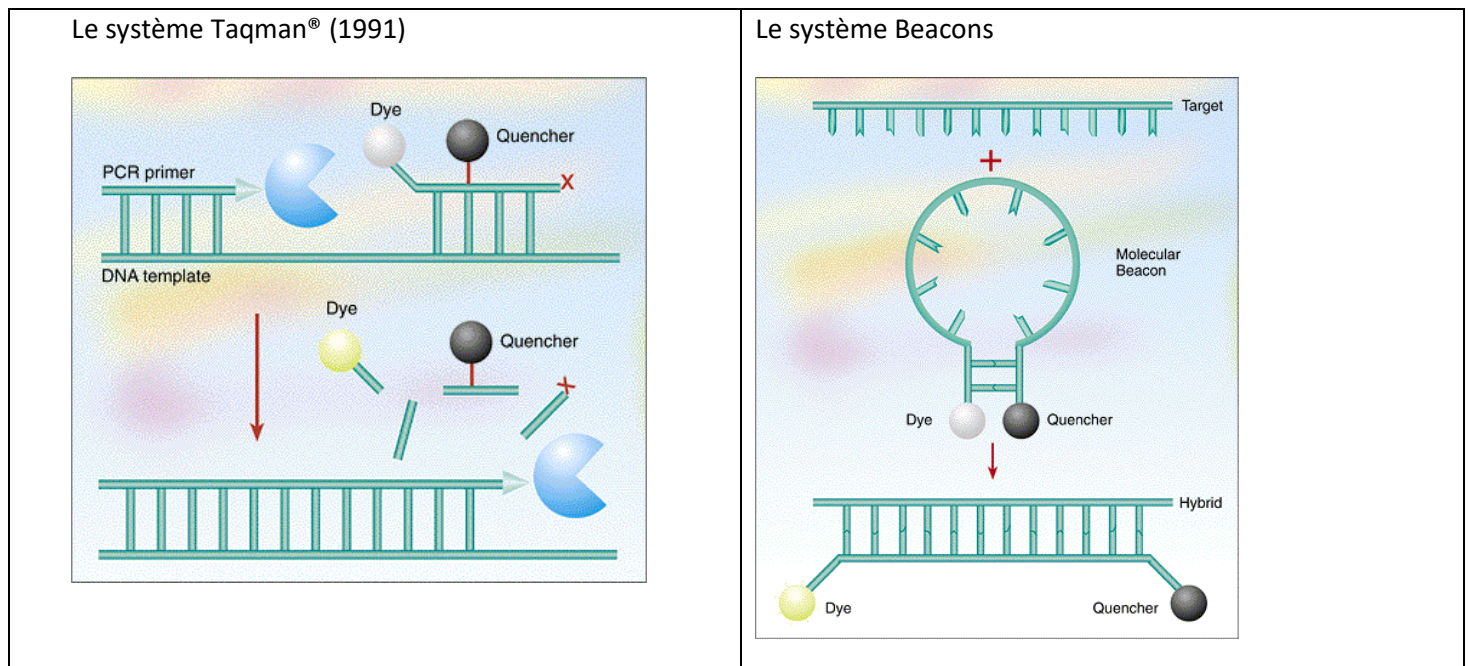
Q6 QPCR (quantitative PCR), modification du mix permettant de réaliser une QPCR.

Pour cette technique il est nécessaire de pouvoir mettre en évidence à chaque cycle quel est le gène amplifié et sa quantité. On va utiliser des sondes marquées avec un fluorochrome inactif tant que la sonde n'a pas été impliquée dans une réplification. Ici l'on recherche 3 gènes simultanément, il faudra donc disposer de 3 fluorochromes différents afin de détecter spécifiquement le gène amplifié. On ajoutera un témoin d'amplification (par exemple un témoin *Bacillus* mélangé au mix + amorces + sa sonde marquée spécifique, pour avoir l'assurance que la PCR a bien lieu → lyse des bactéries et amplification).

Il existe plusieurs systèmes de suivi QPCR dans tous les cas le fluorochrome est au départ sous forme inactive, son implication dans le processus de réplication le rend actif :

⇒ Les systèmes Quencher/reporter : on utilise ici des sondes différentes des amorces. Sur la sonde le quencher inactive le reporter (qui est l'élément fluorescent). Lors de l'amplification le quencher est physiquement séparé du reporter ce qui donne une fluorescence mesurable et spécifique de la sonde mise en jeu.

Système Taqman : Chaque sonde TaqMan est conçue de sorte à s'hybrider avec une région d'ADN simple brin spécifique par une paire de d'amorces spécifiques (une pour l'amorce, une autre sur une autre partie en 5' de l'ADN simple brin). La Taq polymérase allonge l'amorce et synthétise le brin néoformé de l'extrémité 3' vers 5' du brin complémentaire, l'activité exonucléase 5'-3' de cette même Taq polymérase dégrade la sonde marquée déjà hybridée au brin matrice. La dégradation de la sonde relargue le fluorophore cassant ainsi la proximité existant avec le quencher et permettant l'expression de la fluorescence. Ainsi, la fluorescence détectée est directement proportionnelle au relargage de fluorophore et donc à la quantité d'ADN d'intérêt présent dans le produit de PCR.

