

## TD 1. Tout savoir sur la PCR

### I. Principe de la PCR

L'originalité de l'approche de PCR est que :

- les deux brins du fragment d'ADN d'intérêt sont dupliqués simultanément, si bien qu'à l'issue d'un cycle de synthèse, le nombre de copies du fragment qui fait l'objet de l'amplification est multiplié par deux,
- le processus de synthèse de l'ADN est répété plusieurs fois successivement si bien que comme il y a duplication de l'ADN à l'issue de chaque cycle de synthèse, l'amplification de l'ADN est exponentielle.

### II. Etapes de la PCR

Une réaction de PCR se déroule par répétitions successives des trois étapes suivantes :

1. dénaturation de la matrice d'ADN (94°C)
2. hybridation de la matrice avec les amorces (température d'hybridation «Th» à définir au cas par cas)
3. polymérisation d'ADN à partir des amorces et à l'image de la matrice (72°C).

Cet enchaînement d'étapes qui constitue un cycle d'amplification est reproduit successivement de 20 à 50 fois

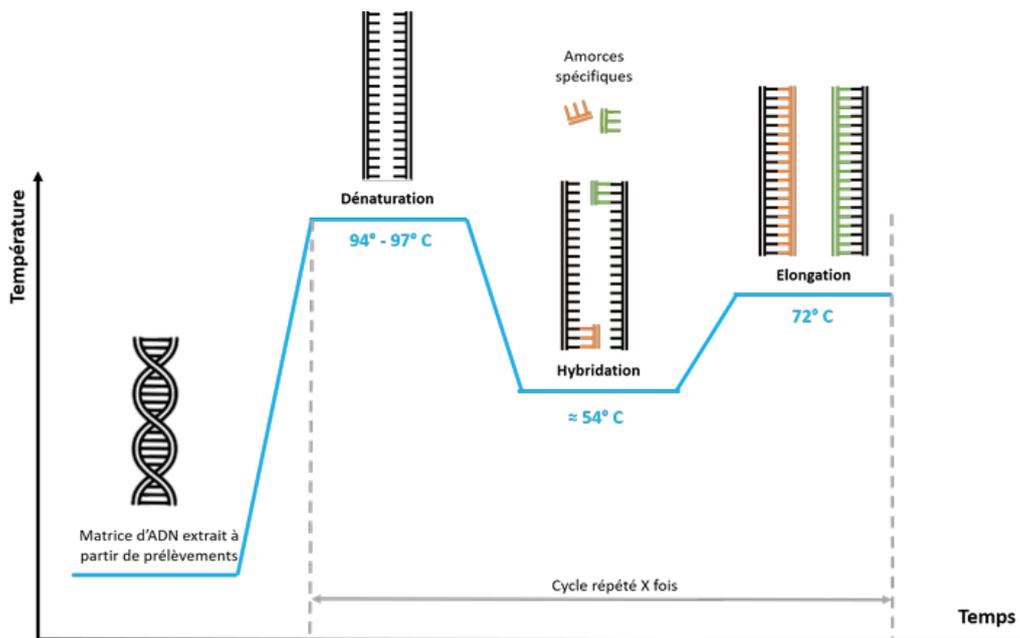


Figure 1. Profil de cycles de la température de la PCR

### Remarque

Pour que la réaction de PCR soit réalisable, on doit utiliser une ADN polymérase thermotolérante, la TAQ polymérase. Le nom de cette ADN polymérase vient de l'organisme chez qui elle a été identifiée : *Thermophilus aquaticus*, bactérie qui vit dans des sources d'eau chaude. La TAQ polymérase supporte d'être chauffée à 94°C sans se dénaturer, elle fonctionne de manière optimale à 72°C.

### III. Conditions expérimentales

- **Choix des amorces**

Le choix des amorces, qui est évidemment crucial, est entre les mains de l'expérimentateur. Pour définir et faire synthétiser les amorces, il faut en général connaître la séquence du fragment que l'on veut amplifier. A partir de la séquence disponible, il faut déterminer les enchaînements nucléotidiques à partir desquels la polymérase pourra synthétiser *de novo* les brins d'ADN.

