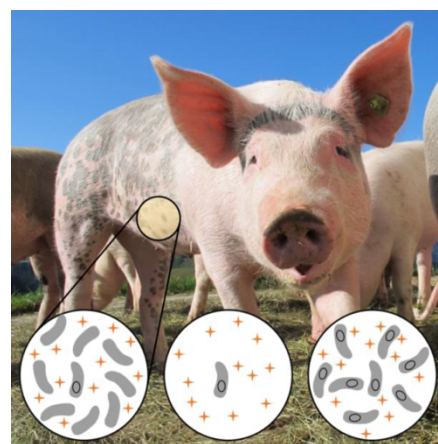


Thème : Biologie moléculaire		
Séquence 1 : Utiliser les technologies de l'ADN		
Séance 8 : Antibiorésistance et biologie moléculaire		
Réf BO	Savoir faire	Concept
T9.2 Amplification d'un fragment d'ADN par une technique de PCR		
T9.2.1	Distinguer, selon les objectifs et le contexte, une PCR préparative d'une PCR analytique. Déterminer le rôle de chaque composant du réactif de PCR en lien avec les mécanismes de réplication.	Gène d'intérêt. Séquence-cible. Amorces. Spécificité
T9.2.2	Repérer les étapes des réactions d'un cycle de PCR à partir d'une procédure. Expliquer l'intérêt de la répétition des cycles de PCR.	Dénaturation Hybridation. Élongation. Amplification Amplicon.
T9.2.2	Mettre en œuvre une technique de PCR en respectant les points critiques.	Marche en avant.
T9.2.3	Vérifier le résultat et la qualité de la PCR par électrophorèse.	Charge. Marqueur de taille. Témoins*.

AT n°11 : Antibiorésistance et Biologie moléculaire

Contexte : Une épidémie d'E. coli a infecté 42 personnes dans 6 départements différents. Les personnes hospitalisées ont présenté de graves symptômes d'intoxication alimentaire, notamment une diarrhée hémorragique et quelques cas d'insuffisance rénale. Les médecins traitant les patients ont immédiatement administré l'antibiotique **imipenem**, un puissant médicament de la classe des antibiotiques **carbapenem**. Les patients n'ont pas répondu au traitement. Les médecins soupçonnent que les E. coli étaient **résistants** aux carbapénèmes et sont passés à un autre antibiotique, la **colistine**. Heureusement, la plupart des patients ont répondu au nouveau traitement. Néanmoins, 8 des 42 patients sont morts. Des tests ultérieurs ont confirmé que l'E. coli possédait un **plasmide contenant le gène bla_{NMD-1}**, un gène de résistance aux carbapénèmes relativement nouveau mais en expansion.


Les responsables de la santé publique ont retracé la source de l'infection jusqu'au porc contaminé provenant d'une ferme Lozérienne. L'élevage de porcs produit des quantités considérables de déchets de fumier, et les exploitations voisines craignent maintenant que ces déchets **propagent les gènes responsables de la résistance au carbapénème dans le sol et dans l'eau**. Deux fermes, **La Causse** et **La cévenole**, ont pris contact avec les responsables de la santé publique pour tenter d'évaluer leur risque éventuel. Des échantillons de sol ont été prélevés dans ces fermes afin de **tester la présence du gène bla_{NMD-1}**.



