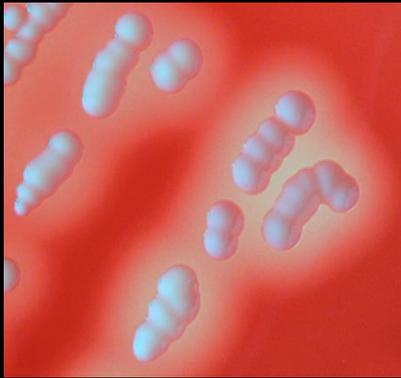


LES OUTILS DE DIAGNOSTIC MOLECULAIRE

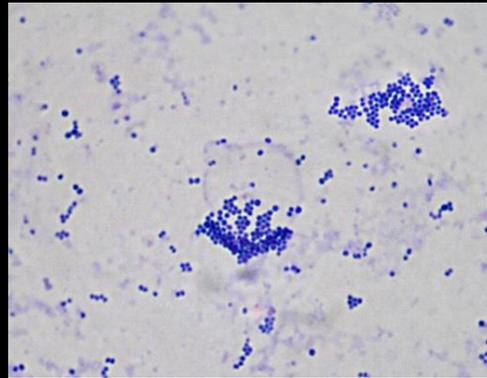
APPORT DE LA BIOLOGIE MOLECULAIRE DANS LA CARACTERISATION ET L'IDENTIFICATION DES BACTERIES

Les techniques de biologie moléculaires sont de plus en plus utilisées dans les laboratoires spécialisés pour l'identification des bactéries quand les techniques traditionnelles sont déficientes.

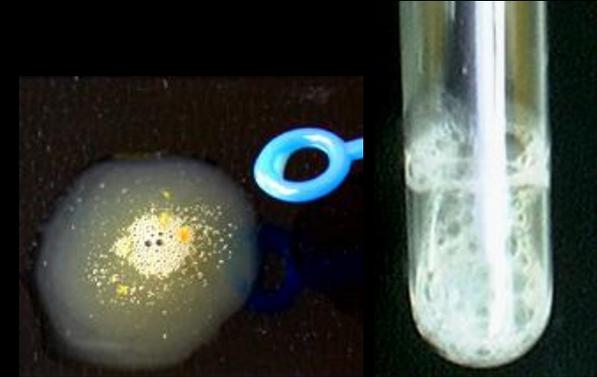
IDENTIFICATION PHENOTYPIQUE DES BACTERIES



Mise en culture sur gélose



Coloration de Gram



Catalase



Ensemencement galerie Api

LIMITES DE L'IDENTIFICATION PHENOTYPIQUE

MARQUEURS	PRINCIPES	AVANTAGES	INCONVENIENTS
BIOTYPE	- Détection du profil morphologique, biochimique (auxanogramme...)	- facile - automatisé et couplé au système d'identification (API ...)	- peu discriminant - peu reproductible car pouvant être influencé par facteurs techniques ou environnementaux
ANTIBIOTYPE	- Antibiogramme	- facile - automatisé - signal d'alerte dans l'apparition d'un phénotype multirésistant	- peu discriminant - variabilité génétique de la résistance aux antibiotiques, présence de plasmides - pression de sélection - système souvent expertisé conduisant à une homogénéisation des phénotypes de résistance
SEROTYPE	- Détection de la présence de déterminants bactériens	- facile - rapide - standardisé pour certaines bactéries (Salmonella, E. coli, méningocoque...)	- antisérums coûteux ou non commercialisés - toutes les souches ne sont pas sérotypables - faible pouvoir discriminant - instabilité des déterminants antigéniques : recombinaison
LYSOTYPE	- Sensibilité d'une souche à un panel de phages (résistance ou lyse)	- utilisable pour subdiviser les sérotypes ou typer les souches non sérotypables	- technique lourde - approvisionnement difficile en phages actifs et souches témoins - manque de standardisation - faible reproductibilité
BACTERIOCINOTYPE	- méthode basée sur la sensibilité de certaines souches (pousse inhibée) vis-à-vis de substances (bactériocines) élaborées par d'autres souches bactériennes	- peu coûteuse - technique standardisée pour certaines bactéries	- technique lourde - faible pouvoir discriminant
ELECTROPHORESE DES PROTEINES	- variations dans la structure des protéines bactériennes détectée par électrophorèse	- applicables à toutes les bactéries	- peu discriminant - interprétation difficile en raison du grand nombre de bandes
ANALYSE DES ISOENZYMES : MULTILOCAR ENZYME TYPING	- séparation des protéines cellulaires par électrophorèse et révélation par leur substrat spécifique : électromorphes ; distinction des différents allèles codant pour une même enzyme	- marqueur fiable capable de détecter une mutation à l'intérieur du gène de structure d'une enzyme (profil électrophorétique différent, ou activité fonctionnelle différente) - marqueur peu soumis à la pression de sélection	- technique lourde - problème de standardisation

LIMITES DE L'IDENTIFICATION PHENOTYPIQUE

Marqueurs phénotypes peu à peu abandonnés car :

- pouvoir discriminant et reproductibilité médiocres
- faible stabilité : subissent une variation adaptative due à la sélection naturelle
- faible typabilité : existe un grand nombre de souches non typables (dites phénotypiquement nulles)
- variations observées qualitatives et ne permettant pas d'évaluer le degré de parenté entre souches



avènement des marqueurs génotypiques plus discriminants, plus reproductibles

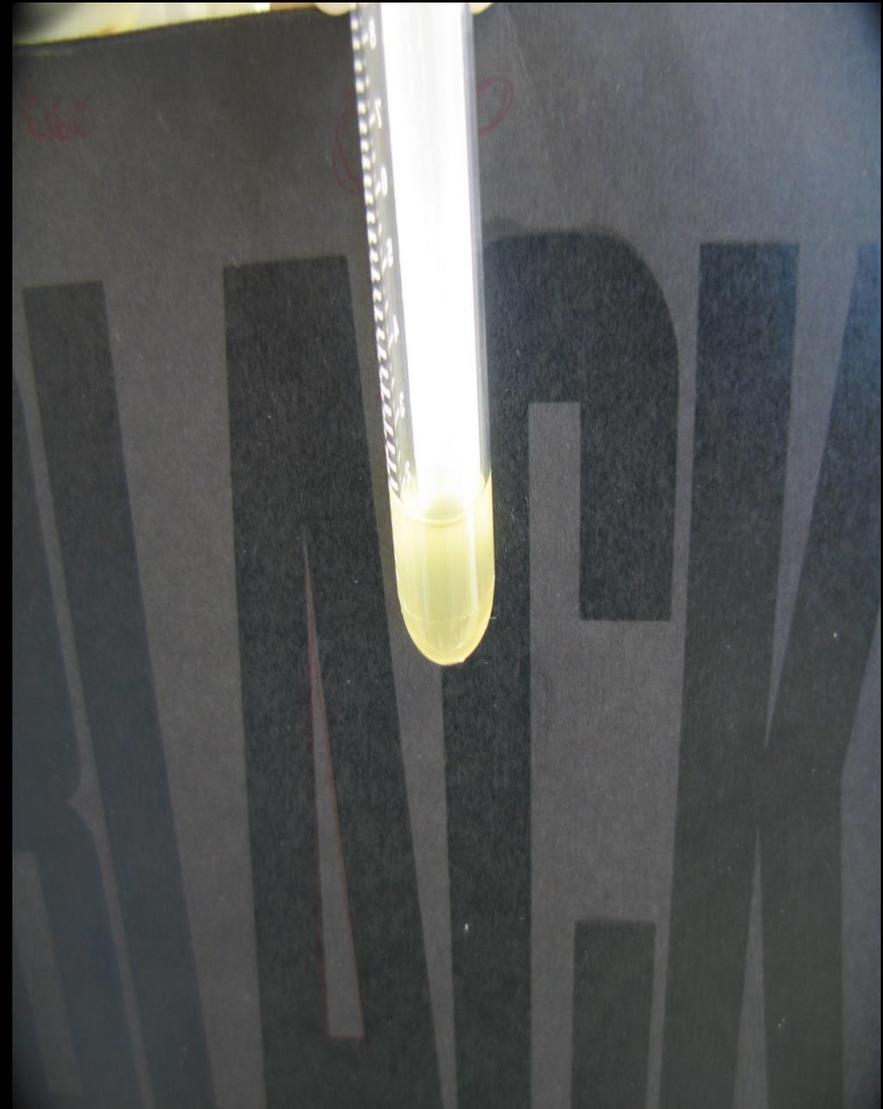
MARQUEURS GENOTYPIQUES

- METHODES DE TYPAGE PAR RESTRICTION DE L'ADN

- METHODES DE TYPAGE PAR AMPLIFICATION DES GENES

Procédure d'extraction de l'ADN de bactérie

- **BACTERIES :**
- Mise en culture des bactéries
- Mettre dans un tube eppendorf
- Centrifuger
- Éliminer le milieu de culture
- Mettre le tampon (SDS+NaCl+TE)
- Agiter puis rajouter l'éthanol
- Mettre dans le réfrigérateur
- Récupérer la pelote supposée être de l'ADN



METHODES DE TYPAGE PAR RESTRICTION DE L'ADN

- électrophorèse en champ pulsé
- ribotypage
- AFLP ou IRS-PCR

METHODES DE TYPAGE PAR RESTRICTION DE L'ADN

- électrophorèse en champ pulsé ou (PFGE)

- Technique de caractérisation moléculaire qui compare le matériel génétique (ADN chromosomique) d'une même espèce
- Technique la plus utilisée actuellement (technique de référence)
 - grande résolution
 - pouvoir discriminant supérieur à celui des autres marqueurs
 - applicable à de nombreuses espèces bactériennes
 - très bonne reproductibilité

METHODES DE TYPAGE PAR RESTRICTION DE L'ADN

- électrophorèse en champ pulsé ou (PFGE)

Cette technique est utilisée pour la séparation des molécules d'ADN de haut poids moléculaire (15 -100 kb).

Dans cette gamme de taille (au-delà de 20 kb), les molécules ne sont plus séparées par les méthodes classiques, car la migration devient indépendante de la taille (le déplacement de ces molécules cylindriques ayant toutes le même diamètre s'effectuant par "reptation").

L'emploi de deux champs orthogonaux utilisés en alternance fait que les molécules d'ADN, qui mettent un certain temps à s'orienter dans le sens du champ électrique, ne migrent que lorsque celle-ci est réalisée.

Le temps nécessaire à l'orientation est d'autant plus grand que la molécule d'ADN est longue.

Gel electrophoresis can be used to separate DNA fragments. Electrophoresis uses an electric current to separate different-sized molecules in a porous, sponge-like matrix. Smaller molecules move more easily through the gel pores than larger molecules.