Les amorces doivent:

- être complémentaires des brins d'ADN existants ;
- "orientées" dans le "bon" sens de façon à permettre la synthèse d'ADN de 5' en 3'.
- de tailles comprises entre 17 à 25 nucléotides
- avoir un contenu GC: ≈50 %
- avoir un faible risque de formation des structures secondaires 
- avoir une absence de complémentarité entre amorce sens et l'amorce antisens 

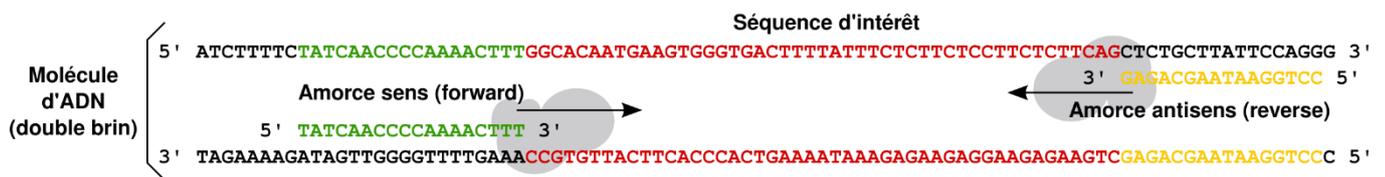


Figure 2. Hybridation des amorces sens et antisens

- **Température d'hybridation des amorces**

La température d'hybridation des amorces avec la matrice est déterminante. Elle conditionne l'existence et la spécificité de l'amplification de l'ADN.

- Si la température d'hybridation est trop élevée, les amorces ne s'hybrideront pas avec la matrice et la synthèse d'ADN ne pourra pas s'enclencher.
- Si la température d'hybridation est trop basse, les amorces risquent de s'hybrider non seulement à la position choisie mais aussi de manière non spécifique avec d'autres régions d'ADN de séquence proche de celle qui a été sélectionnée. On risque alors une amplification de fragments d'ADN autres que celui qui intéresse l'expérimentateur.

Une formule simplifiée du calcul de la température optimale d'hybridation d'une amorce est, en degrés Celsius :

$$T_h = 4 (G+C) + 2 (A+T) - 4$$

Où G, C, A et T sont respectivement les nombres de bases G, C, A et T composant l'amorce.

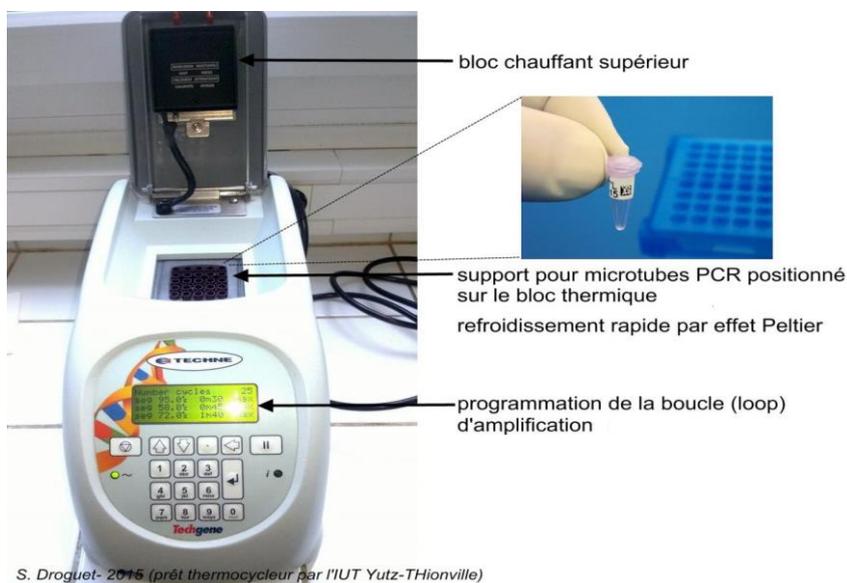
• **Réalisation pratique d'une réaction de PCR**

Pour réaliser une réaction de PCR, il faut établir le mélange réactionnel suivant :

1. l'ADN matrice,
2. les amorces oligonucléotidiques à partir desquelles la polymérisation s'enclenche,
3. les désoxyribonucléotides qui sont incorporés dans l'ADN (dATP, dCTP, dGTP et dTTP),
4. la TAQ polymérase,
5. une solution tampon appropriée au bon fonctionnement de la TAQ polymérase.