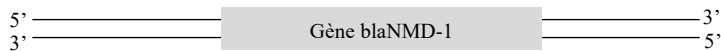
Vous avez à votre disposition de l'ADN extrait du sol de deux fermes, La Causse et La cévenole, vous utiliserez la technique de PCR pour déterminer si le gène bla_{NMD-1} est présent dans l'un, les deux ou aucun des échantillons environnementaux. Vous utiliserez des amorces spécifiques au gène bla_{NMD-1} pour tenter d'amplifier le gène de résistance (ces amorces sont déjà choisies). Lorsque le bla_{NMD-1} est présent dans un échantillon, ces amorces vont amplifier un fragment d'ADN de 700 paires de bases. Une deuxième série d'amorces sera utilisée pour amplifier une région de 400 paires de bases du gène de l'ARN ribosomique 16S (nous avons choisi d'amplifier l'ARN ribosomique 16S car il est présent dans toutes les bactéries). Cette deuxième série d'amorces spécifique au gène codant pour l'ARNr 16S, sera utilisée comme contrôle du bon fonctionnement de la PCR, afin de s'assurer que l'ADN était présent dans l'échantillon et que l'amplification de l'ADN dans la PCR a réussi. Ces dernières amorces devront être choisies par vos soins avant de commencer la PCR, en vous aidant d'un logiciel de bio-informatique. Vous recevrez également un échantillon d'ADN extrait d'un isolat d'E. coli connu pour contenir du bla_{NMD-1} et un second échantillon d'ADN d'un isolat d'E. coli connu pour être sensible au carbapénème. Ces échantillons d'ADN serviront de témoins positifs et négatifs pour votre expérience.

Objectif : déterminer si le gène de résistance bla_{NMD-1} est présent dans les fermes La Causse et La cévenole.

Réflexion préliminaire

Q1. A l'aide de la vidéo du principe de la PCR déposée dans le drive, répondez au questionnaire socrative ayant pour code : LNDJOURDAN. (pour se faire télécharger l'application socrative students :  puis rentrer le code donné ci-dessus).

Q2. Présenter sous forme de schémas les étapes de l'amplification du **gène blaNMD-1** par PCR ainsi que les produits obtenus et leur taille. Vous présenterez deux cycles de PCR.



Q3. L'ARN ribosomique 16S est retrouvé dans toutes les bactéries. A quoi sert l'amplification par PCR de l'ARN ribosomique 16S aujourd'hui ?

Q4. Réaliser un schéma prévisionnel du gel précisant les résultats attendus pour chacun des tubes (donner le sens de migration, les pôles + et -).

Q5. S'agit-il ici d'une PCR préparative d'une PCR analytique.

Q6. Déterminer le rôle de chaque composant de la PCR :

Composants de la PCR	Rôle
taq polymérase	
dNTP	
tampon	
primers	
DNA template	

Q7. Expliquer l'intérêt de la répétition des cycles de PCR.

Q8. Expliquer l'intérêt de la marche en avant lors d'une PCR.

Q9. Nommer les structures secondaires de l'enzyme Métallo-bêta-lactamase.

Réalisation pratique

R1. Réaliser la procédure opératoire.

Présentation et exploitation des résultats

Q10. Présenter sous forme appropriée les résultats de l'électrophorégramme.

Q11. Valider les résultats obtenus pour les tubes à PCR « N », « P », « E ».

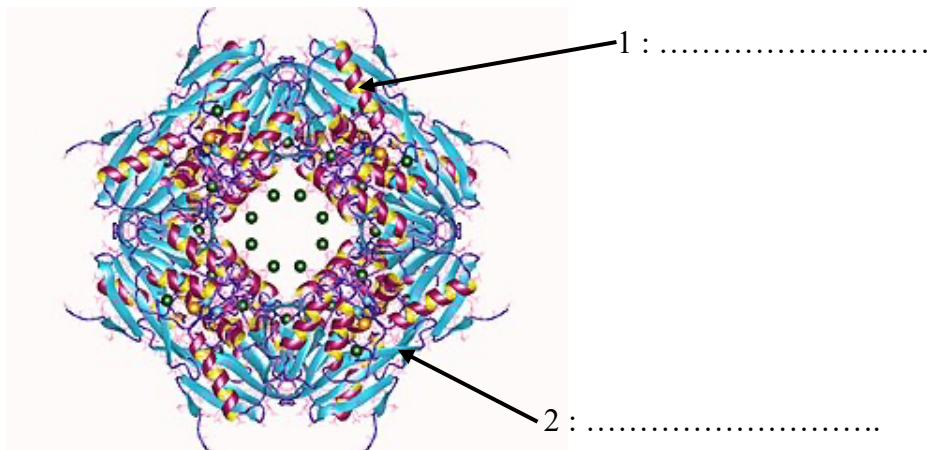
Q12. Interpréter les résultats obtenus pour les tubes « A » et « B ».