Click to continue



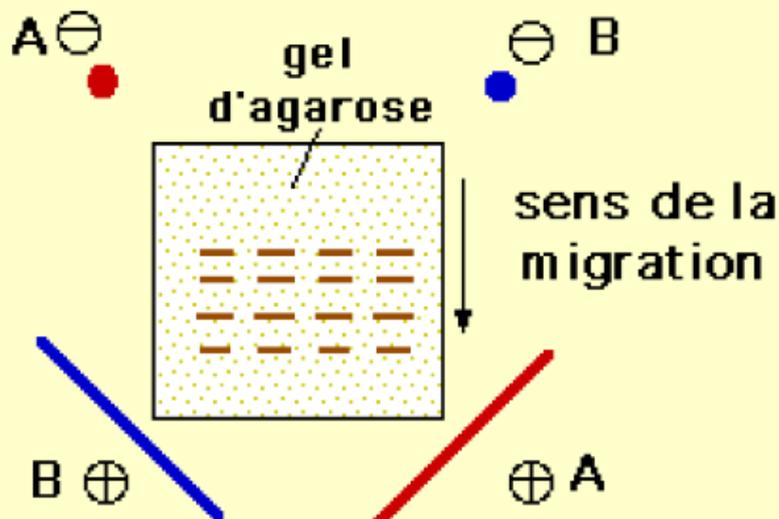
METHODES DE TYPAGE PAR RESTRICTION DE L'ADN

- électrophorèse en champ pulsé ou (PFGE)

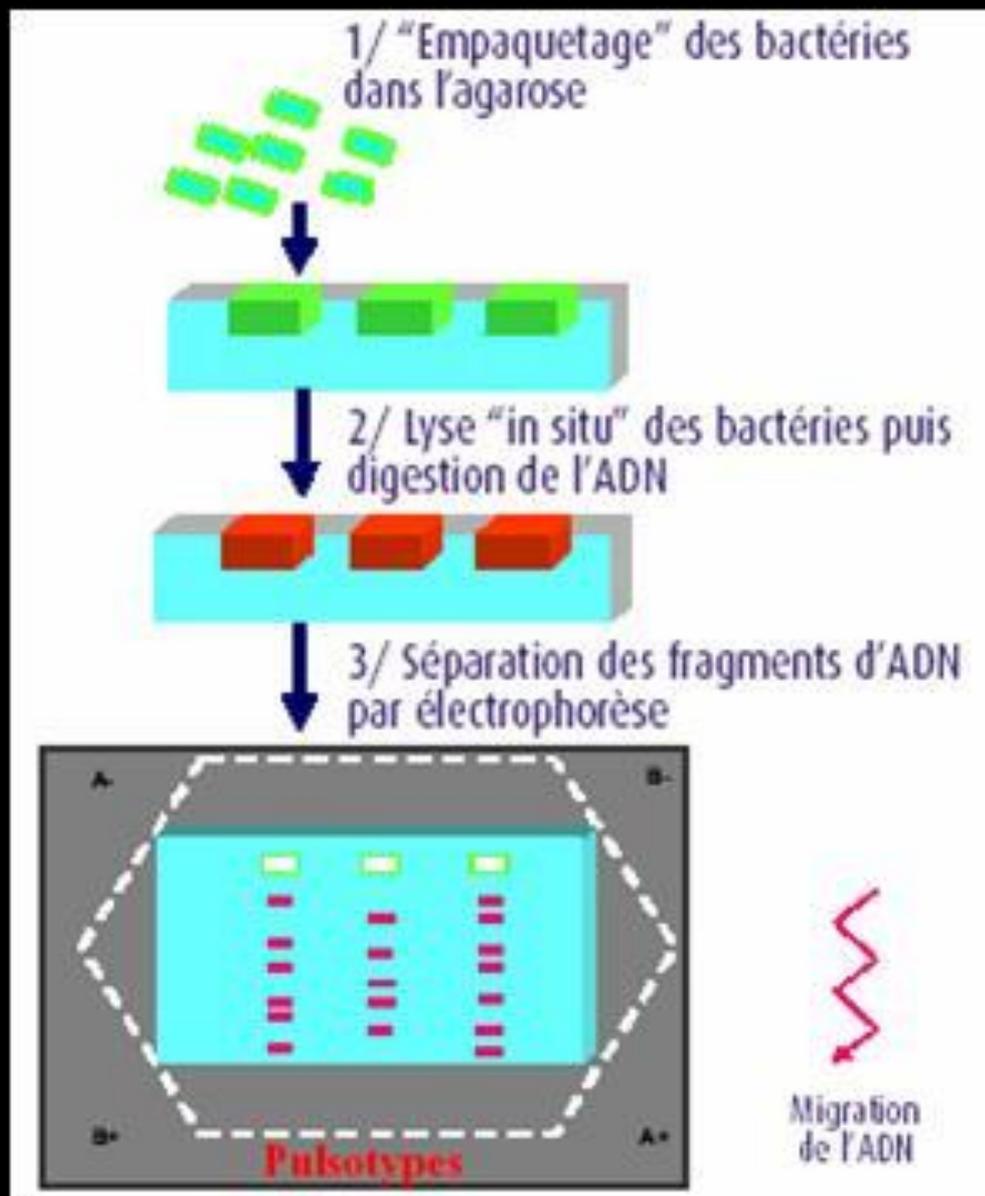
PRINCIPE DE LA TECHNIQUE

- isolement des souches, cultures
- intégration des bactéries dans des blocs d'agarose (« plug »)
- lyse in situ des bactéries
- digestion par endonucléase(s) de restriction avec un faible nombre de site de coupure = **macrorestriction**
- séparation des fragments d'ADN (10 à 800 kb) par électrophorèse en champ pulsé
→ profils de restriction = **pulsotypes**
- analyse des pulsotypes par logiciel → **dendogrammes**

METHODES DE TYPAGE PAR RESTRICTION DE L'ADN électrophorèse en champ pulsé ou (PFGE)



On utilise en alternance les couples d'électrodes A ou B



METHODES DE TYPAGE PAR RESTRICTION DE L'ADN

électrophorèse en champ pulsé ou (PFGE)

CRITERES D 'INTERPRETATION

- souche contrôle dans chaque gel
- échelle de HPM (Haut poids moléculaire)
- minimum de 10 bandes requis par profil
- interprétation pour une analyse visuelle selon les critères de Tenover (1995) :
 - Profil identique: souches indifférenciables
 - Différence de 1 à 3 bandes (1 événement génétique) : parenté probable
 - Différence de 4 à 6 bandes (2 événements génétiques) : parenté possible
 - Différence $>$ 6 bandes (plus de 3 événements génétiques) : souches non reliées

METHODES DE TYPAGE PAR RESTRICTION DE L'ADN

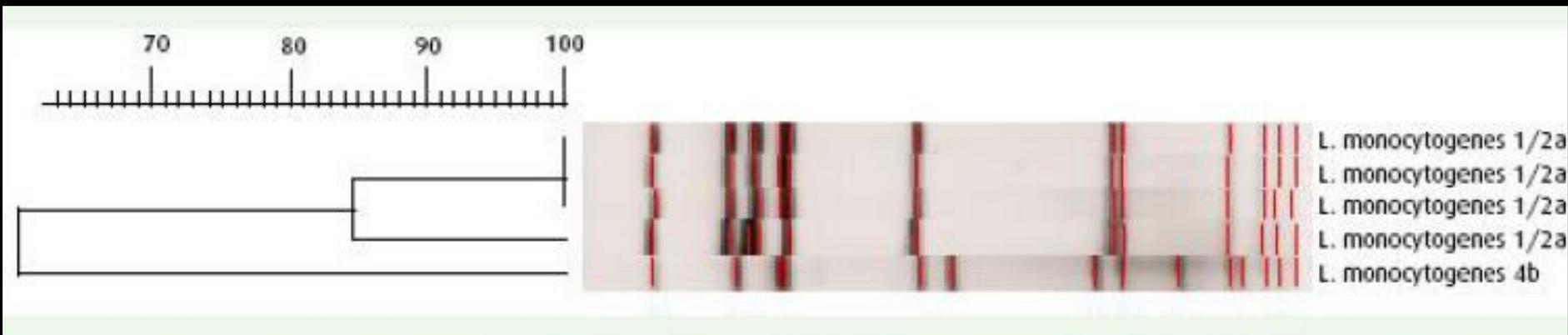
électrophorèse en champ pulsé ou (PFGE)

CRITERES D'INTERPRETATION

- analyse des différents profils : logiciel (ex : Taxotron® sur MAC Gelcompar® sur PC)
- utilisation du coefficient de DICE = % de similitude entre les souches testées
coefficient de DICE > 80% → appartenance au même clone

$$\text{Coefficient de Dice} = \frac{\text{nombre de fragments communs} \times 2}{\text{nombre total de fragments dans les 2 profils}}$$

- obtention du dendrogramme



METHODES DE TYPAGE PAR RESTRICTION DE L'ADN

électrophorèse en champ pulsé ou (PFGE)

Avantages :

- pouvoir discriminant important
- grande résolution, bonne reproductibilité intra-laboratoire
- applicable à un grand nombre d'espèces

Inconvénients :

- technique longue : 4 à 5 jours en moyenne (5j en moyenne/12 souches)
- technique coûteuse: appareillage, logiciel, réactifs et temps
- technique délicate, manuelle, nécessitant du personnel qualifié
- résultats obtenus non standardisés (comparaison de profils limitées à des souches isolées dans le même temps et au sein d'un même laboratoire)

METHODES DE TYPAGE PAR RESTRICTION DE L'ADN

Ribotypage

Analyse RFLP par Southern-blot de l'ADN

- Etude de l'identification basée sur le polymorphisme des fragments de restriction de l'ADN codant pour les ARNr
- ADN codant pour les ARNr (opérons) :
 - structure stable, conservée dans le temps
 - nombre variable d'opérons selon les bactéries (1 à 11)
 - hybridation avec sonde « universelle » : ARN16s et 23s d'*E. coli*
- Profil obtenu caractéristique d'une espèce (taxonomie) ou variations intra-espèces (épidémiologie)

METHODES DE TYPAGE PAR RESTRICTION DE L'ADN

Analyse RFLP par Southern-blot de l'ADN

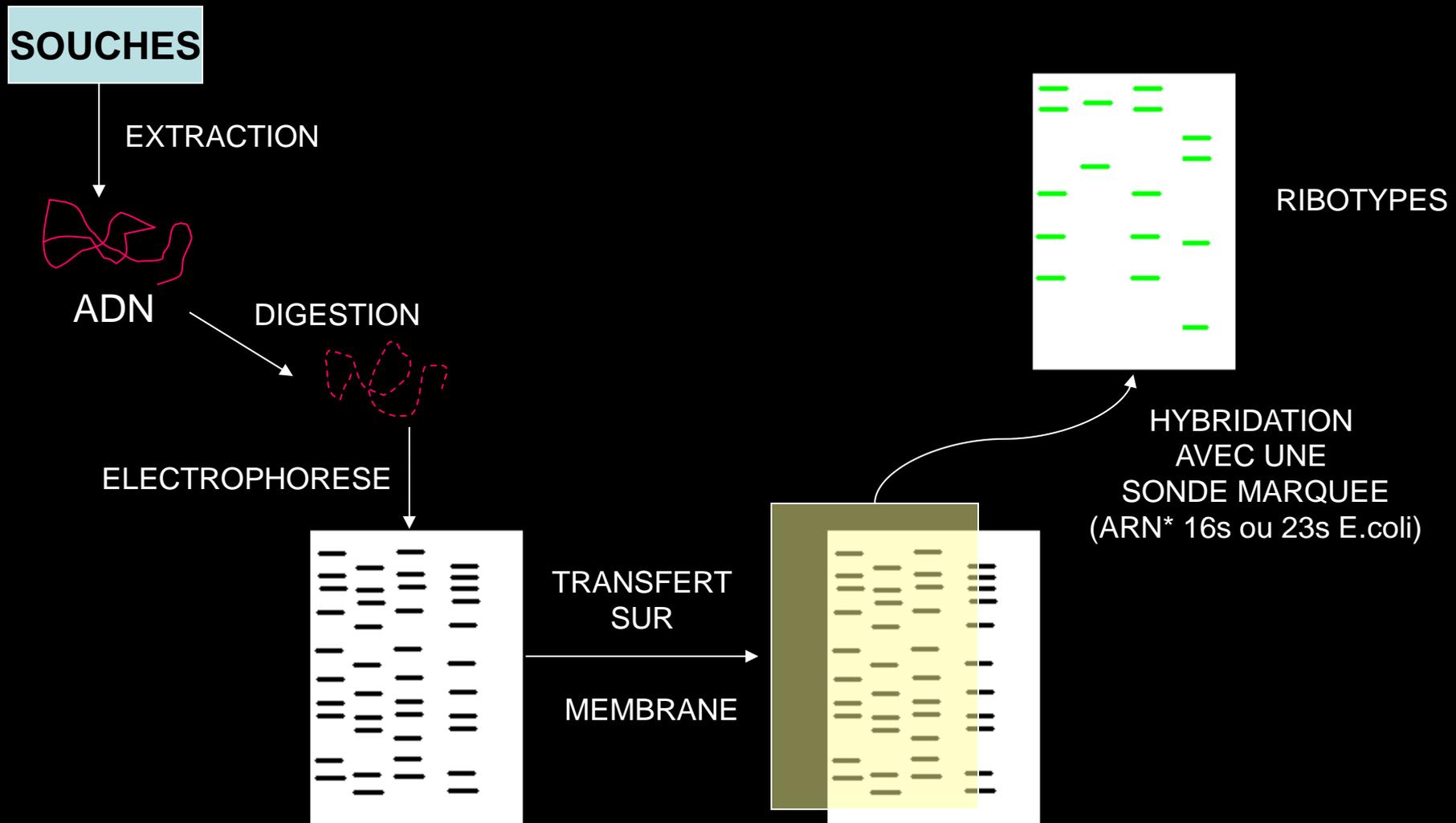
Principe de la technique

- Isolement des bactéries, culture
- Digestion par endonucléase(s) de restriction possédant de fréquents sites de coupure
- Migration électrophorétique → nombreuses bandes (0,5 à 50 kb)
- Transfert du gel sur filtre (nitrocellulose ou nylon) = principe du Southern
- Hybridation de l'ADN par sondes nucléiques : ARN16s/23s *E. coli*