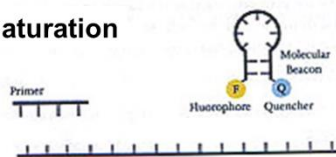


Système Beacons : sonde d'hybridation en épingle à cheveux appelée balise moléculaire

- Une boucle : séquence complémentaire d'une séquence cible de l'ADN
- Deux bras de séquences complémentaires
- Un fluorochrome émetteur (ex : FAM, ROX, TET)
- Un fluorochrome suppresseur, non fluorescent. Il dissipe l'énergie de l'émetteur en chaleur (FRET)

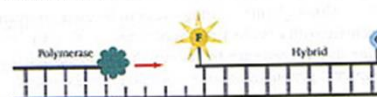
Si la séquence cible ne correspond pas parfaitement à la balise moléculaire, pas d'hybridation donc pas d'émission de fluorescence (formation en épingle à cheveux thermodynamiquement plus stable)

1- Dénaturation



balises libres : pas de fluorescence

2- Hybridation



La sonde s'hybride préférentiellement à sa séquence cible complémentaire sur la matrice
Emission de fluorescence

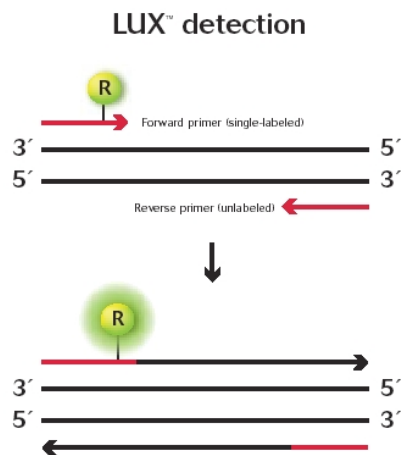
3- Elongation



Libération de la balise : pas de fluorescence

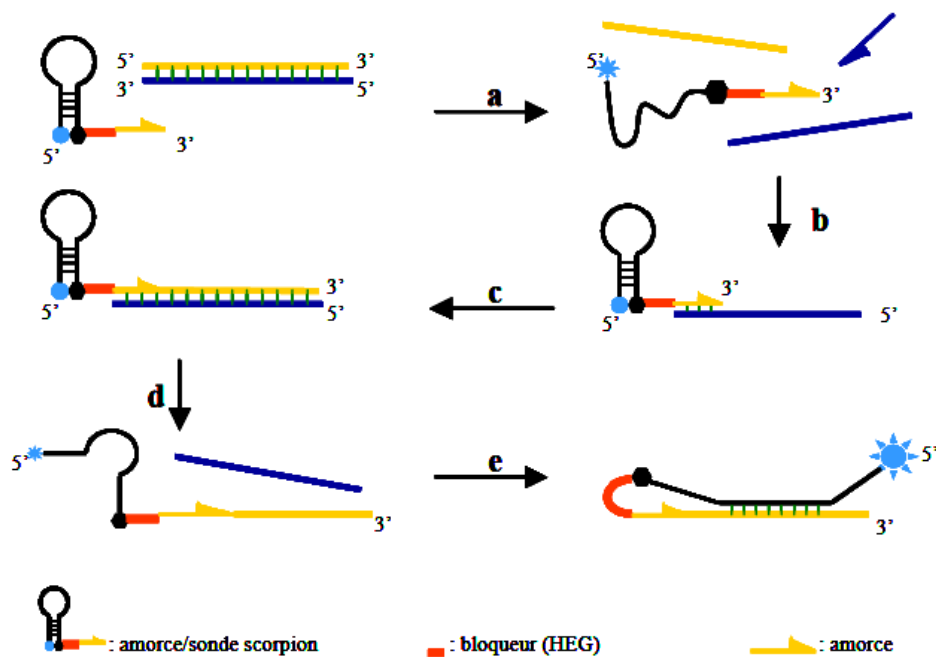
Plus il y aura d'ADN amplifié, plus il y aura de fluorescence lors de la dénaturation, la sonde pouvant s'hybrider sur l'ADN simple brin.

⇒ L'amorce est couplée à un système fluorescent qui sera activé si l'amorce est impliquée dans une réplication :



⇒ Système Scorpion

Les fluorochromes et la sonde (partie balise moléculaire) sont intégrés à même l'amplicon de façon irréversible durant l'amplification.



(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.

Exemple de PCR multiplexe en temps réel : le système PCR geneExpert

PCR GeneXpert



Ici l'exemple d'une recherche simultanée de *Chlamydia trachomatis* et *Neisseria gonorrhoeae* : pour *Chlamydia trachomatis*, la séquence d'ADN cible est constituée de 207 nucléotides localisés dans le plasmide cryptique, commun à tous les sérovars de *Chlamydia trachomatis*. Pour *Neisseria gonorrhoeae*, la séquence d'ADN cible est constituée de 201 nucléotides situés dans le gène codant la cytosine-ADN-méthyltransférase.

Ce système inclus deux témoins :

SPC (spécific positive control) : permet de vérifier qu'une bactérie peut être mise en évidence par le procédé mis en œuvre. Ici le mix contient des spores de *Bacillus* + amorces + sondes marquées.

SAC (sample/specimen adequacy control) : amorces spécifiques d'un gène humain + sondes marquées pour valider le prélèvement qui doit contenir des cellules du patient. Ci-dessous un résultat négatif pour *Chlamydia* et *Neisseria* validé par les deux contrôles positifs.