Q13. Conclusion et synthèse générale.

Document 1 : Information sur les carbapénèmes

Les carbapénèmes sont des **antibiotiques** qui ne sont généralement utilisés que dans des situations extrêmes de dernier recours et sont considérés comme l'une de nos **dernières lignes de défense contre les bactéries résistantes** aux antibiotiques. En 2007, cependant, un homme a été infecté en Inde par une souche de bactérie qui s'est révélée résistante au traitement aux carbapénèmes. Des tests ultérieurs ont montré que la résistance était due à un gène codant pour une protéine qui décompose les carbapénèmes. Cette protéine a été appelée **NDM-1** (New Delhi metallo-beta-lactamase 1), une **carbapénase qui hydrolyse les carbapénèmes**. Le gène qui code pour NDM-1, **blaNMD-1**, **était situé sur un plasmide** qui peut être disséminé par **transfert horizontal de gènes**. Le gène blaNMD-1 s'est depuis lors répandu dans le monde entier et a été trouvé dans des milieux allant de l'eau potable de New Delhi aux hôpitaux des États-Unis. La propagation de ce gène de résistance a été particulièrement alarmante ; en dix ans à peine, il est passé d'un état totalement inconnu à une identification dans des échantillons du monde entier. Les carbapénèmes étant réservés à l'usage hospitalier, l'identification de la résistance dans les milieux environnementaux est particulièrement inquiétante. Mais si le NDM-1 offre une résistance aux carbapénèmes, il offre également une résistance à plusieurs autres antibiotiques, dont certains sont régulièrement utilisés en agriculture. Il est possible que l'utilisation généralisée de ces autres antibiotiques plus couramment utilisés alimente la propagation du blaNMD-1 dans les milieux environnementaux.

Document 2 : Protéine NDM-1 : Métallo-bêta-lactamase, E.Coli (source : wikipédia)



Document 3 : Procédure opératoire :

1. Principe de la PCR : La technique de PCR (Polymerase Chaine Reaction) est une technique de biologie moléculaire permettant d'amplifier un fragment spécifique d'ADN afin de le détecter.

2. Mise en place de la PCR : préparation des tubes

Étiqueter 5 tubes PCR (tubes de 200 µl) par binôme. Étiqueter les tubes sur la paroi latérale.

- 1 tube étiqueté "A" : ADN de la ferme La caussenarde
- 1 tube étiqueté "B" : ADN de la ferme La cévenole
- 1 tube marqué "N" : ADN de contrôle négatif provenant de bactéries non résistantes
- 1 tube marqué "P" : ADN de contrôle positif provenant de bactéries résistantes au carbapénème
- 1 tube marqué "E" : ADN remplacé par de l'eau déminéralisée pure.

Ajouter des réactifs PCR à chaque tube PCR de 200 µl :

	Tube A	Tube B	Tube N	Tube P	Tube E
Template DNA	DNA From La caussenarde 10µl	DNA From La cévenole 10µl	Negative Control 'non resistant' DNA 10µl	Positive Control 'resistant' DNA 10µl	Demineralized Water 10µl
PARE Primer Mix	10µl	10µl	10µl	10µl	10µl
5X EZ PCR Master Mix	5µl	5µl	5µl	5µl	5µl
TOTAL VOLUME	25µl	25µl	25µl	25µl	25µl

Mélanger doucement les réactifs en pipettant de haut en bas 3-4 fois, boucher les tubes

- Assurez-vous que tout le volume de liquide s'accumule au fond du tube (si nécessaire, faites tourner brièvement les tubes à l'aide d'une microcentrifugeuse)

Placer les tubes à l'intérieur de l'appareil PCR

- Appuyer fermement sur les bouchons des tubes pour assurer un ajustement serré
- Fermer le couvercle de l'appareil PCR et serrer-le doucement

3. Réalisation du cycle de PCR

Programmation et surveillance de la PCR

- Ouvrir le logiciel
- Cliquer sur le '+' pour créer un programme de PCR
- Entrez un nom pour le protocole : par exemple « 48 »
- Entrez les paramètres du protocole PCR:

Dénaturation initiale 94°C 30 sec

Dénaturation 94°C 10 sec

Hybridation 55°C 10 sec

Extension 72°C 10 sec

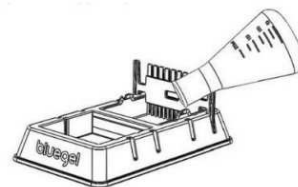
Élongation finale 72°C 30 sec

Nombre de cycles 28

- Cliquez sur "Enregistrer" pour enregistrer le protocole.
- Cliquez sur "Démarrer" pour lancer le cycle

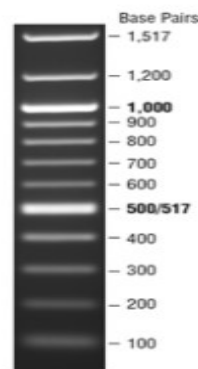
4. Électrophorèse des résultats de PCR

- Préparer un gel d'agarose à 1,6% en utilisant du TBE 1X
 - Ajoutez 1,6 g d'agarose à 100 ml de tampon d'électrophorèse.
 - Chauffez le mélange à l'aide d'un micro-onde jusqu'à ce que la poudre d'agarose soit dissoute et que la solution devienne claire
 - Versez la solution d'agarose dans le plateau de coulée de gel avec un peigne (le peigne a 13 puits est idéal)
 - Laissez le gel se solidifier complètement et retirez le peigne. Typiquement, 10-20 minutes
 - Placez le gel dans la chambre d'électrophorèse et recouvrez-le de tampon d'électrophorèse 1X TBE.
- Ajouter 4 µl de Safegreen dans les tubes d'ADN après amplification
- Ajouter le bleu de dépôt dans les tubes d'ADN après amplification
- Dépôt des échantillons
 - Charger les échantillons d'ADN
 - Puits 2: l'échantillon A
 - Puits 3: l'échantillon B
 - Puits 4: l'échantillon N
 - Puits 5: l'échantillon P
 - Puits 6 : l'échantillon E
 - Puits 1 : Pour le marqueur de poids moléculaire, il faut ajouter 2µl de SAFEGREEN pour 10µl de marqueur.
 - Lancer l'électrophorèse
 - Vérifiez que de petites bulles se forment près des bornes dans la boîte



5. Détermination de la taille et interprétation

- Placez le gel sur le transilluminateur à lumière bleue
- Vérifier la présence du produit PCR (fluorescent)
- Prendre en photo le gel



6. Marqueur de poids moléculaire →

7. Exercice sur le choix des amorces (sera réalisé en classe pendant la PCR):

A l'aide du logiciel sérial cloner ainsi que des séquences fournies par le professeur en classe, vous allez pouvoir choisir le couple d'amorces, parmi les deux couples proposés, qui vous paraît fonctionnel pour réaliser l'amplification d'une partie du gène de l'ARNr 16S.

- Ouvrir sérial cloner
- Cliquer sur PCR (dans la barre d'outils du haut)
- Cliquer sur « open », à droite pour ouvrir votre première séquence d'amorce sens.
- Faire de même pour l'amorce anti-sens : « open », à droite en dessous.
- Dans la fenêtre jaune s'affiche vos amorces (oligos) ainsi que leur température respective à laquelle elles sont capable de s'hybrider avec l'ADN matrice. Noter dans le tableau ci-dessous les Tm respectifs de chaque amorce.
- Sélectionner la « Target DNA » (tout en bas à droite) : l'ADN d'intérêt, ici il s'agit de votre ADN génomique de l'ARN 16S.

