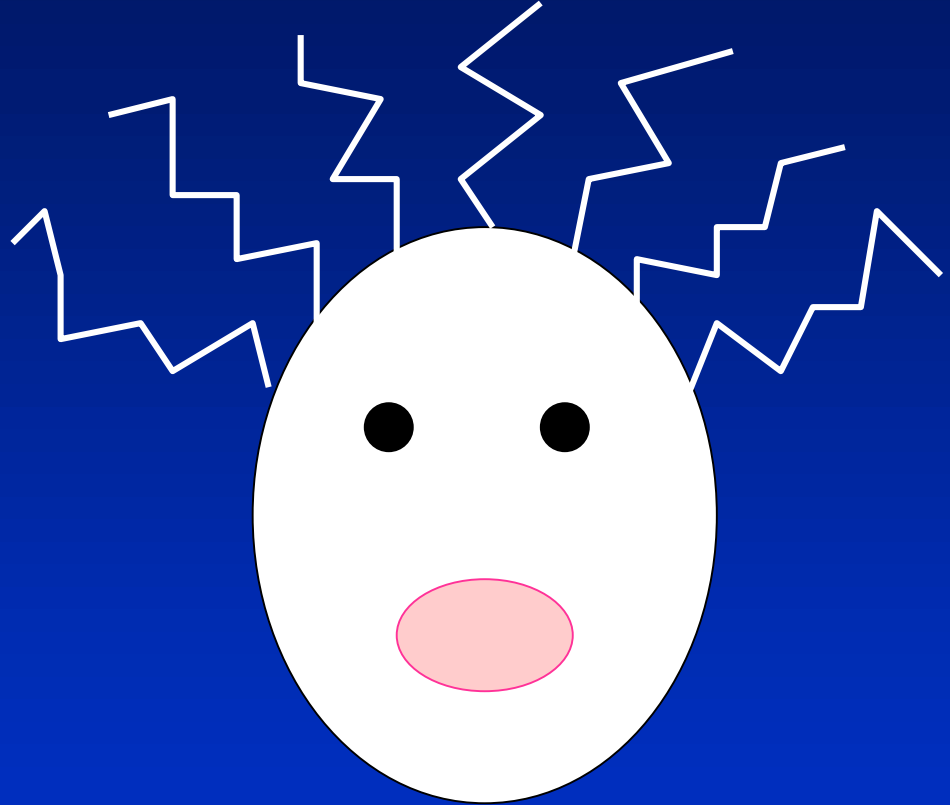


Apport de la PCR en temps réel en maladies infectieuses

Biologie moléculaire



Amplification PCR

I. Dénaturation

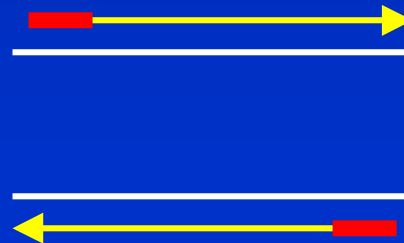


II. Hybridation



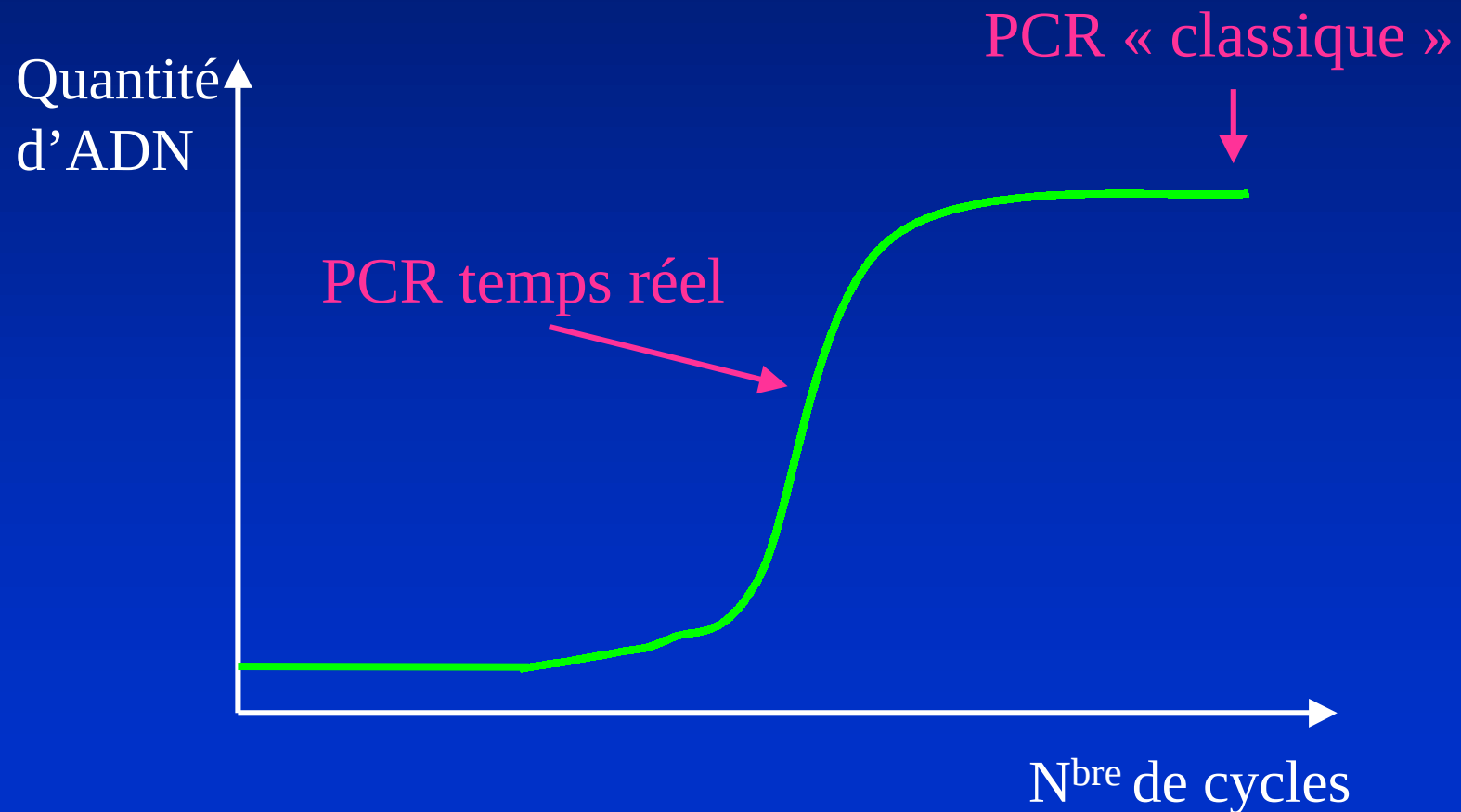