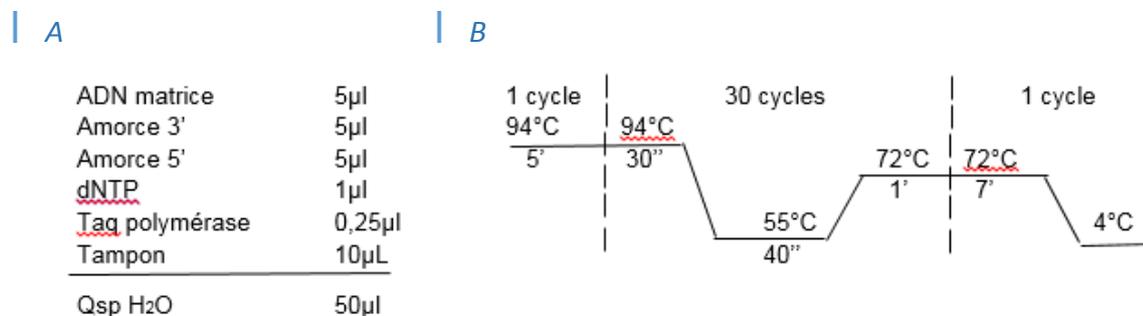
**La réaction de PCR est réalisée grâce à un appareil appelé thermocycleur**

Un thermocycleur n'est rien d'autre qu'un bain marie perfectionné qui peut changer rapidement de température pour respecter les consignes de température et de durée choisies par l'expérimentateur