METHODES DE TYPAGE PAR RESTRICTION DE L'ADN

Analyse RFLP par Southern-blot de l'ADN

Principe de la technique



METHODES DE TYPAGE PAR RESTRICTION DE L'ADN

Analyse RFLP par Southern-blot de l'ADN

Principe de la technique

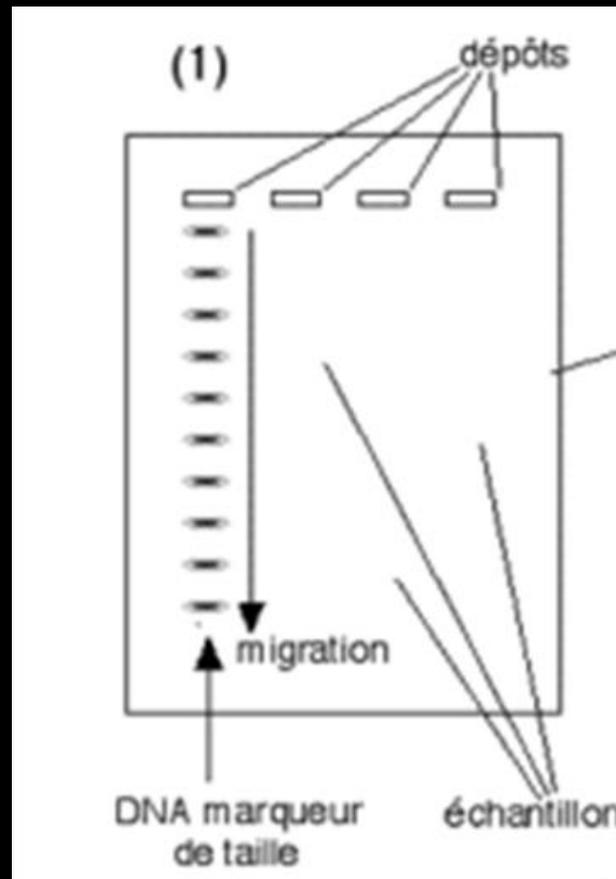
Le Southern blot est une technique mise au point par Edward M. Southern en 1975 pour rechercher des fragments de DNA sur une électrophorèse en les hybridant avec une sonde complémentaire.

METHODES DE TYPAGE PAR RESTRICTION DE L'ADN

Analyse RFLP par Southern-blot de l'ADN

Principe de la technique

1. Après avoir digéré le DNA par une enzyme de restriction, on obtient un mélange de très nombreux fragments de restriction. On soumet ces fragments à un électrophorèse pour les faire migrer dans un gel de haut en bas en fonction inverse de leur taille.

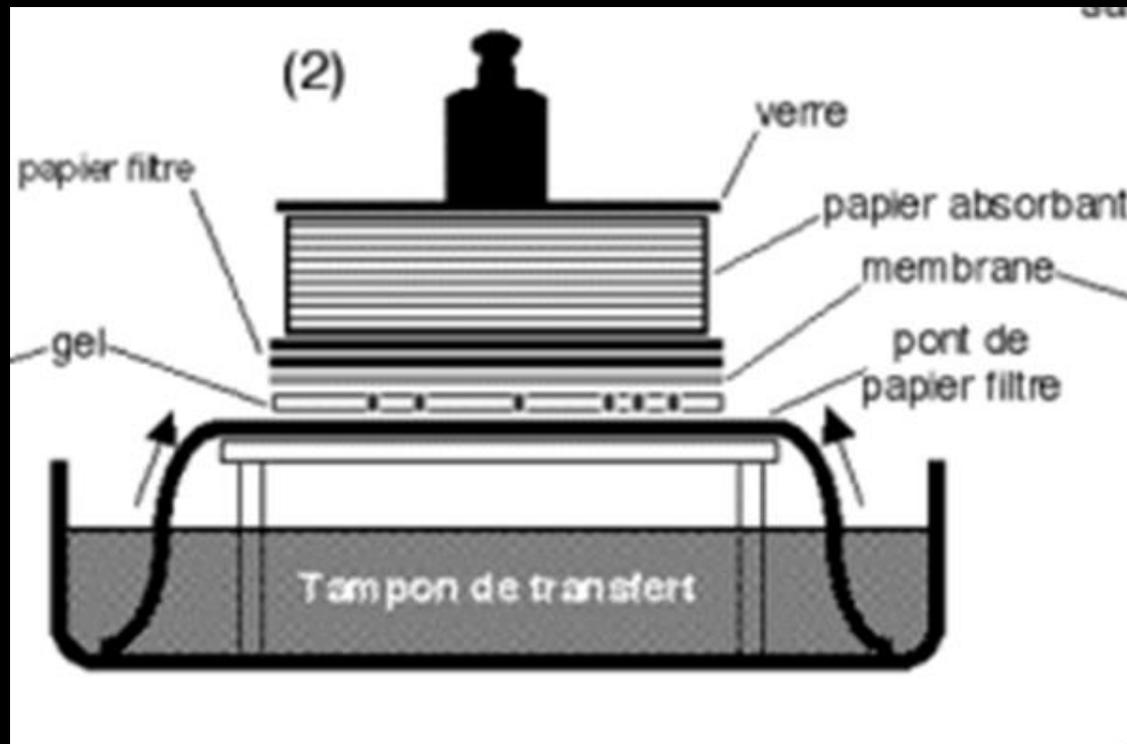


METHODES DE TYPAGE PAR RESTRICTION DE L'ADN

Analyse RFLP par Southern-blot de l'ADN

Principe de la technique

2. On fait un montage pour faire passer les fragments grâce à une montée de tampon imprégnant le gel puis une membrane de nylon où le DNA va se fixer par des liaisons stables.

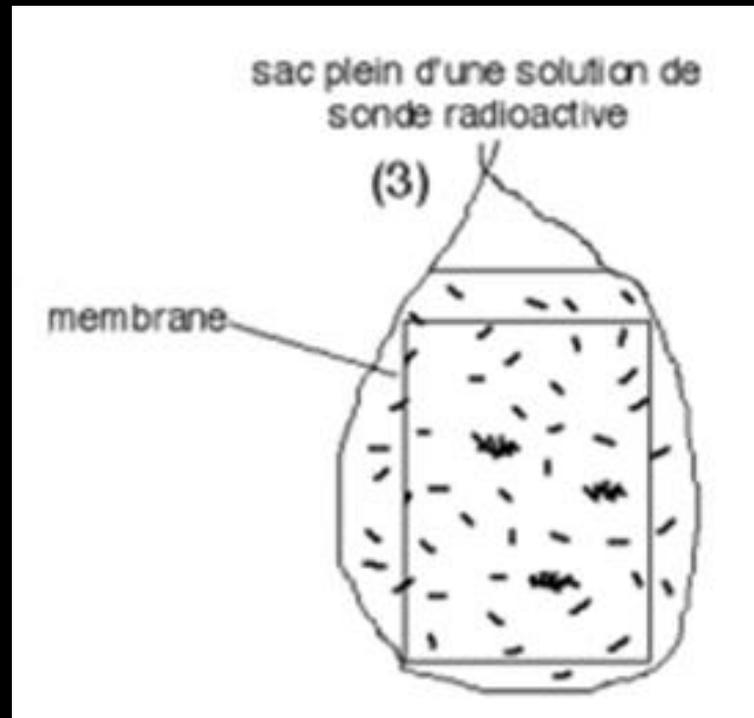


METHODES DE TYPAGE PAR RESTRICTION DE L'ADN

Analyse RFLP par Southern-blot de l'ADN

Principe de la technique

3. La membrane de nylon avec le DNA fixé est alors mise à incuber dans un sac contenant une solution d'une sonde radioactive complémentaire du fragment de DNA qu'on recherche, à une température assez basse pour que l'hybride se forme mais assez élevée pour que cet hybride soit parfaitement complémentaire.



METHODES DE TYPAGE PAR RESTRICTION DE L'ADN

Analyse RFLP par Southern-blot de l'ADN

Principe de la technique

4. On lave la membrane des molécules de la sonde qui ne sont pas fixées à leur DNA complémentaire, puis on la met en présence d'un film radiographique vierge dans une enceinte opaque pour que la sonde radioactive fixée sur les fragments de DNA complémentaires impressionne le film.