- Cliquer sur « Evaluate » PCR : le logiciel va **évaluer** si les amorces sont capables d'hybrider sur votre ADN matrice. Si les amorces sont capables de s'hybrider, le logiciel calcule automatiquement la taille du fragment généré (appelé amplicon), elle s'affiche en vert et est exprimée en nt pour nucléotides. **Noter la taille du fragment dans le tableau ci-dessous.**
- Cliquer sur « Run PCR », le logiciel lance la PCR virtuelle et affiche une nouvelle fenêtre vous permettant de voir la séquence de votre amplicon final obtenu.
- Cliquer sur « Align » dans la barre d'outils du haut.
- Sélectionner votre séquence obtenue intitulée PCR par défaut.
- Sélectionner votre deuxième séquence à aligner : « la séquence génomique de l'ARN16S.
- Cliquer sur « local align ».
- Déterminer quelle partie du gène ARN 16S va être amplifié : **début, fin ou milieu.**

		Séquence de nucléotides	Température de fusion des amorces avec l'ADN matrice (Tm)	Capacité à s'hybrider sur l'ADN génomique ARN16S	Taille fragments généré	Région amplifiée du gène de l'ARN16S
Couple 1	Amorce sens	5'-attgaacgctggcggcag-3' °C	Oui/Non Nucléotides (nt)	Début/Milieu/Fin
	Amorce antisens	5'-caaccggaaggcctt-3' °C	Oui/Non		
Couple 2	Amorce sens	5'-attcgctaggcattatgc-3' °C	Oui/Non Nucléotides (nt)	Début/Milieu/Fin
	Amorce antisens	5'-tgtgcccatgggatta-3' °C	Oui/Non		

Document 4 : Matériels et réactifs :

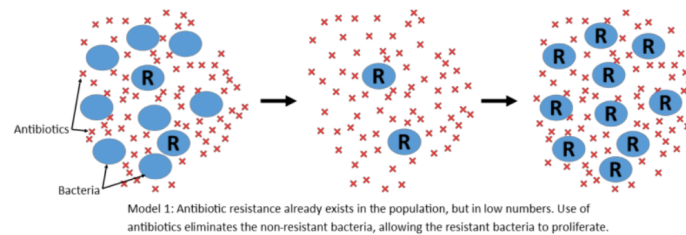
- **Mélange miniPCR EZ PCR MASTER MIX 5X, comprenant :**
 - La Taq polymérase
 - dNTP
 - Tampon PCR avec Mg2 +
 - Colorant de chargement sur gel
- **PARE Primer Mix : Mix contenant les amorces**
- **Template DNA : échantillons d'ADN à amplifier**
- 100 bp DNA Ladder, Load-Read : marqueur de taille 100 pb avec bleu de charge
- Agarose 1,6 %
- Tampon TBE 1X
- Agent révélateur de l'ADN
- Thermocycleur
- Cuve à électrophorèse de l'ADN + trans-illuminateur
- Micropipettes : 2-20 et 20-200 µL
- 5 tubes à PCR
- ADN de la Causse de la Caussenarde : 10µl
- ADN de La Cévenole 10µl
- ADN témoin négatif 10µl
- ADN témoin positif 10µl

Document 5 : d'où provient la résistance aux antibiotiques ?

La résistance aux antibiotiques est l'un des exemples les plus clairs d'évolution par sélection naturelle que l'homme ait pu observer en temps réel. En moins de 100 ans, nous sommes passés d'une résistance aux antibiotiques pratiquement inexistante à un monde où la résistance aux antibiotiques est si répandue qu'elle est considérée comme une **crise sanitaire mondiale**. Comment cela est-il arrivé si vite ?

Lorsque nous prenons un antibiotique, l'objectif est de tuer toutes les bactéries qui nous rendent malades. Mais souvent, les traitements **ne tuent pas 100 % des bactéries**. Les quelques organismes qui ont survécu après un traitement antibiotique ont probablement pu survivre parce qu'ils étaient plus résistants aux antibiotiques que tous leurs homologues qui sont morts. Si leur capacité à survivre au traitement était due à une variation génétique, lorsque ces bactéries restantes se reproduiront, elles transmettront cette résistance à leur progéniture. Lorsqu'une autre dose est prise, le cycle se répète.