$t^{\circ} = T_m$

III. Extension

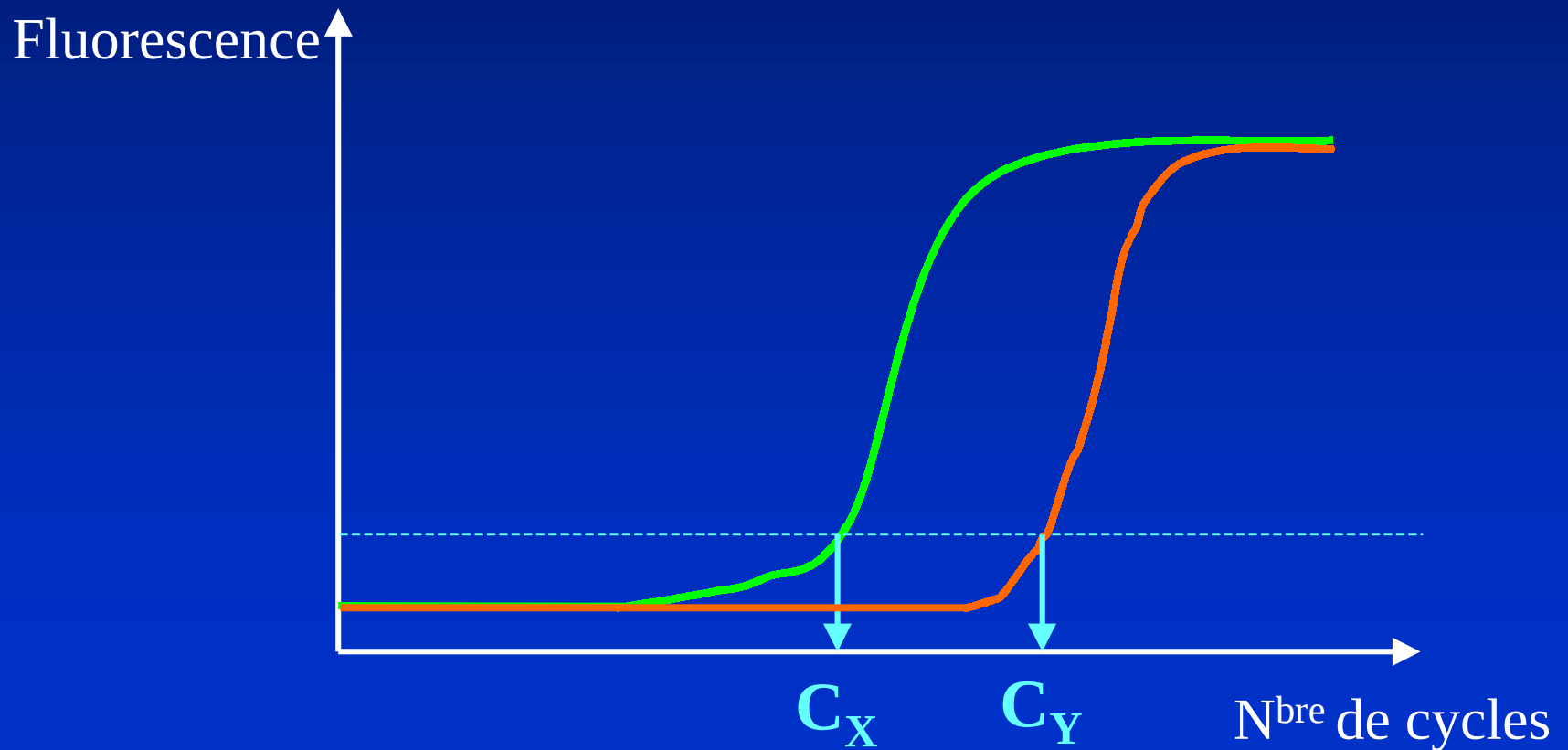


t° dépend de la
polymérase employée

PCR « classique » versus PCR en temps réel



Monitoring de l'amplification

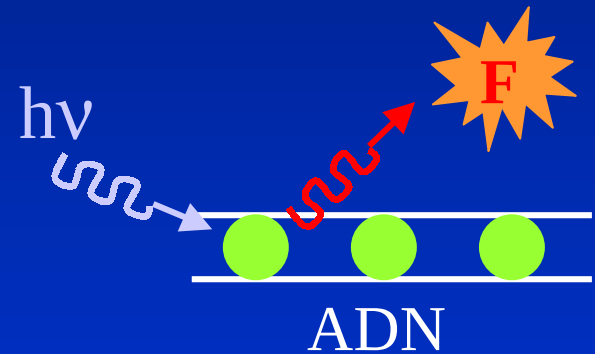
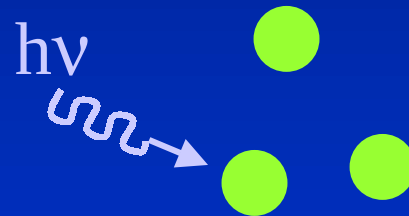