S. Droguet- 2016 (prêt thermocycleur par l'IUT Yutz-THionville)

**Figure 3.** Thermocycleur pour PCR

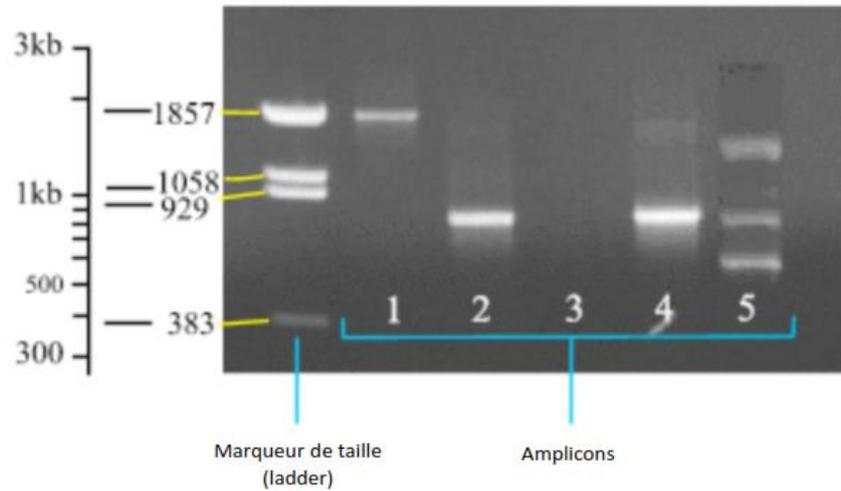


**Figure 4.** Protocole d'amplification d'un fragment d'ADN par PCR.

**A** : mélange réactionnel ; **B** : cycles de la réaction.

**IV. Visualisation du résultat de l'amplification d'ADN**

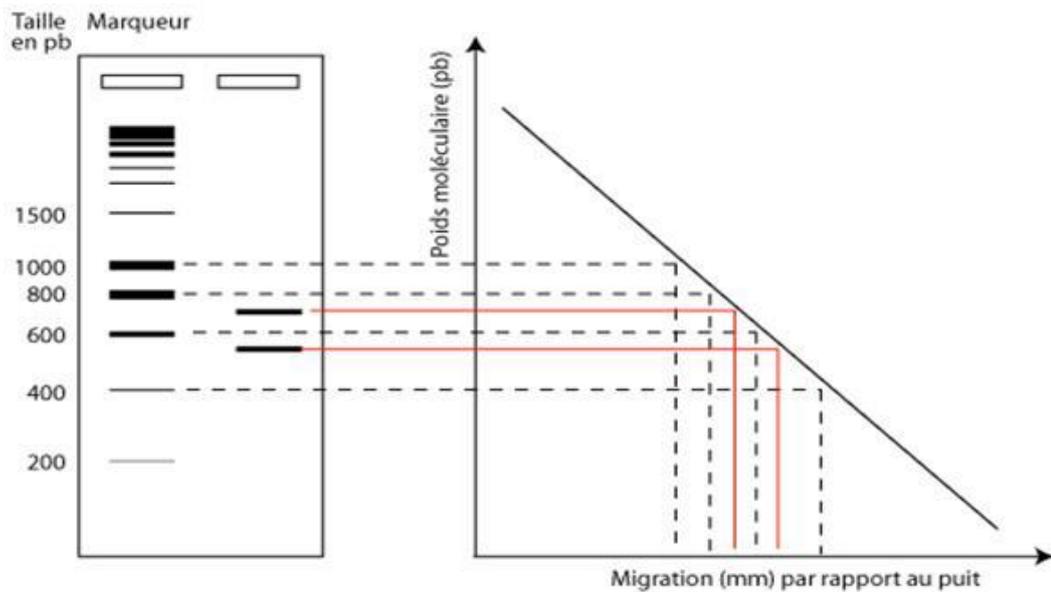
Pour visualiser le résultat d'une expérience de PCR, il suffit de faire migrer le mélange réactionnel sur un gel d'agarose et de rechercher la présence d'un fragment correspondant à la taille attendue.



**Figure 5.** Visualisation de fragments d'ADN sur gel d'agarose

**Remarque**

L'ADN chargé négativement migre vers l'électrode positive. La séparation des fragments se fait selon leur taille (les plus petits migrent le plus loin)



**Figure 6.** Principe de la séparation des fragments d'ADN sur gel d'agarose

**TD2. Réaction d'amplification génique PCR****Donner la ou les réponses justes****1. La technique de PCR**

- A) est une amplification en chaîne par la phosphorylase
- B) est une technique très sensible qui possède un risque important de contamination
- C) est fréquemment utilisée en laboratoire de biologie moléculaire
- D) repose sur 3 étapes successives : dénaturation de l'ADN, hybridation des amorces, et élongation par la RNA polymérase

**2. A propos de l'amplification par PCR**

- A) elle a révolutionné la biologie moléculaire et a permis de réaliser des tests en diagnostic prénatal avec très peu de cellules
- B) un témoin négatif est essentiel pour être sûr de ne pas avoir amplifié de l'ADN volatiles qui a contaminé notre échantillon
- C) la Taq dépolymérase est essentiel pour la PCR
- D) le laboratoire doit être organisé selon un circuit bi-directionnel

**3. Chaque cycle de la PCR comprend 3 étapes**

- A) La dénaturation permet la séparation des 2 brins de l'hélice d'ADN par une forte augmentation de température
- B) L'hybridation des amorces est une étape indispensable pour l'étape d'élongation
- C) Les amorces utilisées sont des oligonucléotides double-brin
- D) L'élongation se fait dans le sens 3' -> 5'

**4. Lors de la PCR, les étapes suivantes interviennent**

- A) la dénaturation durant laquelle les amorces se fixent sur l'ADN à amplifier.
- B) l'hybridation durant laquelle se déroule la dénaturation du fragment d'ADN double brin.
- C) l'élongation durant laquelle se déroule la fabrication des brins complémentaires dans le sens 3' -> 5'.
- D) la dénaturation se déroule à une température de 94°C et dure quelques secondes.

**5. Lors de la PCR, les acteurs suivants interviennent**

- A) ARN polymérase.
- B) Taq polymérase humaine.
- C) 1 seule amorce spécifique.
- D) 4 désoxyribonucléotiques différents (l'adénine, la cytosine, la guanine et la thymine).