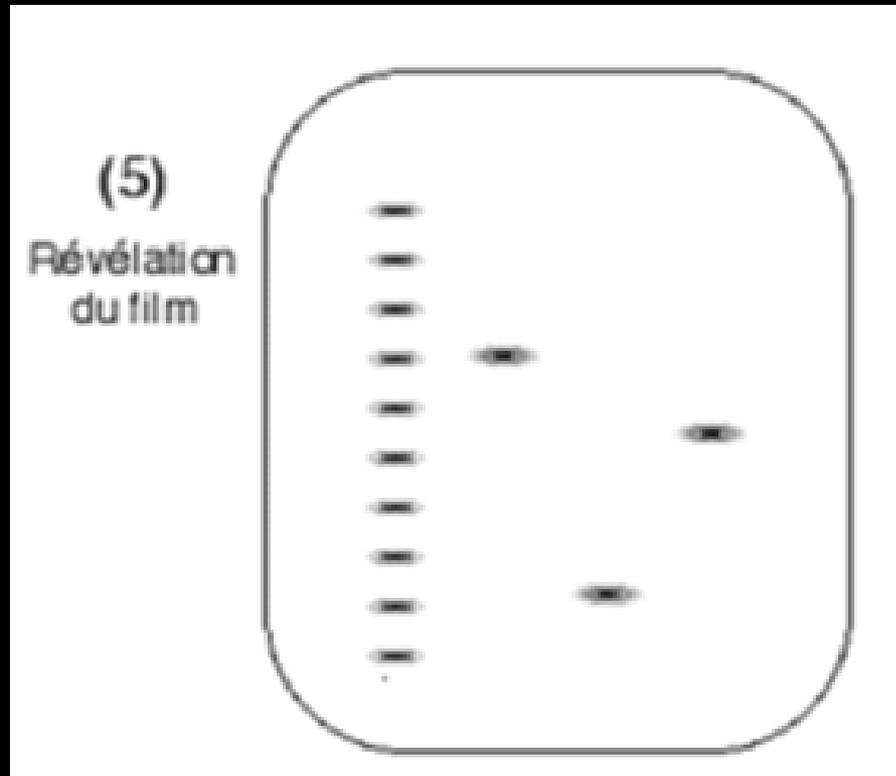


METHODES DE TYPAGE PAR RESTRICTION DE L'ADN

Analyse RFLP par Southern-blot de l'ADN

Principe de la technique

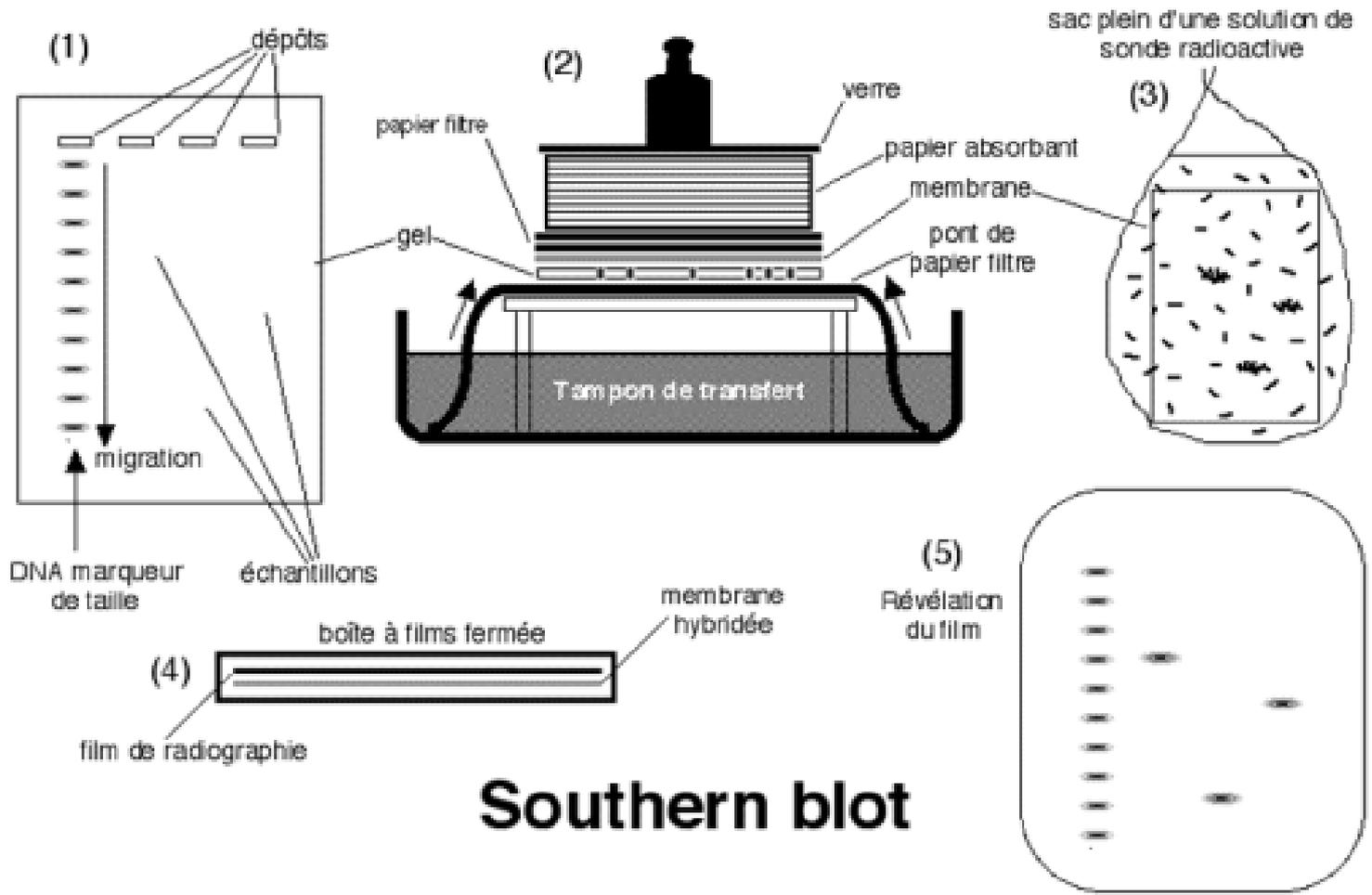
5. On révèle le film où des taches noires (sur le négatif) correspondent aux emplacements où ont migré les fragments d'ADN complémentaires de la sonde. On compare les distances de migration avec des fragments de DNA radioactifs de tailles connues qui servent de marqueurs de taille.



METHODES DE TYPAGE PAR RESTRICTION DE L'ADN

Analyse RFLP par Southern-blot de l'ADN

Principe de la technique



Southern blot

METHODES DE TYPAGE PAR RESTRICTION DE L'ADN

Analyse RFLP par Southern-blot de l'ADN

Avantages :

- technique automatisable (Riboprinter®, Qualicon®) donc plus rapide (32 ribotypes/j)
- technique reproductible et standardisée (résultats comparables entre laboratoires)
- marqueur taxonomique et épidémiologique

Inconvénient

- procédure complexe et longue si manuelle
- pouvoir discriminant plus faible que PFGE, ribotype caractéristique d'espèce uniquement pour certaines bactéries
- problème de standardisation notamment au niveau technique

METHODES DE TYPAGE PAR RESTRICTION DE L'ADN

AFLP (amplified fragment length polymorphism) et IRS-PCR (infrequent restriction site-PCR)

méthode combinant : profil de restriction et PCR

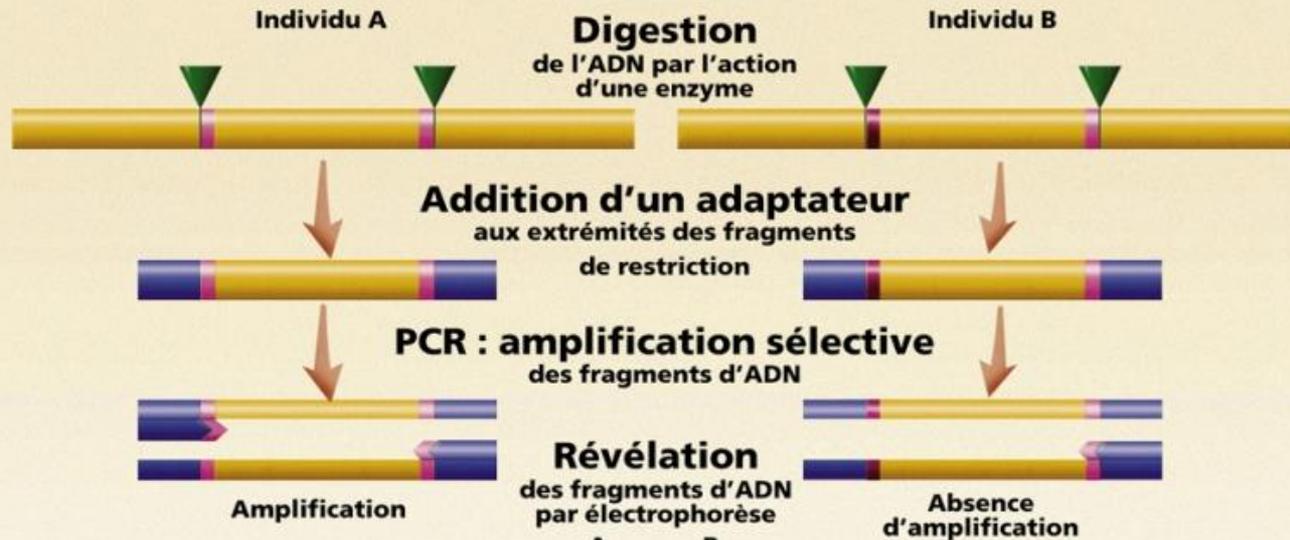
- **restriction** de l'ADN génomique par une ER à fréquence de coupure élevée et une ER à fréquence de coupure faible
- ligation d'adaptateurs (oligonucléotides doubles brins) aux extrémités des fragments de restriction
- **PCR** avec sélections d'amorces complémentaires des adaptateurs + 1 base
 - amplification sélective des fragments de restriction définis par les 2 sites de restriction différents
 - bonne lisibilité (surtout pour IRS PCR : choix d'adaptateurs qui limitent le nombre de bandes par rapport à l'AFLP)
- séparation sur gel d'agarose ou polyacrylamide

METHODES DE TYPAGE PAR RESTRICTION DE L'ADN

AFLP (amplified fragment length polymorphism)



Les marqueurs AFLP



▼ Enzyme de restriction
■ Adaptateur
▶ Amorce complémentaire de la séquence de l'adaptateur et prolongée de quelques nucléotides arbitraires

■ Séquence complémentaire de la séquence arbitraire des bases débordantes de l'amorce
■ Séquence non complémentaire de la séquence arbitraire des bases débordantes de l'amorce

Polymorphisme de longueur de fragments d'amplification

METHODES DE TYPAGE PAR RESTRICTION DE L'ADN

AFLP (amplified fragment length polymorphism) et IRS-PCR (infrequent restriction site-PCR)

Avantages

- bonne reproductibilité (due à l'utilisation de sites de restriction)
- bonne discrimination (**proche du champ pulsé**)
- très flexible : utilisé pour le groupe [*Mycobacterium avium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*] pour lequel on utilise les mêmes enzymes de restriction, les mêmes adaptateurs et les mêmes amorces et *Legionella pneumophila*
- facile, rapide (1 à 2 jours), et technique ne nécessitant pas de matériel particulier (contrairement au champ pulsé)

Inconvénients

- cher
- pas de standardisation concernant l'interprétation des profils (contrairement à la technique PFGE)

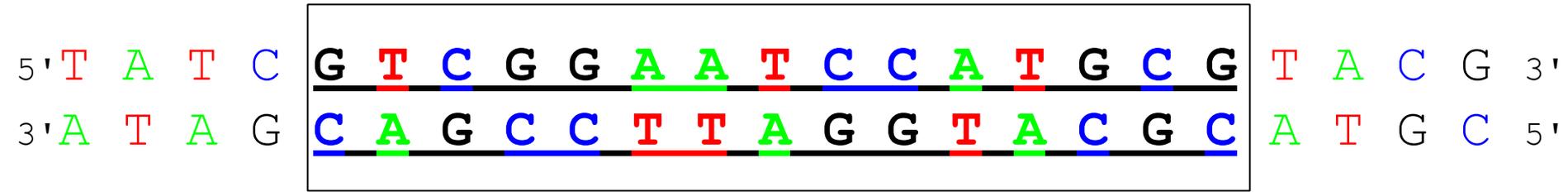
Méthodes d'amplification de gènes

Amplification du fragment d'ADN d'intérêt : la PCR

- Amplification du fragment d'ADN d'intérêt (gène entier ou tronqué) par **PCR** : *Polymerase Chain Reaction*
- La PCR est une réaction de polymérisation en chaîne à partir d'amorces spécifiques de l'ADN d'intérêt, grâce à l'action d'une enzyme, l'ADN polymérase dans un milieu contenant des nucléotides