Génération de la fluorescence (1)

Avant amplification

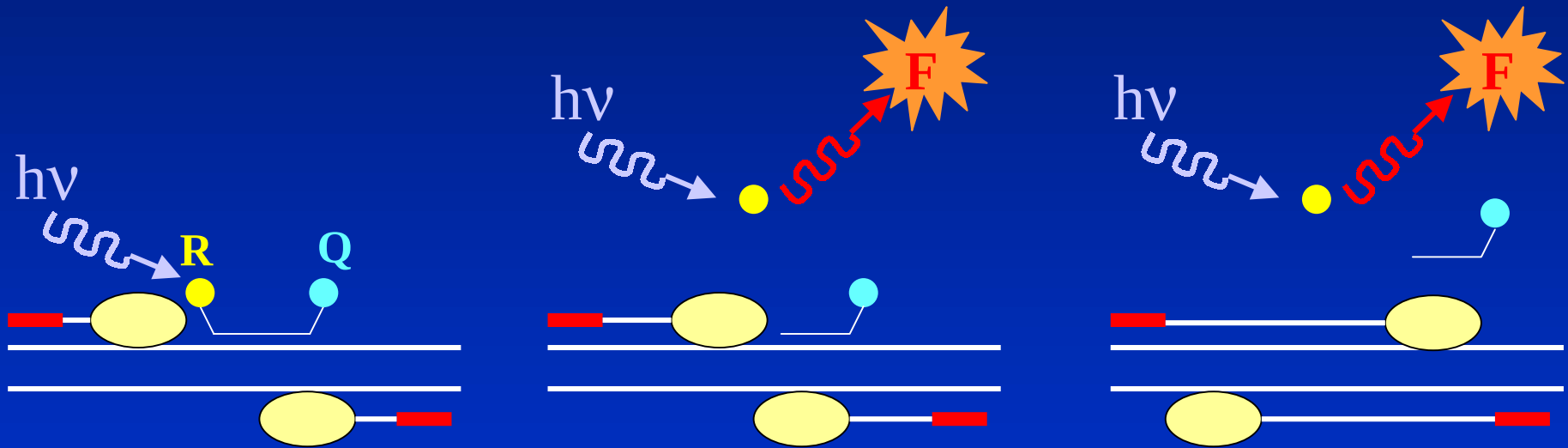
Après amplification

SYBR Green



Génération de la fluorescence (2)

TaqMan Probes

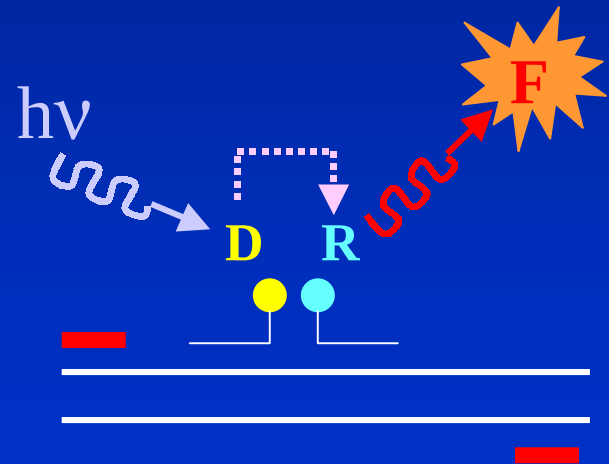
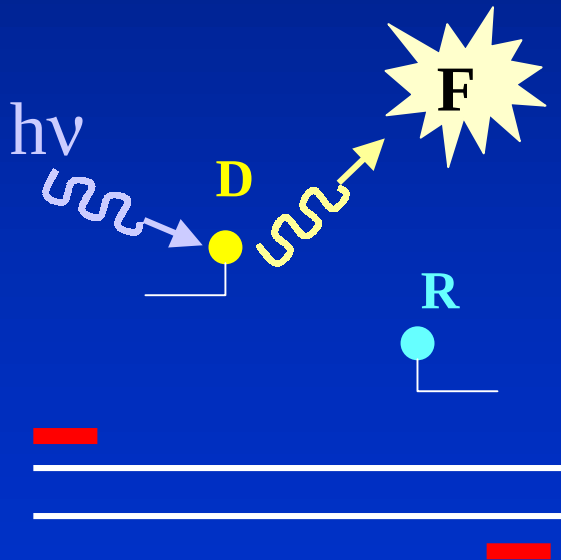


Activité 5' nucléase de l'ADN polymérase
(étape d'extension)

Génération de la fluorescence (3)

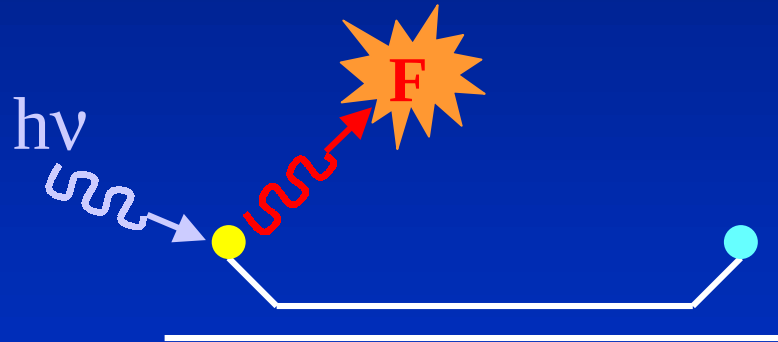
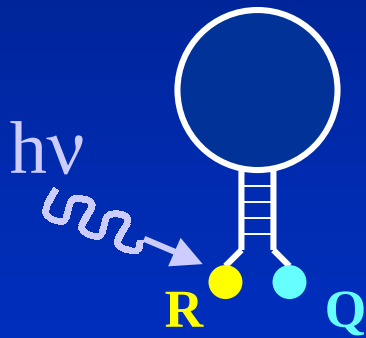
« Kissing » probes