**6. Après la PCR, on procède à une électrophorèse**

- A) Après la migration des fragments d'ADN, on va devoir faire une coloration pour les visualiser
- B) Le bromure d'éthidium est un agent intercalant
- C) Le bromure d'éthidium peut être nocif pour les manipulateurs de laboratoire
- D) Le bromure d'éthidium renvoie une fluorescence rose sous UV

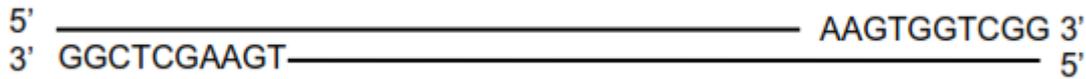
**7. L'électrophorèse**

- A) permet de confirmer l'efficacité de la PCR
- B) un champ électrique est utilisé pour faire migrer l'ADN
- C) le colorant le plus utilisé car non toxique est le bromure d'éthidium
- D) des marqueurs de poids moléculaires sont nécessaires pour estimer la taille des fragments d'ADN qui migrent

**8. Concernant la PCR en temps réel**

- A) La mesure de la fluorescence se fait pendant la phase de plateau
- B) Le risque de contamination est encore plus important par rapport à une PCR classique
- C) Il est possible de quantifier l'apparition des fragments PCR
- D) On utilise un marqueur (SYBR Green) qui a la capacité de devenir radioactif lorsqu'il est incorporé dans une double hélice d'ADN

9. On souhaite amplifier le fragment d'ADN double brin dont la séquence au niveau des extrémités est représentée sur la figure suivante.



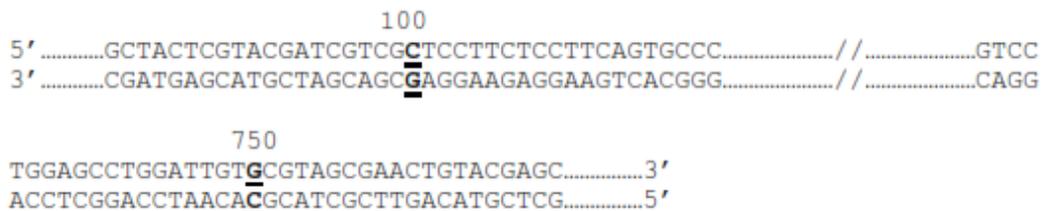
Parmi les amorces proposées, lesquelles auront une séquence compatible pour cette amplification ?

- 1) 5'-AAGTGGTCGG-3'
- 2) 5'-GGCTCGAAGT-3'
- 3) 5'-CCGACCACTT-3'
- 4) 5'-TTCACCAGCC-3'
- 5) 5'-TGAAGCTCGG-3'
- 6) 5'-GGCTCGAAGT-3'
- 7) 5'-CCGAGCTTCA-3'
- 8) 5'-ACTTCGAGCC-3'

- A) 1 et 5
- B) 2 et 6
- C) 3 et 7
- D) 4 et 8

10. Exercice

Vous voulez amplifier par PCR un fragment d'ADN compris exactement entre les positions 100 et 750 de la séquence suivante



- Q1. Des amorces de 20 nucléotides sont utilisées pour cette PCR. Donnez les séquences des oligonucléotides amorces qui vous permettront d'amplifier ce fragment d'ADN 100-750 par PCR (les nucléotides en gras et soulignés indiquent les bornes du fragment d'ADN souhaité). Précisez l'orientation 5'-3' de ces oligonucléotides.
- Q2. Donnez une définition du Tm et calculez les Tm de ces amorces [on rappelle que le Tm d'un petit oligonucléotide est donné par la formule  $Tm = 2(A+T) + 4(G+C)$ ]
- Q3. Donnez les étapes composant un cycle de cette PCR en nommant les étapes, en précisant les températures utilisées pour chaque étape et l'état moléculaire de l'ADN à la fin de chaque étape.
- Q4. Pour réaliser cette réaction PCR, que devez-vous ajouter à l'ADN étudié et aux deux oligonucléotides amorces ? Quelle particularité présente l'enzyme utilisée ?
- Q5. Quelle est la taille du fragment d'ADN obtenue pour cette PCR ? Comment effectuer cette analyse ? Précisez le mode de visualisation de l'ADN.