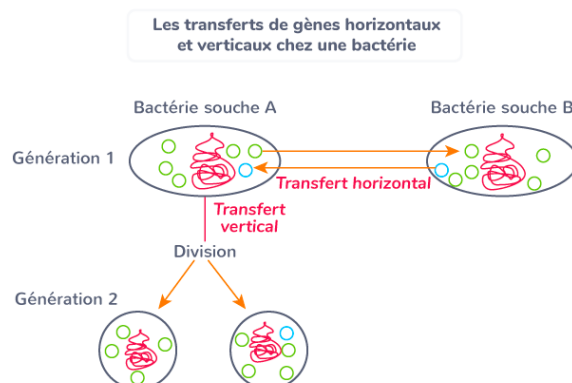
Avec le temps, après des traitements antibiotiques successifs, les seules bactéries qui resteront dans la population seront celles qui ont pu survivre parce qu'elles ont hérité de l'ensemble des gènes qui les rendaient résistantes. C'est pourquoi la résistance aux antibiotiques est aujourd'hui un tel problème en milieu hospitalier - toutes les bactéries non résistantes sont systématiquement éliminées. Les populations qui restent sont celles qui ont évolué pour survivre dans un monde où elles doivent régulièrement surmonter les traitements antibiotiques.



Les humains, bien sûr, ne sont pas les seuls animaux qui peuvent tomber malades à cause des bactéries. Les animaux d'élevage sont également sensibles aux infections bactériennes, et les agriculteurs traitent donc régulièrement leurs animaux avec des antibiotiques. En fait, plus de 70 % des antibiotiques importants sur le plan médical vendus aux États-Unis sont utilisés sur les animaux. Cela a conduit à certains des problèmes de résistance aux antibiotiques dans l'environnement que nous connaissons aujourd'hui. Depuis longtemps, une pratique courante consiste à inclure de faibles niveaux d'antibiotiques dans les aliments pour animaux. Cette utilisation constante de faibles niveaux réduit l'incidence des infections chez les animaux d'élevage et, pour des raisons essentiellement inconnues, augmente souvent le taux de croissance des animaux. Mais l'utilisation constante de faibles doses signifie que les bactéries sont soumises à une pression sélective constante. Chaque fois que des antibiotiques sont administrés, ils tuent une grande partie, mais pas la totalité, de la population bactérienne. Les bactéries qui survivent pour se reproduire le feront parce qu'elles possèdent une résistance à l'antibiotique utilisé. Comme les mêmes antibiotiques sont utilisés dans l'alimentation, année après année, les bactéries qui sont capables de survivre peuvent le faire parce qu'elles héritent de gènes qui leur confèrent une résistance.

Bien entendu, les bactéries ne restent pas éternellement à l'intérieur des animaux. Les animaux (et les hommes) répandent constamment les bactéries qui vivent en eux, par exemple, chaque fois qu'ils toussent, éternuent et, peut-être le plus important, par les excréments. Pour l'homme, c'est souvent par ce biais que les infections bactériennes se propagent, mais le problème est largement atténué par l'utilisation de systèmes modernes d'évacuation et de traitement des eaux usées. Pour les animaux de ferme, où il n'y a pas de traitement des eaux usées, cela peut être un problème majeur. Le microbiote vivant à l'intérieur des animaux de ferme est régulièrement enrichi en vue d'une résistance aux antibiotiques, et ensuite, ces organismes résistants survivants sont libérés dans l'environnement par les quantités importantes de matières fécales produites dans les fermes. Ces bactéries peuvent ensuite se propager sur des distances considérables en étant transportées dans les eaux de ruissellement provenant de la pluie ou d'autres sources.

Tout cela est d'autant plus gênant que, chez les bactéries, ces gènes de résistance peuvent se propager d'une manière différente de nos gènes. Vous obtenez votre ADN de votre mère et de votre père, et nulle part ailleurs. Les bactéries, en revanche, peuvent être un peu moins strictes quant à l'endroit où elles obtiennent de l'ADN. Les bactéries vont souvent prélever de l'ADN dans l'environnement ou échanger l'ADN des bactéries voisines sous forme de plasmide. Un plasmide est un petit segment circulaire d'ADN qui contient une origine de réplication et quelques gènes. Là où la plupart de l'ADN bactérien est transmis asexuellement directement des parents à la progéniture dans un seul génome circulaire (ce que nous appelons la transmission verticale), les plasmides peuvent être transmis à la fois verticalement et horizontalement, d'un organisme non apparenté à un autre, souvent même entre espèces différentes. Cela signifie qu'une fois que la résistance évolue dans une espèce, si ce gène de résistance finit par faire partie d'un plasmide, il peut se propager relativement rapidement à de nombreuses espèces différentes. Les gènes des plasmides peuvent même être intégrés dans le chromosome d'une bactérie, ce qui permet une transmission verticale plus stable de la résistance. Aujourd'hui, de nombreux plasmides sont transmis dans l'environnement (parfois appelés ADN_e, ou ADN environnemental) qui contiennent non pas un, mais plusieurs gènes de résistance.