(Fluorescence Resonance Energy Transfer = FRET)



Génération de la fluorescence (4)

Molecular beacons



Les différents appareils de PCR temps réel

- **ABI SDS 7700 et 5700** (Applied Biosystems)
- **LightCycler** (Roche)
- **iCycler** (BioRad)
- **SmartCycler** (Eurogentec)

Apport de la PCR en temps réel en maladies infectieuses : quelques exemples

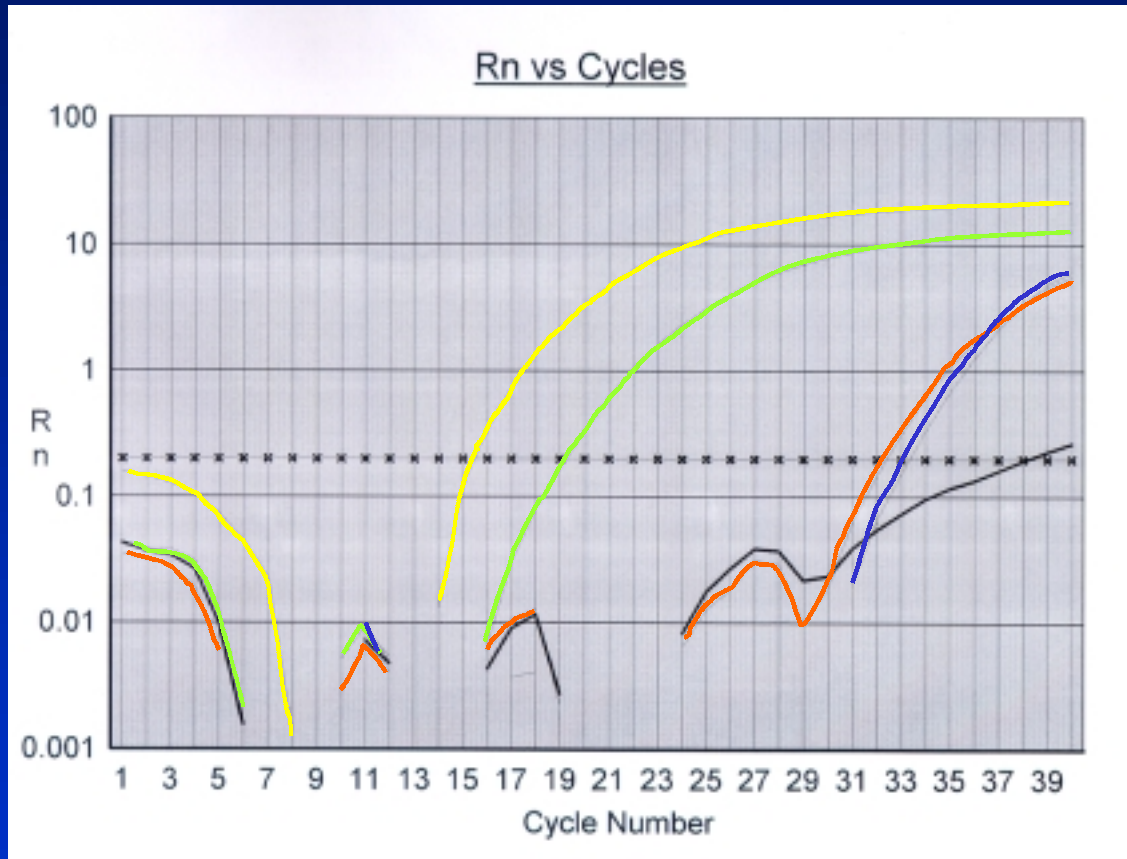
- PCR qualitative : détection de l'Herpes simplex (HSV)
- PCR quantitative : quantification de l'Epstein-Barr virus (EBV)
- Détection de mutations : détection des mutations de résistance à la lamivudine chez le virus de l'hépatite B (HBV)

Détection de HSV

Principe :

- amplification de 104 pb du gène de la glycoprotéine B avec des amorces choisies dans une région commune à HSV-1 et HSV-2
- détection par le SYBR Green

Courbe d'amplification



- HSV-1 (3.10^5 copies/PCR)
- HSV-2 (10^5 copies/PCR)
- HSV-1 (10 copies/PCR)
- HSV-2 (10 copies/PCR)
- VZV

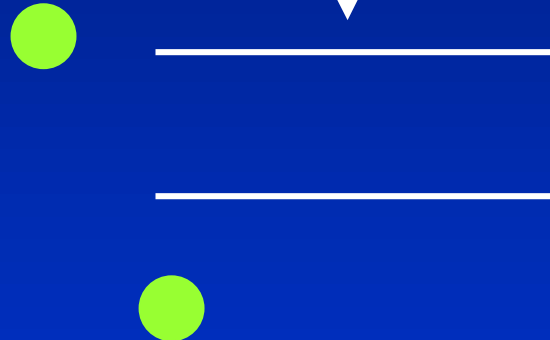
Courbe de fusion (1)

Après la PCR :