### TD3. PCR Multiplex pour la détection de *Campylobacter*, *Salmonella* et *Shigella*

#### 1. Présentation de la technique

Les genres *Campylobacter*, *Salmonella* et *Shigella* sont impliqués dans des infections intestinales. Ils sont recherchés dans les selles diarrhéiques dans un but diagnostique et épidémiologique. Les techniques conventionnelles d'identification permettent de rendre un résultat entre 30 et 72h après prélèvement, c'est le cas par exemple pour *Salmonella* et *Shigella* lorsqu'un enrichissement est nécessaire. La PCR permet de mettre en évidence la présence de bactéries recherchées directement à partir d'un échantillon de selles. Compte tenu de la sensibilité de cette technique certains prélèvements peuvent s'avérer positifs en PCR alors qu'ils auraient été négatifs par méthode conventionnelle. La PCR multiplexe permet d'identifier simultanément plusieurs agents dans un même échantillon. L'intérêt est le gain de temps et l'économie de matériel.

Les amorces utilisées dans cette étude permettent d'amplifier :

- Le gène *invA* des *Salmonella* ;
- Le gène *ipaH* des *Shigella* ;
- Le gène ARNr 16S de *Campylobacter*.

Tableau 1 : séquence des amorces utilisées :

Primers for multiplex real-time PCR

Pathogen	Gene	Orientation <sup>a</sup>	Primer (5'→3')	Final concn (μM)	Amplicon size (bp)	Amplicon $T_m$ (mean ± SD)
<i>Salmonella</i> spp.	<i>invA</i>	F	CATTCTATGTTCGTCATTCCATTACC	0.40	132	82.96 ± 0.05
		R	AGGAAACGTTGAAAACTGAGGATTCT			
<i>Shigella</i> spp.	<i>ipaH</i>	F	CGCGACGGACAACAGAATACACTCCATC	0.20	108	85.56 ± 0.28
		R	ATGTTCAAAAAGCATGCCATATCTGTG			
<i>Campylobacter</i> spp.	16S rRNA	F	GGATGACACTTTTCGGAGC	0.40	812	89.21 ± 0.24
		R	CATTGTAGCACGTTGTGTC			

<sup>a</sup>F, forward; R, reverse.

Le mix de réaction contient :

- Les dXTP (nucléotides) ;
- La Taq polymérase ;
- Les amorces ;
- Le tampon.

Chaque cycle est composé d'une :

- Incubation de 30s à 98°C ;
- Incubation de 30s à 65°C ;
- Incubation de 30s à 72°C.

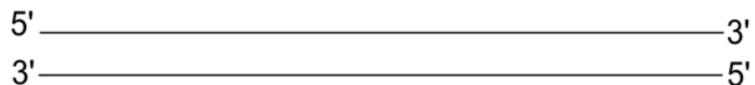
Après 30 cycles, une électrophorèse est réalisée pour mettre en évidence s'il y a eu amplification. La présence d'une bande correspondant à un amplicon recherché permet de mettre en évidence la présence de la souche dans l'échantillon de départ.

**2. Répondre aux questions suivantes**

**Q1.** Expliquer la raison pour laquelle un résultat PCR peut être positif alors qu'un ensemencement peut s'avérer négatif à partir du même prélèvement.

**Q2.** Sur la représentation schématique ci-dessous d'un gène à amplifier, placer l'amorce F et l'amorce R qui permettraient de l'amplifier. Votre schéma doit préciser l'orientation de chaque amorce et visualiser sur quel brin du gène elle s'hybride. Rappel : la Taq polymérase réalise l'élongation dans le sens 5' → 3' à partir de l'amorce.

Schéma du gène à amplifier :