Méthodes d'amplification de gènes

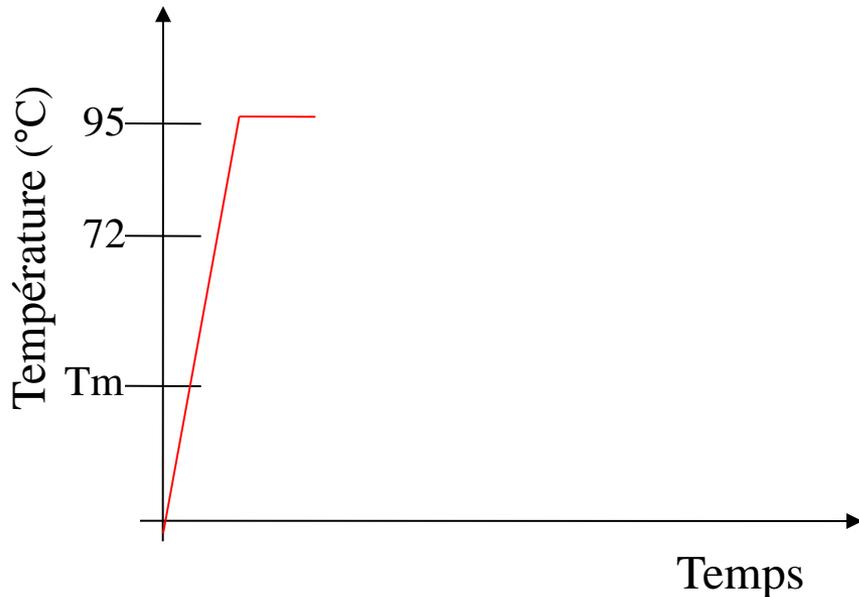
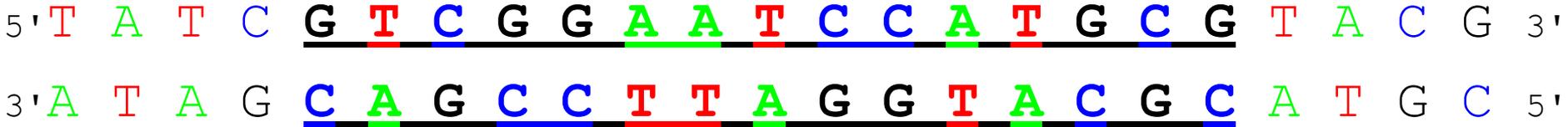
Amplification du fragment d'ADN d'intérêt : la PCR



Séquence à amplifier

Méthodes d'amplification de gènes

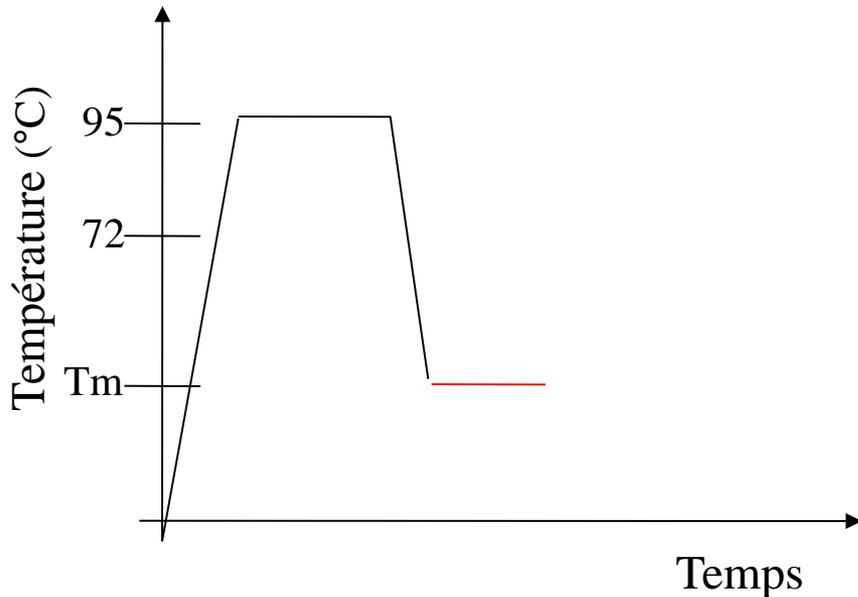
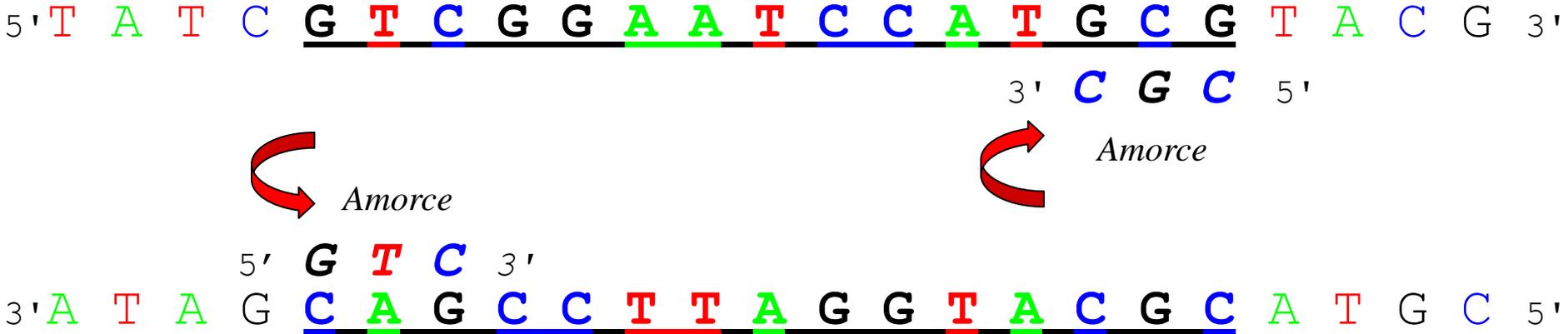
Amplification du fragment d'ADN d'intérêt : la PCR



1ère étape : **dénaturation**
de l'ADN à 95°C
(séparation des brins
complémentaires)

Méthodes d'amplification de gènes

Amplification du fragment d'ADN d'intérêt : la PCR

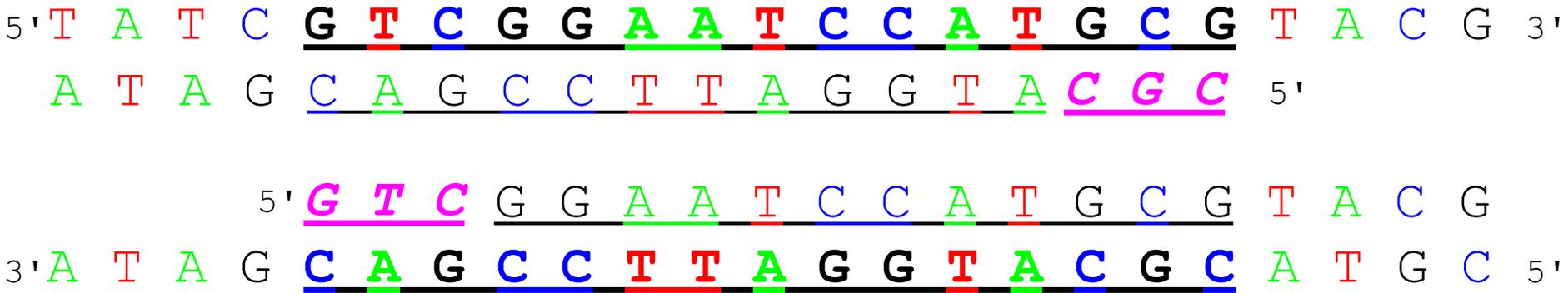


2ème étape : **hybridation des amorces** (séquence de nucléotides complémentaires de l'extrêmité de la région à amplifier) à une température T_m (spécifique de l'amorce)

(en général amorces de 15-25 nucléotides)

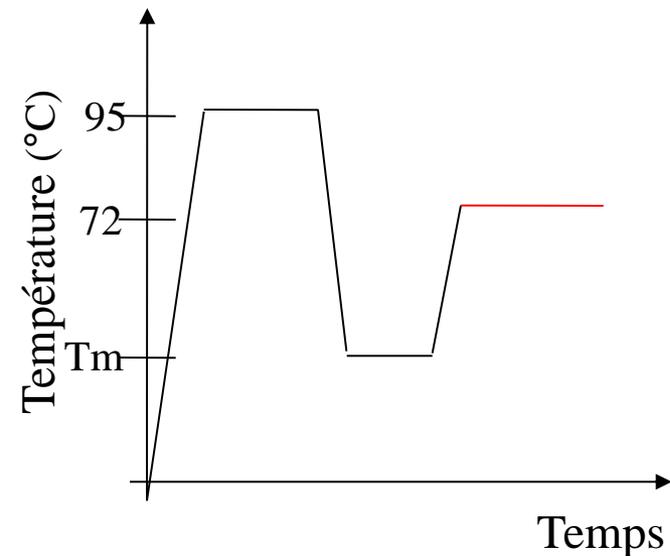
Méthodes d'amplification de gènes

Amplification du fragment d'ADN d'intérêt : la PCR



3ème étape : élongation (synthèse du brin complémentaire à partir des amorces grâce à l'enzyme *ADN polymérase* et aux *nucléotides* présents dans le milieu réactionnel).
Fonctionnement de l'enzyme à 72°C.

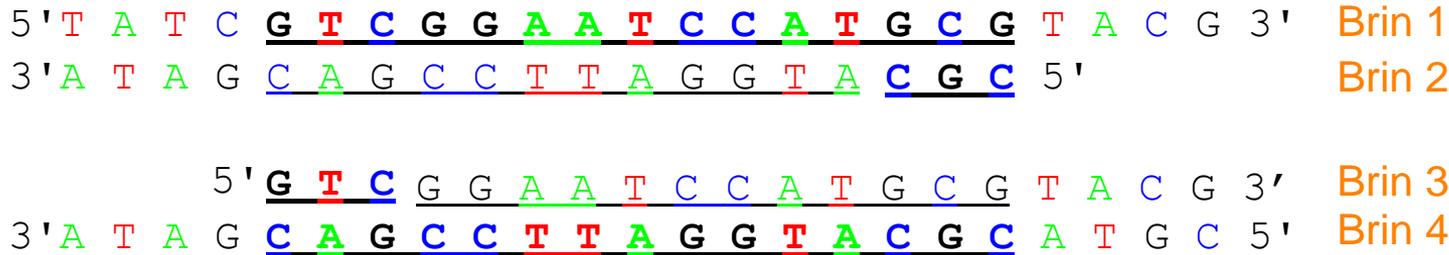
Fin du premier cycle de PCR : aucune molécule obtenue ne correspond au produit désiré (souligné). Un nouveau cycle de PCR (dénaturation-hybridation-élongation) commence.



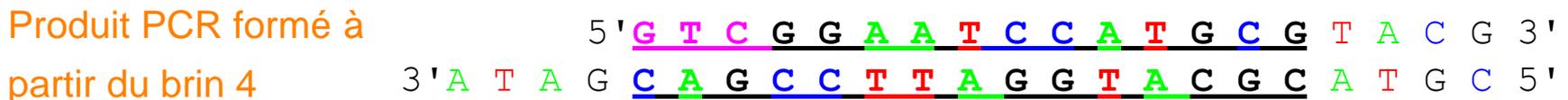
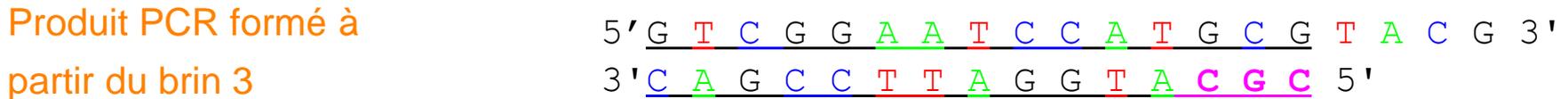
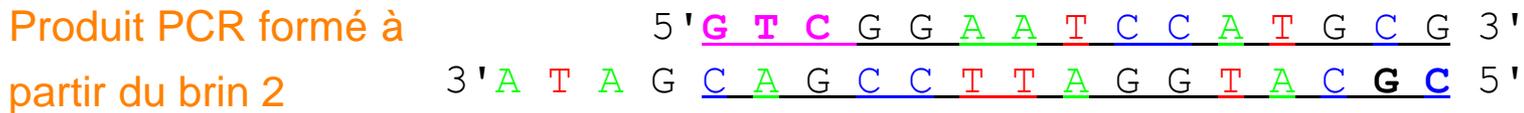
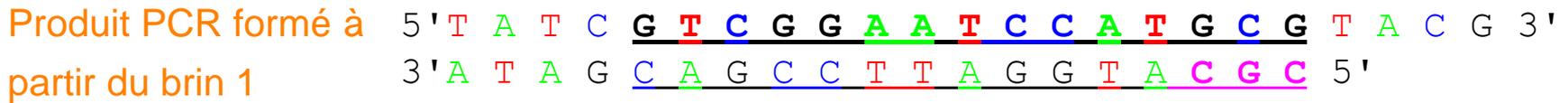
Méthodes d'amplification de gènes