Fluorescence +++

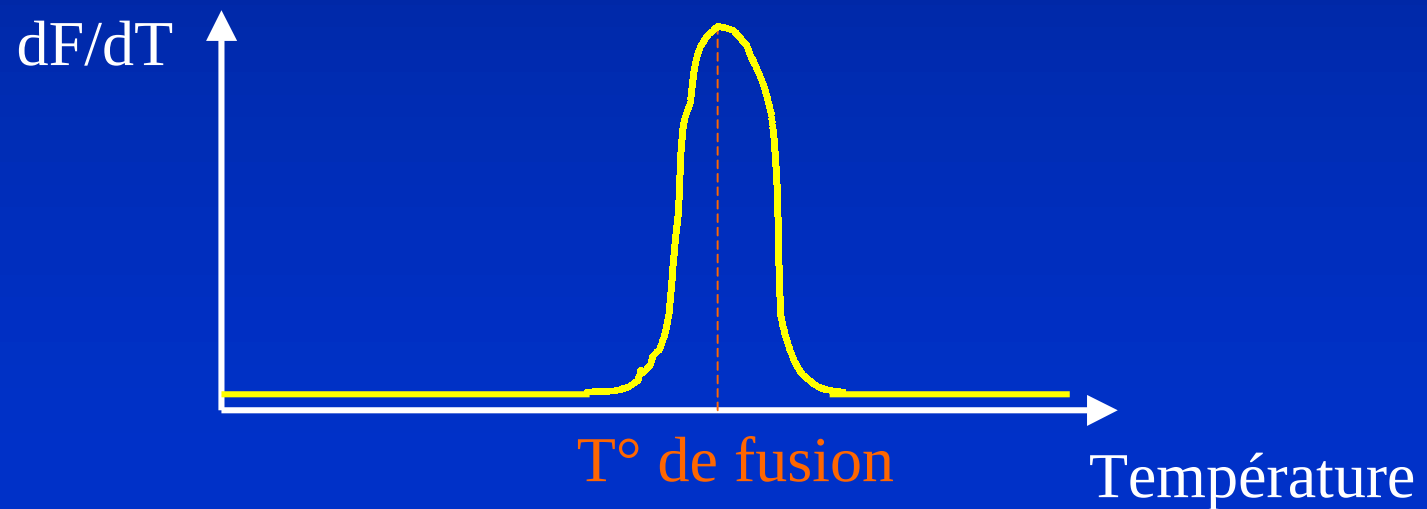
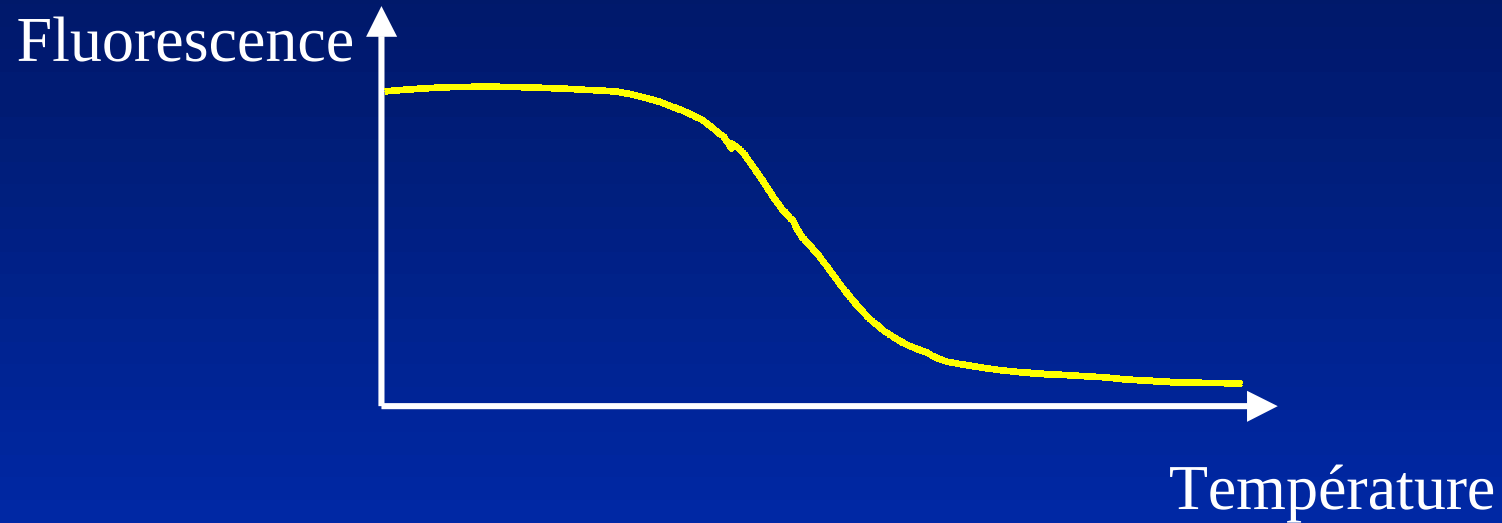
Augmenter la température
de la température d'hybridation
à 90°C