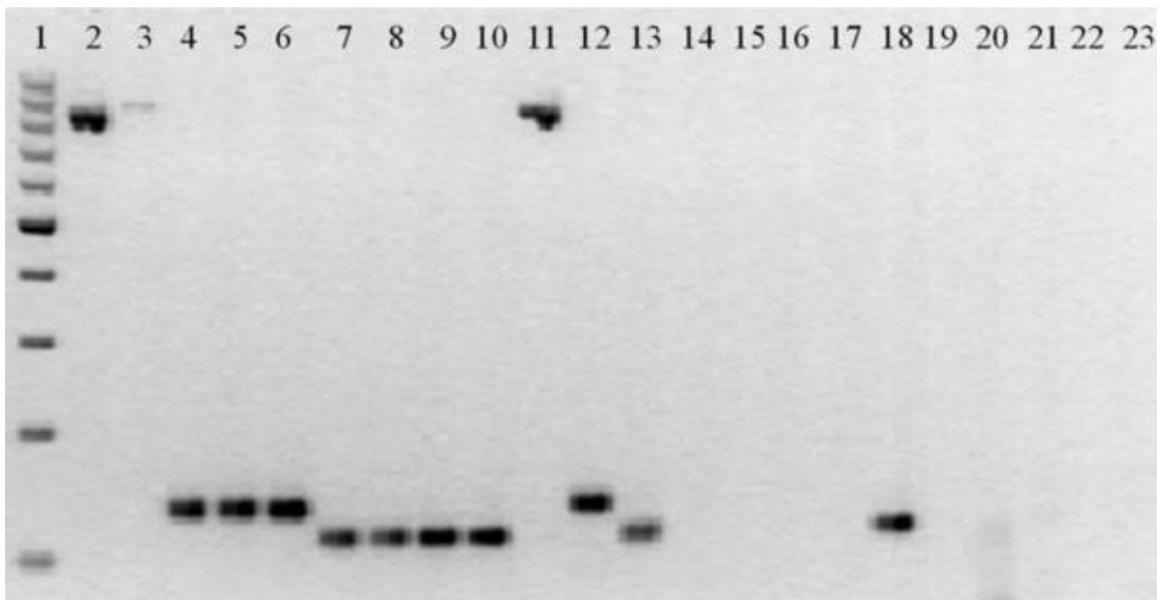


**Q3.** Indiquer le nom des dXTP présents dans le mix.

**Q4.** Expliquer la raison pour laquelle une PCR multiplexe est plus économique en temps et en matériel qu'une PCR classique.

**Q5.** Le document ci-dessous présente des résultats obtenus lors de la validation de la méthode. Actuellement la mise en évidence des micro-organismes par cette technique dans les selles est toujours suivie d'une identification classique et d'un sérotypage. Commenter ces résultats et expliquez l'intérêt de maintenir une identification classique.

Résultats obtenus pour la PCR multiplexe sur différents souches témoins :



Électrophorèse en gel d'agarose (2%) pour différents échantillons. De gauche à droite : 1, marqueurs de taille d'échelle 100pb ; 2, Témoin *Campylobacter coli*; 3, Témoin *Campylobacter jejuni*; 4, *Salmonella enteritidis*; 5, *S. infantis*; 6, *Salmonella* spp.; 7, *Salmonella boydii*; 8, *S. dysenteriae*; 9, *S. flexneri*; 10, *S. sonnei*; 11, *C. jejuni* subsp. *jejuni* ATCC 33560; 12, *S. enteritidis* ATCC 13076; 13, *S. flexneri* ATCC 12022; 14, diffusely adherent *E. coli*; 15, enteroaggregative *E. coli*; 16, enteropathogenic *E. coli*; 17, enterotoxigenic *E. coli*; 18, enteroinvasive *E. coli*; 19, Shiga-like toxin producer *E. coli*; 20, *E. coli* K-12; 21, *Pseudomonas aeruginosa*; 22, *Klebsiella pneumoniae*; 23, *Proteus mirabilis*

Bibliographie: Multiplex Real-Time PCR for detection of *Campylobacter*, *Salmonella* and *Shigella* F.Barletta, E. H. Mercado, A. Lluque, J. Ruiz, T. G. Cleary, and T. J. Ochoa. J Clin Microbiol. 2013 Sep

## TD 4. Typage épidémiologique

### Répondre par vrai ou faux

1. Une pandémie est l'apparition d'une maladie au sein d'une population ou une collectivité dans une région donnée.

- Vrai
- Faux

2. Une maladie sporadique est une maladie qui se déclare occasionnellement à des intervalles irréguliers dans une population déterminée.

- Vrai
- Faux

3. Les techniques de typage phénotypiques ont pour avantage de donner des résultats rapides.

- Vrai
- Faux

4. Le sérotypage est une technique sérologique qui est utilisée pour distinguer des souches de microorganismes présentant des similitudes dans la composition antigénique.

- Vrai
- Faux

5. L'électrophorèse en champ pulsé est une technique de typage basée sur la restriction enzymatique de l'ADN génomique dans une matrice d'agarose (plug).