Amplification du fragment d'ADN d'intérêt : la PCR

Produits du 1^{er} cycle de PCR :

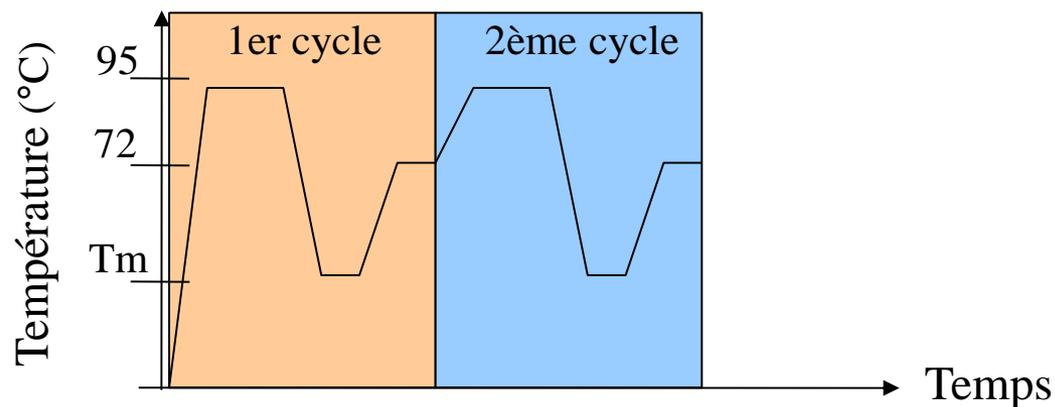
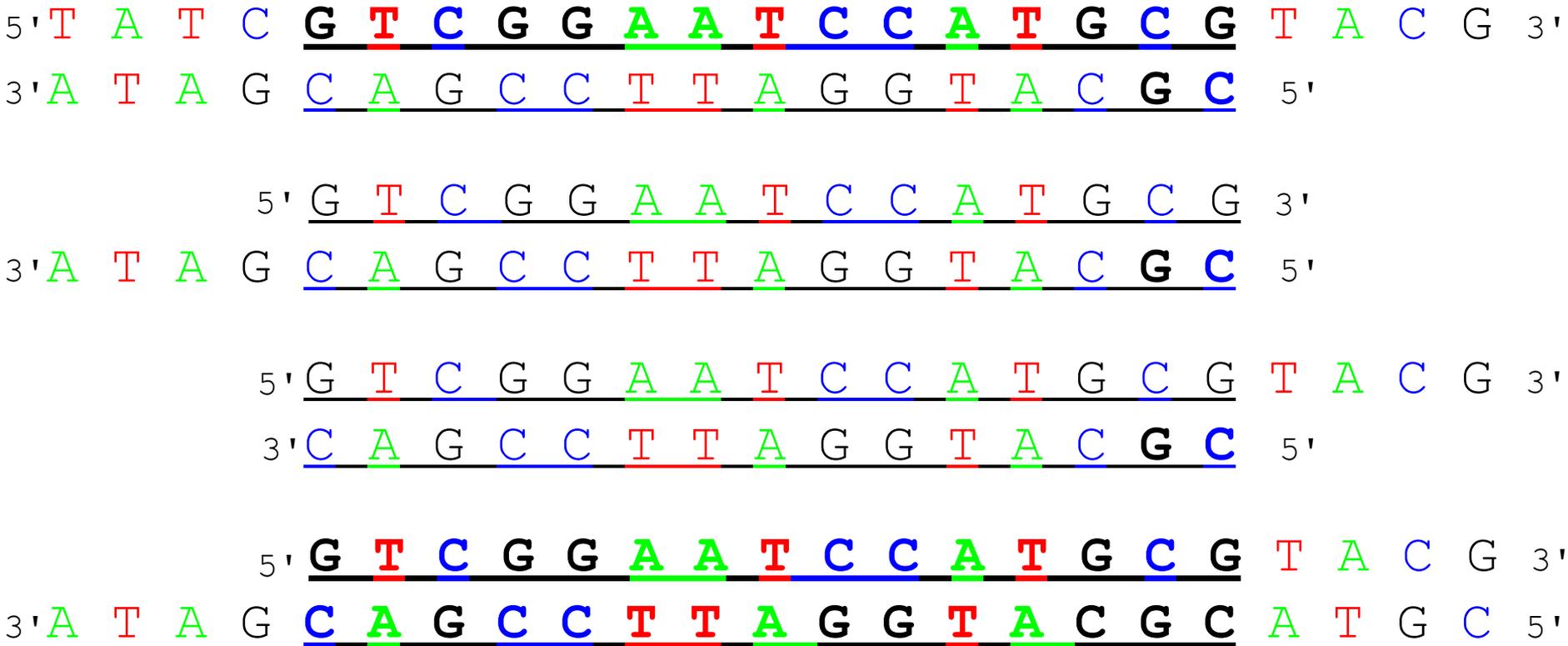


Produits du 2^{ème} cycle de PCR : (les amorces sont en magenta)



Méthodes d'amplification de gènes

Amplification du fragment d'ADN d'intérêt : la PCR

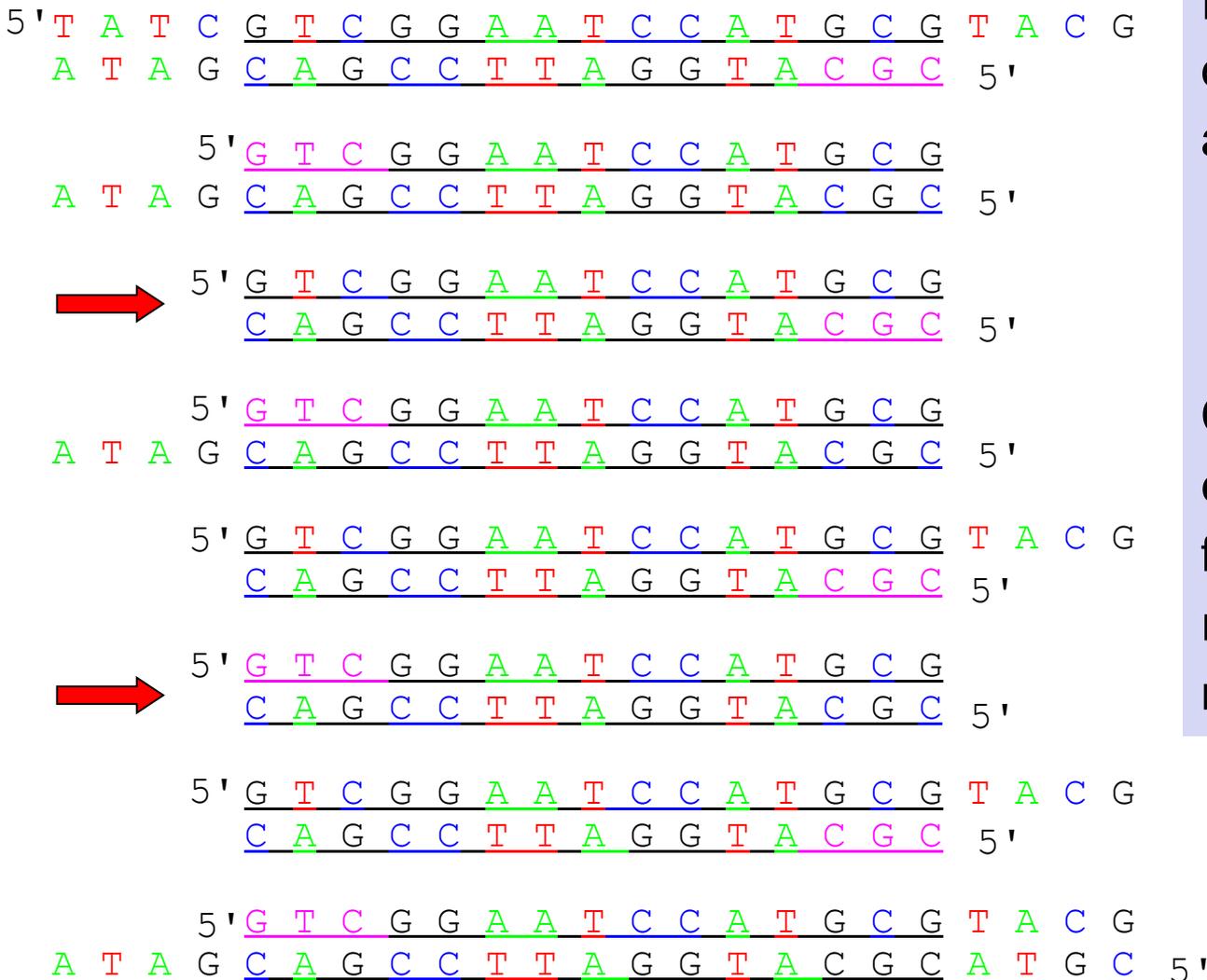


Molécules obtenues à la fin du second cycle de PCR. Aucune ne représente le produit d'intérêt (souligné).

Méthodes d'amplification de gènes

Amplification du fragment d'ADN d'intérêt : la PCR

Molécules d'ADN obtenues à la fin du 3^{ème} cycle de PCR :

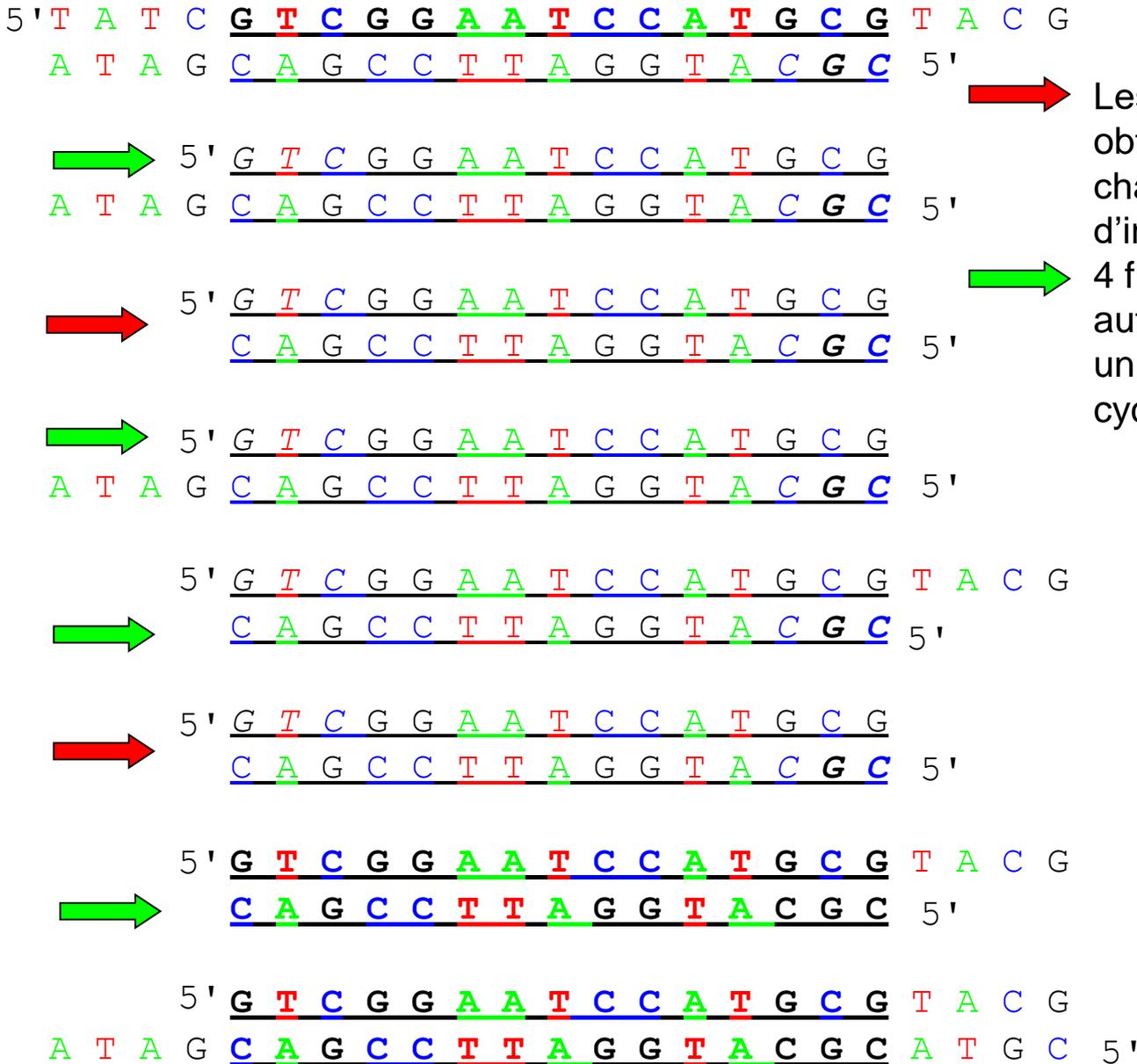


Fin du troisième cycle :
deux produits PCR
attendus apparaissent.