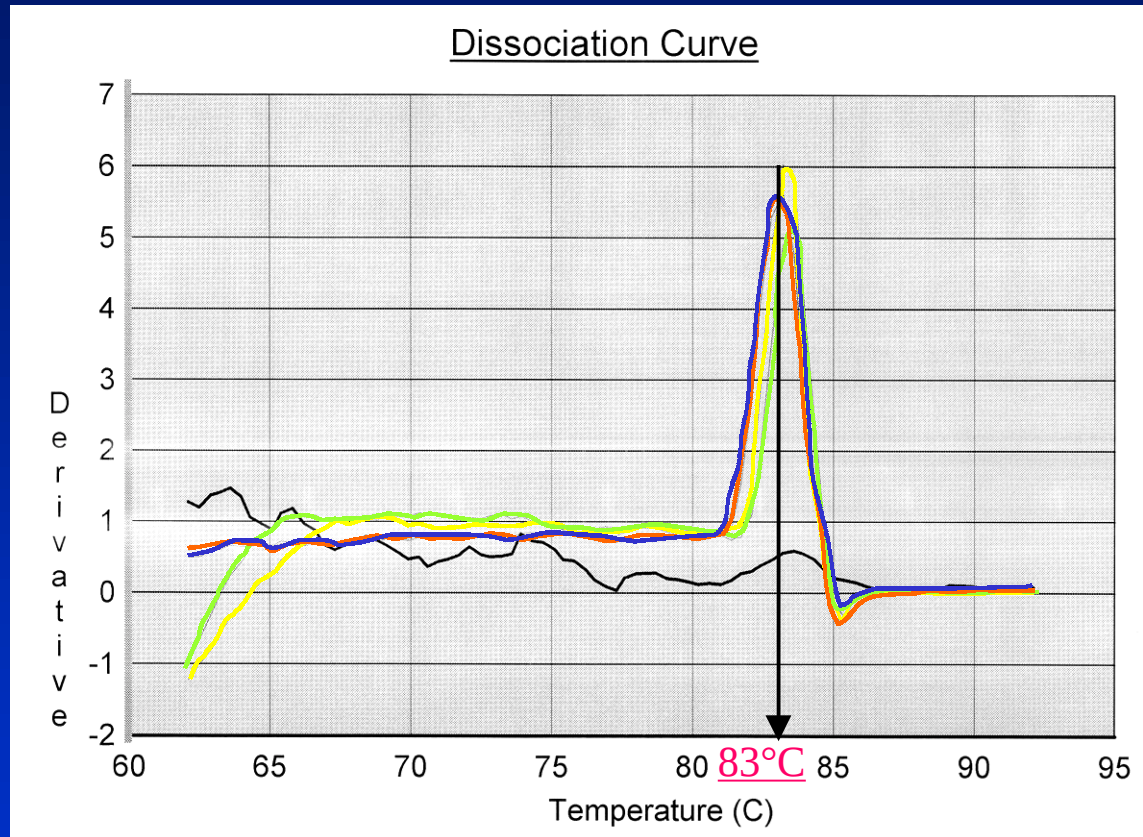
Fluorescence ↘ ↘ ↘

Séparation des 2 brins d'ADN à une t° dépendant
de la séquence de l'amplicon

Courbe de fusion (2)



Courbe de fusion (3)



- HSV-1 (3.10^5 copies/PCR)
- HSV-2 (10^5 copies/PCR)
- HSV-1 (10 copies/PCR)
- HSV-2 (10 copies/PCR)
- VZV

Quantification de l'EBV



Suivi dans le développement des PTLN
(post-transplant lymphoproliferative disease)



PCR multiplex $\Rightarrow$ co-amplification d'un gène eucaryote (*crp*) et d'un gène de l'EBV (*BKRF1* qui encode EBNA1). Détection par des sondes TaqMan marquées par des fluorophores différents
(Jabs *et al.*, J. Clin. Microbiol, 39:564-569)

Stratégie

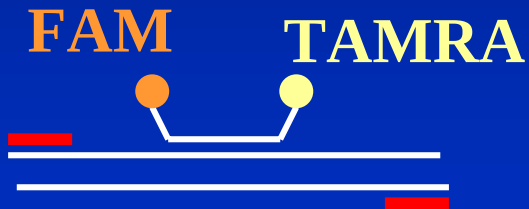
PBMCs isolation



Extraction ADN



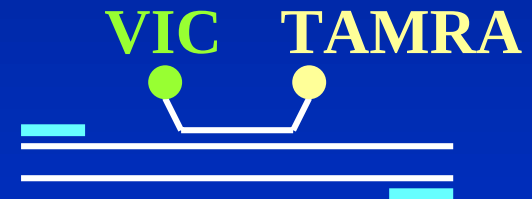
Co-amplification dans un seul tube



Crp

(human C-reactive protein)

ADN eucaryote



BKRF1 (EBNA1)

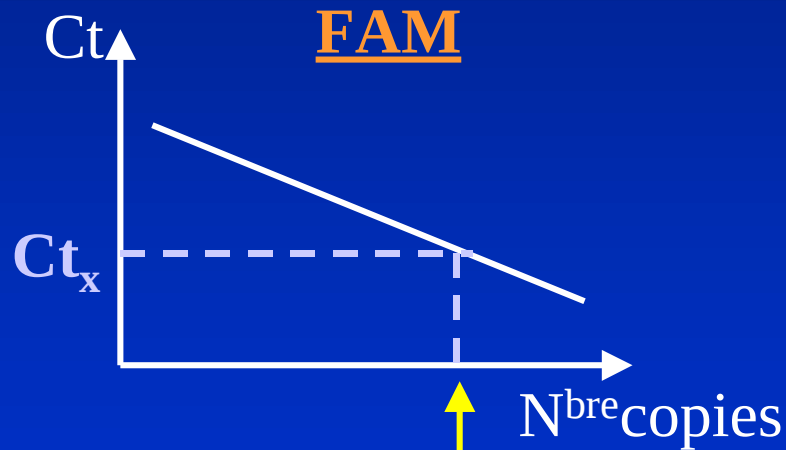
ADN EBV

Courbes de calibration

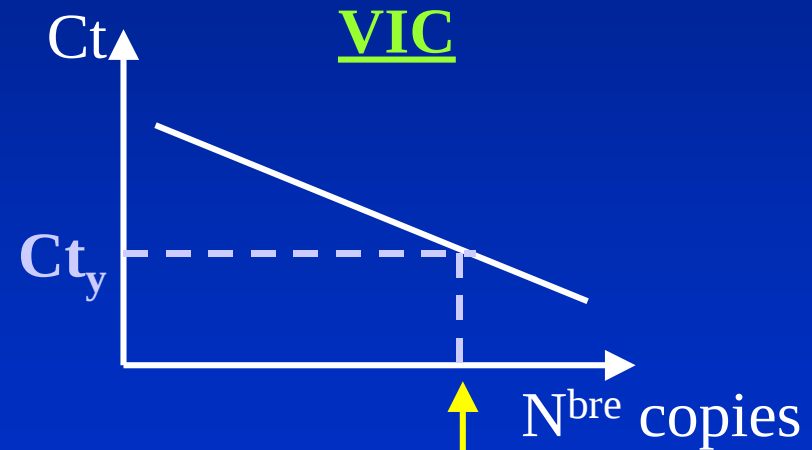
ADN extrait de cellules Namalwa

(= lymphos B contenant 2 copies d'EBV intégrées dans leur génome)