- Vrai
- Faux

6. Les techniques de micro-restriction nécessitent l'utilisation d'enzymes de restriction à faible fréquence de site de coupure

- Vrai
- Faux

7. Les techniques d'amplification génique et de restriction enzymatique génèrent des fragments d'ADN de tailles différentes que l'on fait migrer dans un champ électrique afin de les séparer en fonction de leurs tailles.

- Vrai
- Faux

8. Les gènes de ménage sont des gènes stable dans le temps (exp : gènes du métabolisme)

- Vrai
- Faux

9. La rep-PCR nécessite une hybridation d'amorces en condition de faible stringence (~35°C)

- Vrai
- Faux

10. La AFLP est une méthode qui combine le profil de restriction et le séquençage

- Vrai
- Faux

**Exercice.**

L'isolement successif, chez une même patiente, de souches de *Pseudomonas aeruginosa* de plus en plus résistantes aux antibiotiques a conduit à la réalisation d'une enquête épidémiologique afin de comparer ces différents isolats. Six souches isolées successivement chez cette patiente ont été comparées par une méthode phénotypique, l'antibiotypie, et par une méthode génomique, l'électrophorèse en champ pulsé (Tableau 1 ; Figure 1).

**Q1.** Que montrent les résultats obtenus ?

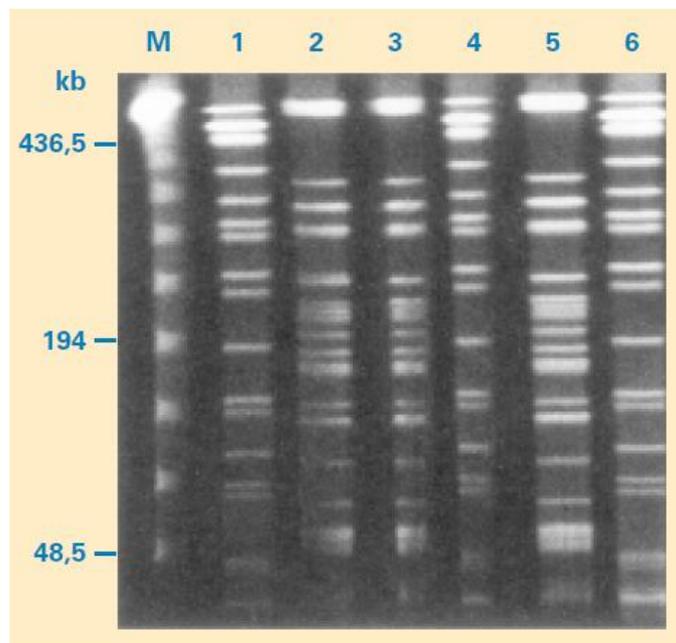
**Q2.** Pourquoi le marqueur phénotypique ne suffit-il pas ?

**Tableau 1.** Caractéristiques épidémiologiques de six souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées successivement chez une même patiente

Souche	Jours d'hospitalisation	Site d'isolement	Antibiotype	Pulsotype
1	J1	Plaie abdominale	Sensible	A
2	J30	Expectoration	Résistant IPM	B
3	J43	Expectoration	Résistant IPM	B
4	J70	Urines	Multirésistant BLSE	A
5	J70	Expectoration	Résistant IPM + CAZ	B
6	J90	Urines	Multirésistant BLSE	A

IPM : imipénème, CAZ : ceftazidime, multirésistant : souche productrice de bêta-lactamase à spectre étendu (BLSE) inactivant la plupart des bêta-lactamines et présentant des résistances associées à d'autres familles d'antibiotiques comme les aminosides, par exemple.

IPM : Imipénème ; CAZ : Ceftazidime ; Multirésistant : souches présentant des résistances à plusieurs familles d'antibiotiques



**Figure 1.** Gel d'électrophorèse en champ pulsé de l'ADN de 6 souches de *Pseudomonas aeruginosa*. Pistes 1 à 6 : souches 1 à 6 présentées dans le tableau 1. Piste M : marqueur de poids moléculaire. Les valeurs de poids moléculaire sont indiquées sur la gauche en kilobases (Kb).

Bibliographie : Typage épidémiologique et *Pseudomonas aeruginosa*. H. Marchandin, M. Siméon de Buochberg, H. Jean-Pierre, C. Carrière. La Lettre du Pneumologue –mai-juin 2002