Ces produits vont
ensuite se multiplier de
façon exponentielle par
rapport aux produits
non souhaités.

Méthodes d'amplification de gènes

Amplification du fragment d'ADN d'intérêt : la PCR



→ Les deux molécules d'intérêt obtenues au 3^{ème} cycle donnent chacune deux molécules d'ADN d'intérêt au 4^{ème} cycle.

→ 4 fragments simple brin des autres molécules pourront donner un produit PCR souhaité au 4^{ème} cycle.

Quatrième cycle de PCR :
 8 fragments d'ADN d'intérêt

Cinquième cycle de PCR :
 22 fragments d'intérêt

Méthodes d'amplification de gènes

Amplification du fragment d'ADN d'intérêt : la PCR

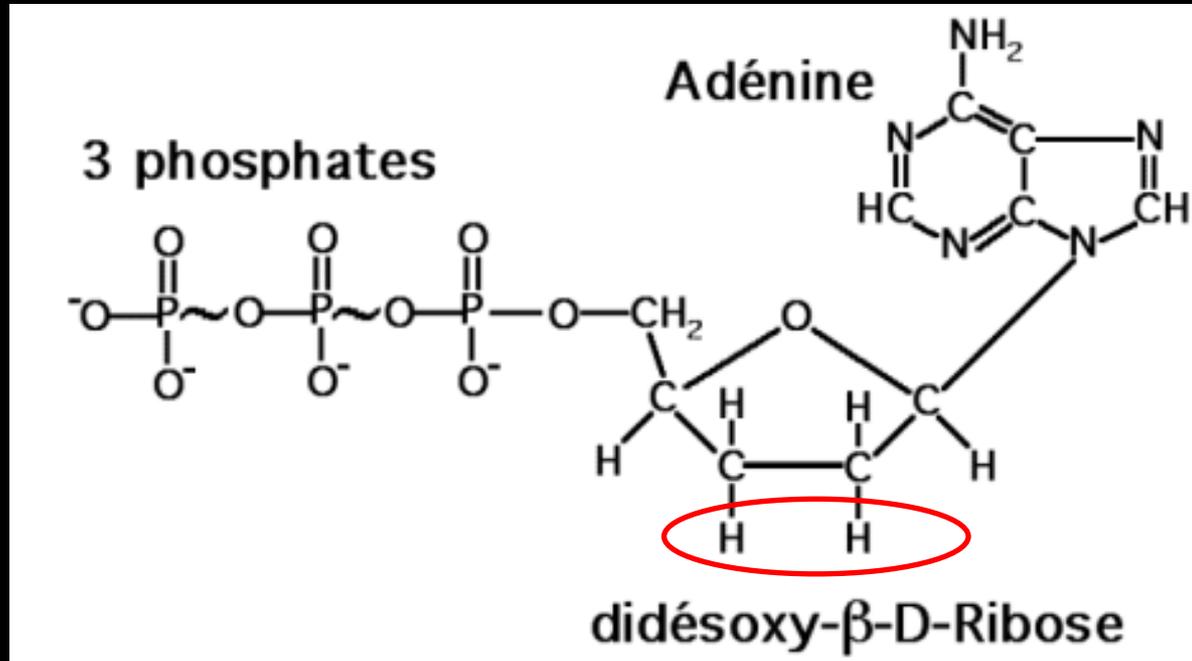
- Répétition des 3 étapes : dénaturation-hybridation-élongation (la machine à PCR fait des cycles de température) => Amplification du fragment d'intérêt de façon exponentielle à partir du troisième cycle
- L'enzyme ADN polymérase ne doit pas être dénaturée à 95°C : utilisation de l'ADN polymérase de bactéries thermophiles (par exemple la Taq polymérase provient de *Thermophilus aquaticus*, microorganisme vivant près des sources d'eaux chaudes (50 à 80°C) ; la Pfu polymérase provient de *Pyrococcus furiosus*)
- Différentes enzymes peuvent être utilisées selon le degré de fidélité souhaité pour l'amplification du fragment (la Pfu est beaucoup plus fidèle mais plus lente pour l'amplification par exemple)

Réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR)



Méthodes d'amplification de gènes

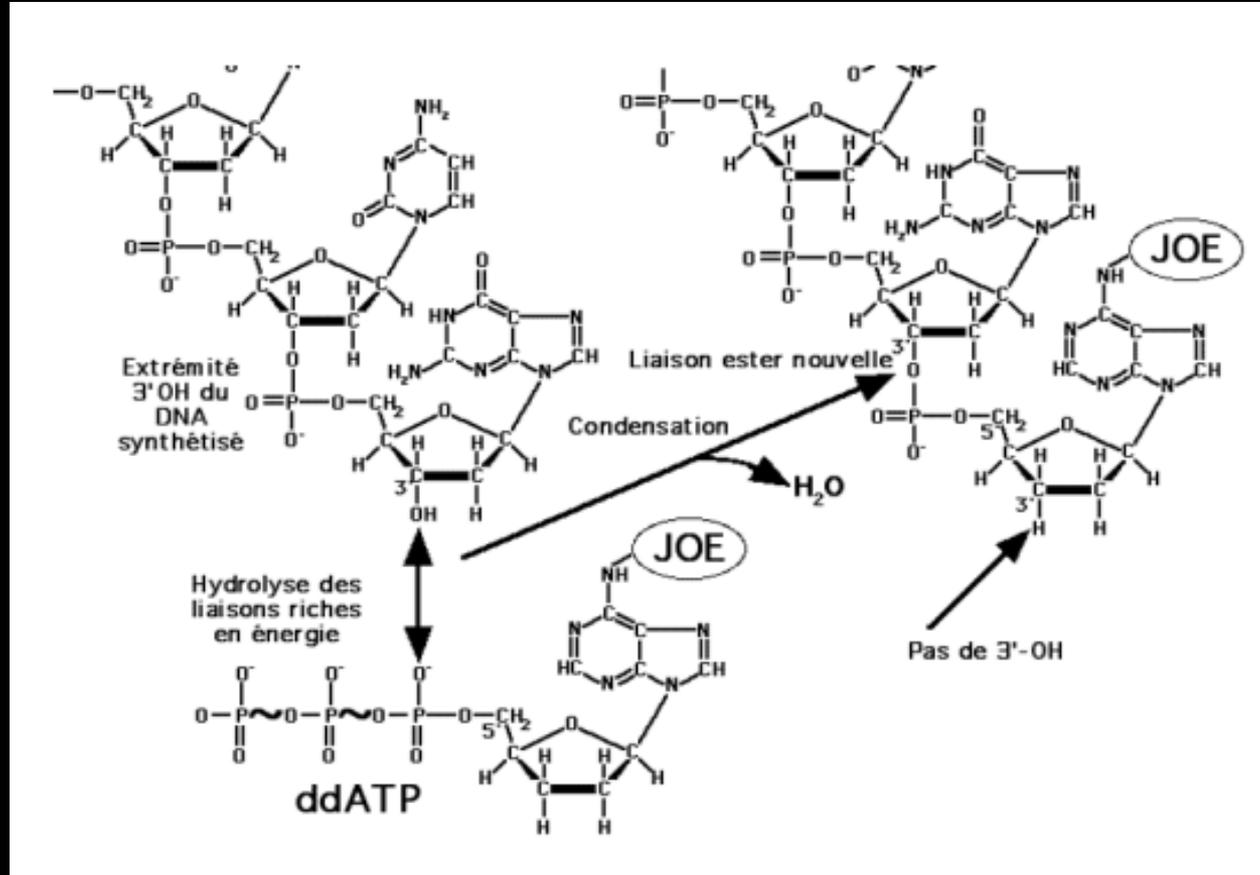
Séquençage : Didésoxyadénosine triphosphate



- Le didésoxyadénosine triphosphate (ddA) est un nucléotide composé de synthèse. Sa structure est dépourvue de fonction alcool en 3'.
- Analogue structural de nucléotide, le ddA est utilisé comme inhibiteur de la réplication (DNA polymérase). L'absence de fonction alcool en 3' empêche toute condensation avec le nucléotide suivant.
- Cette inhibition est principalement utilisée pour le séquençage des DNA.

Méthodes d'amplification de gènes

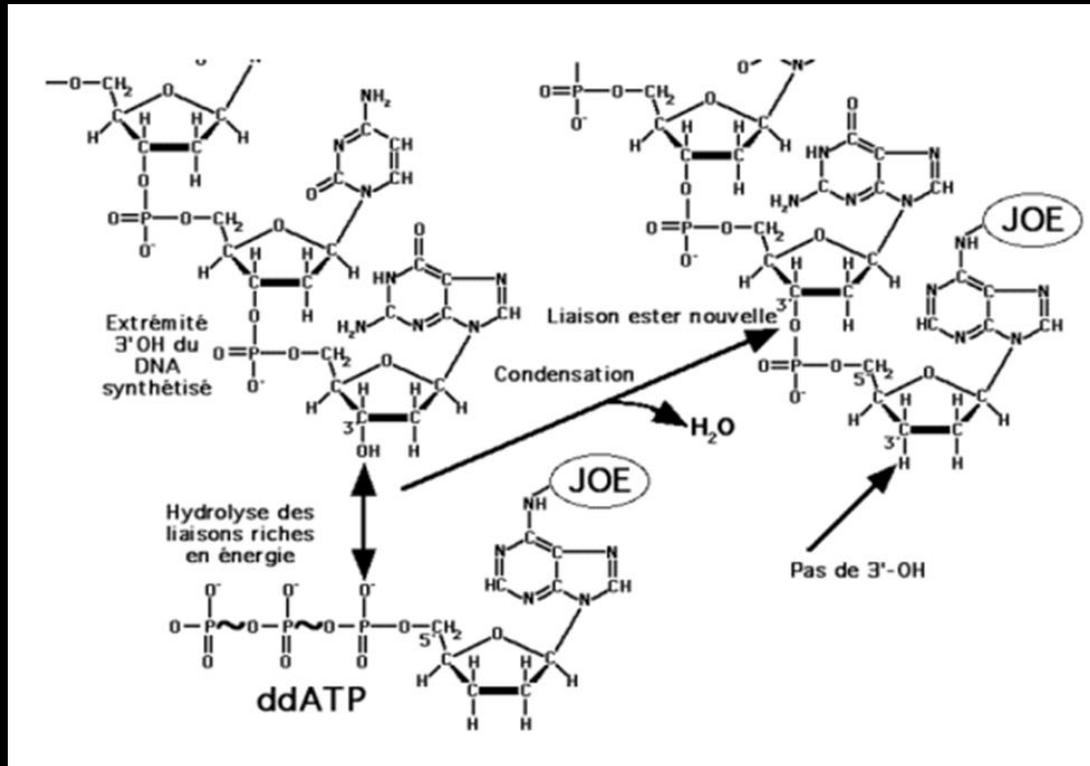
Séquençage : Réaction de séquence



Pour lire la séquence d'un DNA simple brin on hybride une amorce du côté 3' de ce DNA. Puis on effectue avec une DNA polymérase la synthèse d'un brin complémentaire.