➡ (100 000), 6 000, 1 500, 200, 50 and (10) copies = standards



N^{bre} copies *crp* → N^{bre} cellules
→ μg d'ADN de PBMC

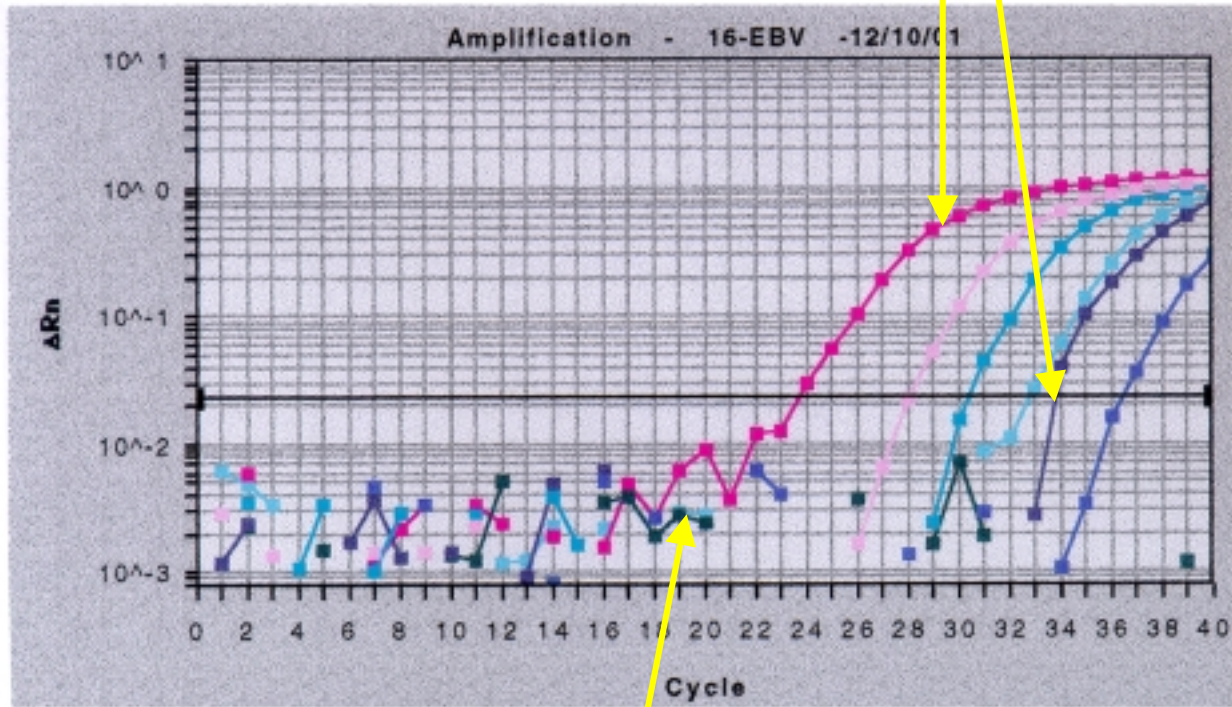


N^{bre} copies EBV

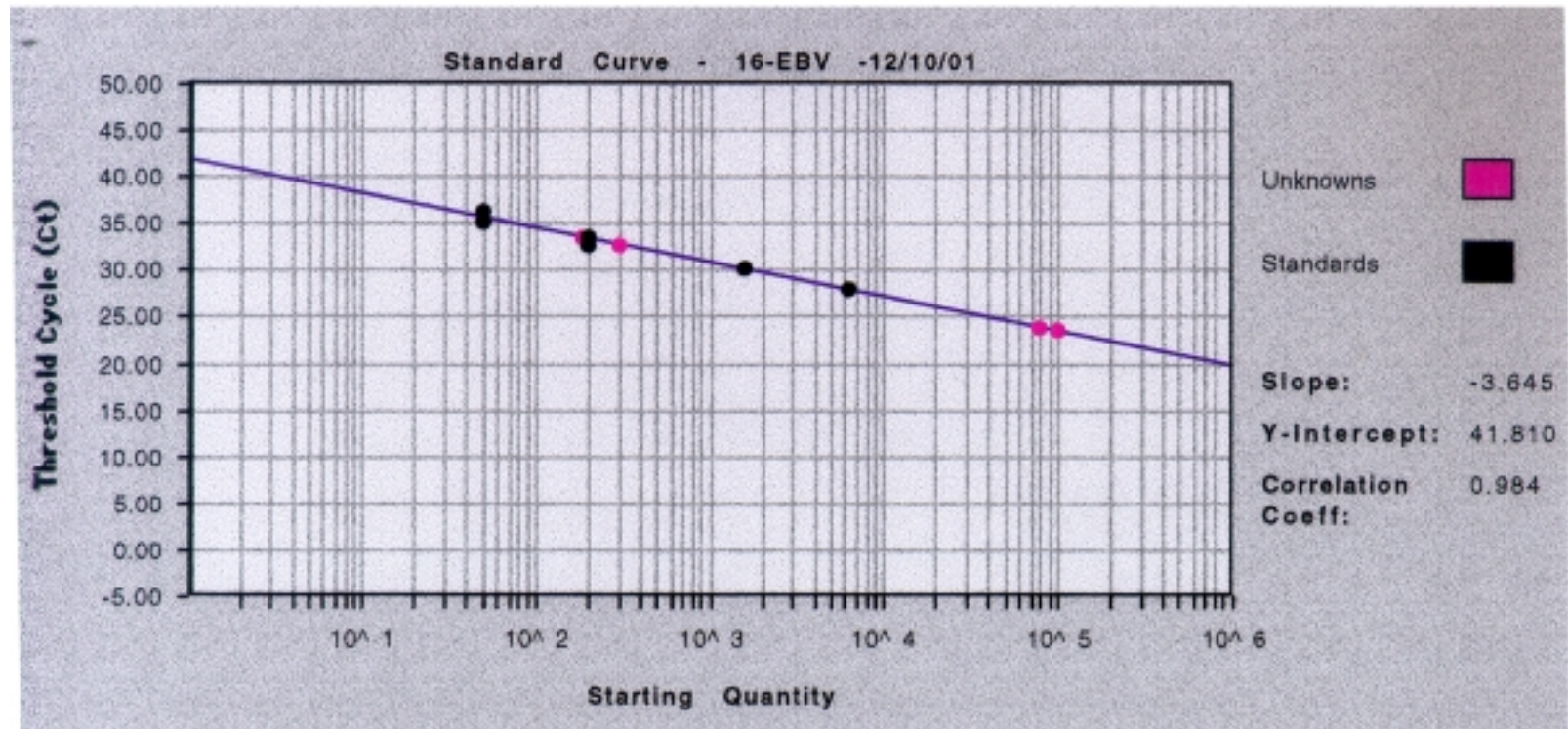
Avantages de la normalisation :