En fin de compte, nous pouvons nous attendre à ce que des populations de bactéries résistantes aux antibiotiques émergent et deviennent plus courantes chaque fois que la pression sélective des antibiotiques est appliquée régulièrement. Il s'agit là, en effet, d'un puissant exemple de l'évolution en action. Toutefois, cela ne signifie pas que les bactéries changent d'une manière ou d'une autre lorsque des antibiotiques sont appliqués ; cela signifie simplement que les bactéries qui sont sensibles

Document 6 : La découverte des antibiotiques

Alexander Fleming (1881-1955) l'inventeur des antibiotiques

Une moisissure contre les microbes
En 1928, le médecin britannique Alexander Fleming travaille sur des bactéries (des microbes). Un jour, il retrouve dans son laboratoire une boîte de bactéries couvertes de moisissures. Il observe que les moisissures ont stoppé les bactéries.

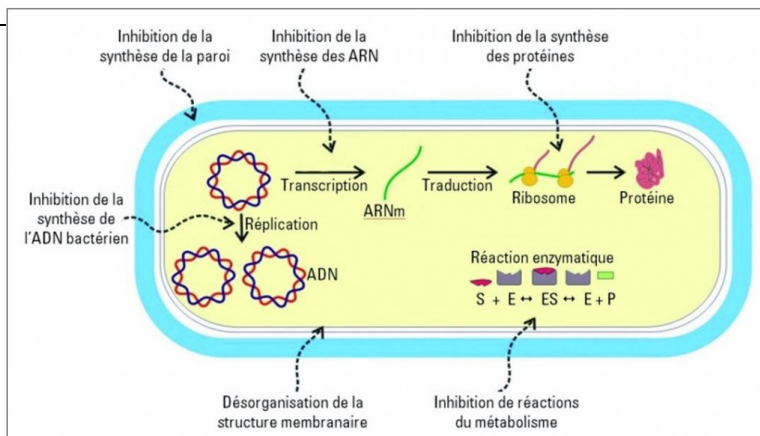
La pénicilline
Fleming pense qu'une matière produite par la moisissure peut détruire les microbes. Il l'appelle « pénicilline ». C'est le premier antibiotique. Fleming l'a découvert par hasard !

Des médicaments contre des maladies graves
En 1940, les chercheurs Ernst Chain et Howard Florey parviennent à rendre la pénicilline utilisable. Ils fabriquent les premiers médicaments antibiotiques. Grâce aux antibiotiques, les médecins vont pouvoir soigner plusieurs maladies graves comme la tuberculose et le tétanos.

Le prix Nobel
Alexander Fleming reçoit le prix Nobel de médecine en 1945 avec les savants Howard Florey et Ernst Chain. Grâce à leur découverte, la durée de vie moyenne s'est allongée de 10 ans !

La découverte et la caractérisation de la pénicilline par Alexander Fleming en 1928 est largement considérée comme l'avènement du monde moderne de la médecine antibiotique. Pour la première fois dans l'histoire de l'humanité, des infections régulièrement mortelles ont été facilement et systématiquement éliminées quelques jours après le début du traitement. En quelques décennies, plusieurs dizaines de variétés d'antibiotiques ont été introduites et mises sur le marché, et leur utilisation est considérée comme ayant permis de sauver la vie de centaines de millions de personnes.

Document 7 : Les cibles des antibiotiques



Document 8 : Mécanisme d'action des bêta-lactamases