Méthodes d'amplification de gènes

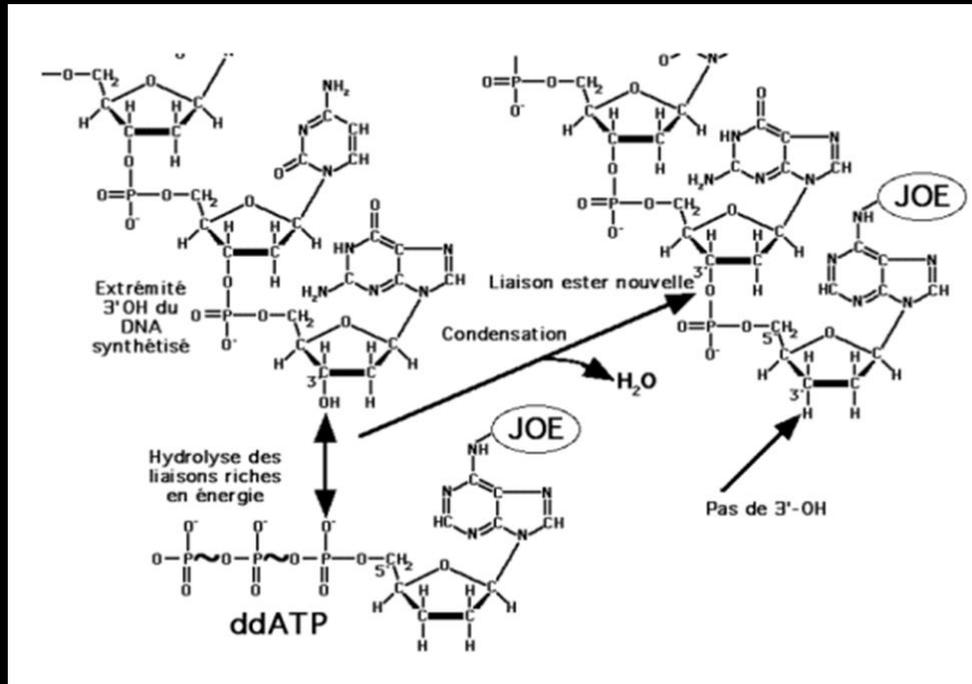
Séquençage : Réaction de séquence



- Pour cette synthèse on apporte comme substrats les quatre désoxyribonucléosides triphosphates (dATP, dCTP, dGTP et dTTP). En plus une très petite quantité de didésoxyribonucléosides triphosphates fluorescents (ddATP-JOE, ddCTP-5-FAM, ddGTP-TAMRA et ddTTP-ROX). La polymérase choisira le plus souvent un désoxyribonucléoside normal et la synthèse se poursuivra jusqu'à ce qu'elle incorpore un didésoxyribonucléoside fluorescent.

Méthodes d'amplification de gènes

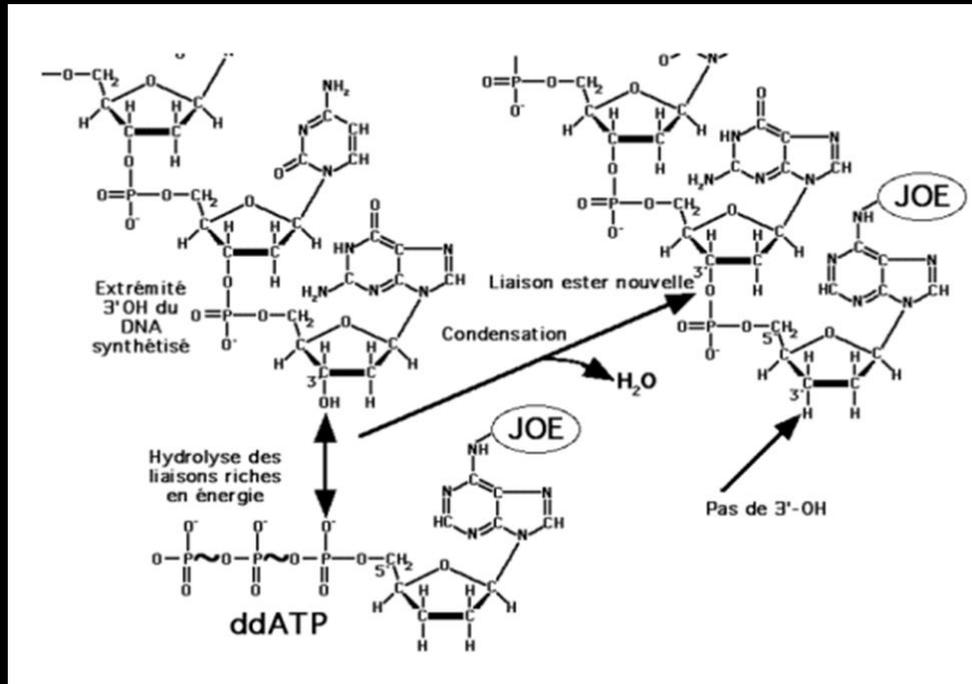
Séquençage : Réaction de séquence



- A ce stade le brin en cours de synthèse n'a plus d'extrémité 3'-OH et la réaction de polycondensation ne peut plus se poursuivre.
- Le diderboxyribonucléotide incorporé en dernier est fluorescent et émet sous l'excitation une lumière verte pour **JOE** (ddAMP), bleue pour **5-FAM** (ddCMP), jaune pour **TAMRA** (ddGMP) et rouge pour **ROX** (ddTMP).
- A chaque lettre de la polycondensation un petit nombre de molécules sont ainsi arrêtées et marquées de la fluorescence correspondant au dernier nucléotide incorporé.

Méthodes d'amplification de gènes

Séquençage : Réaction de séquence



- En séparant ces molécules par électrophorèse en fonction de leur taille on peut lire les lettres successives qui apparaissent comme des zones sur l'électrophorégramme dont la fluorescence correspond à la base de ce dernier nucléotide.

To sequence a piece of DNA, you need:

Méthodes d'amplification de gènes

Amplification du fragment d'ADN d'intérêt : la RT-PCR

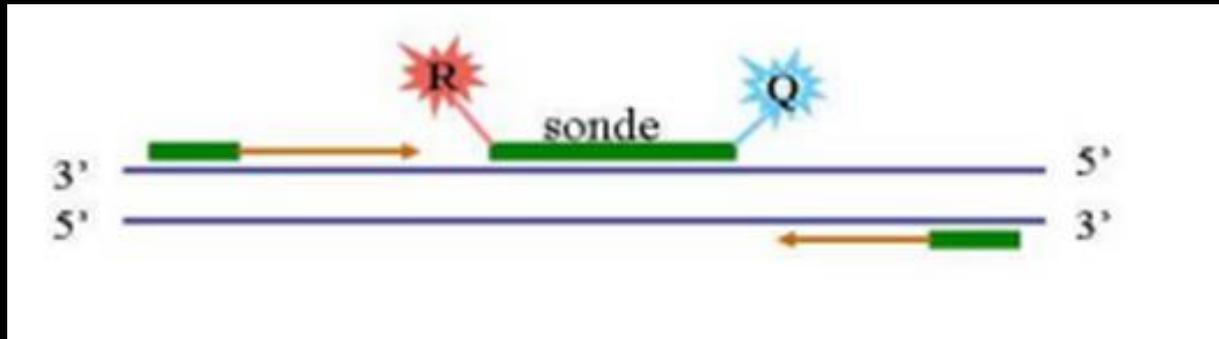
Cette technique offre de nombreux avantages par rapport à une PCR classique :

1. Elle est plus rapide car l'amplification peut être visualisée pendant la réaction et le résultat est donné dès la fin de la PCR
2. Elle est plus spécifique
3. Elle donne des résultats qualitatifs et quantitatifs
4. La réalisation de PCR multiplex est réalisable. En effet, elle permet d'amplifier plusieurs fragments différents et ainsi, de mettre plusieurs organismes ou mutations différents en évidence simultanément dans l'échantillon. Les amplicons sont détectés soit par une substance émettant de la fluorescence (SYBR Green), soit par des sondes spécifiques portant des fluorophores (TaqMan, FRET).

Méthodes d'amplification de gènes

Amplification du fragment d'ADN d'intérêt : la RT-PCR

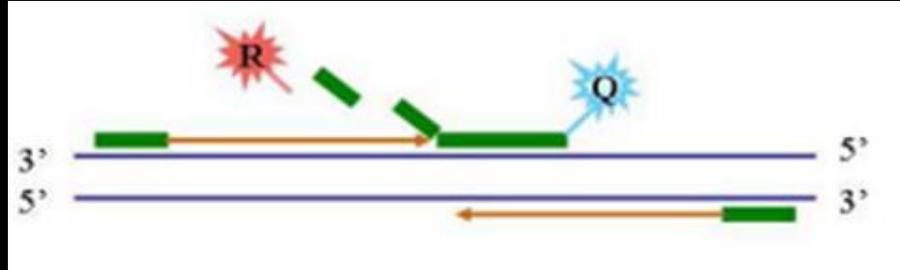
Les sondes TaqMan dont la taille représente environ 25-30 nucléotides portent deux molécules, un fluorochrome ou « reporter » en 5' et un extincteur ou «quencher » en 3'. Sur la sonde, le quencher et le reporter sont très proches. Le rôle du quencher est d'empêcher le reporter d'émettre de la fluorescence lorsque celui-ci est excité.



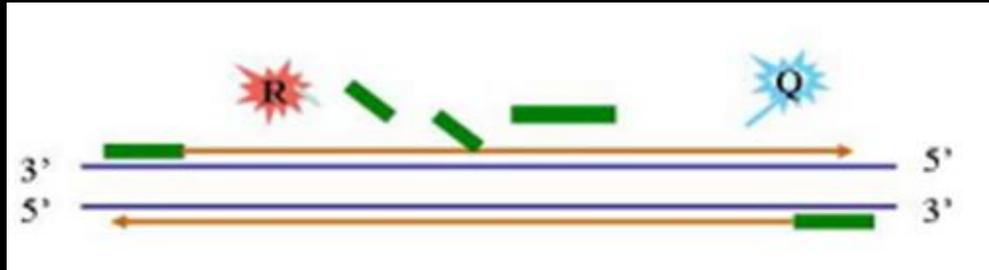
1- S'il y a élongation du brin d'ADN à partir d'une amorce par la Taq polymérase, cette dernière se heurte à la sonde TaqMan.

Méthodes d'amplification de gènes

Amplification du fragment d'ADN d'intérêt : la RT-PCR



- La Taq polymérase hydrolyse irréversiblement la sonde hybridée car elle possède une activité exonucléasique en 5'. Le reporter se détache alors de la sonde.



- Le reporter n'est plus rattaché au quencher. Etant suffisamment éloigné du quencher, il peut alors émettre sa fluorescence.

Comme la quantité d'ADN servant de matrice double à chaque cycle, le nombre de sondes Taqman pouvant s'hybrider double également, de même que la fluorescence émise. Cette fluorescence est donc proportionnelle au nombre de copies synthétisées. L'appareil mesure la fluorescence émise par le produit PCR.

La PCR en temps réel