- ➡ Pas de variations dues à l'extraction d'ADN
- ➡ Amplification du gène *crp* permet de contrôler la présence d'inhibiteurs de PCR et sert de calibrateur interne pour la PCR quantitative

Courbe d'amplification



Courbe de calibration



Détection des mutations de résistance à la lamivudine chez HBV

- ➡ Traitement utilisant la lamivudine chez les transplantés du foie et en cas d'hépatites chroniques
- ➡ Apparition de résistances dues à l'émergence de mutations dans le gène encodant la polymérase de HBV

Les différentes mutations

Groupe I



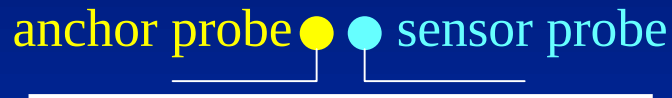
Groupe II



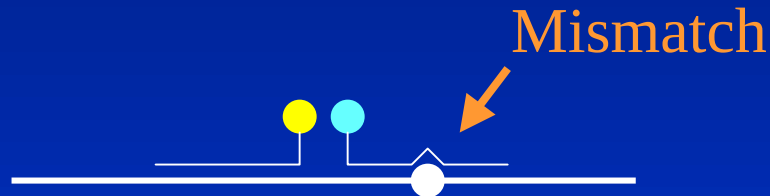
Stratégie

➡ Utilisation de « kissing probes »

Gène sauvage



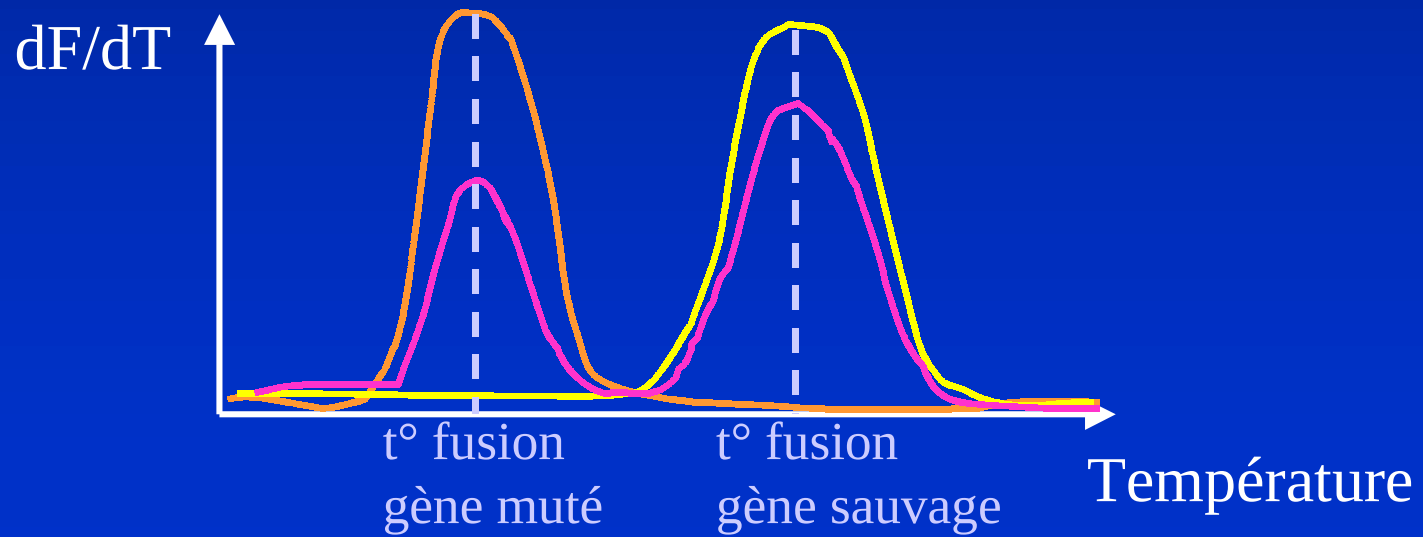
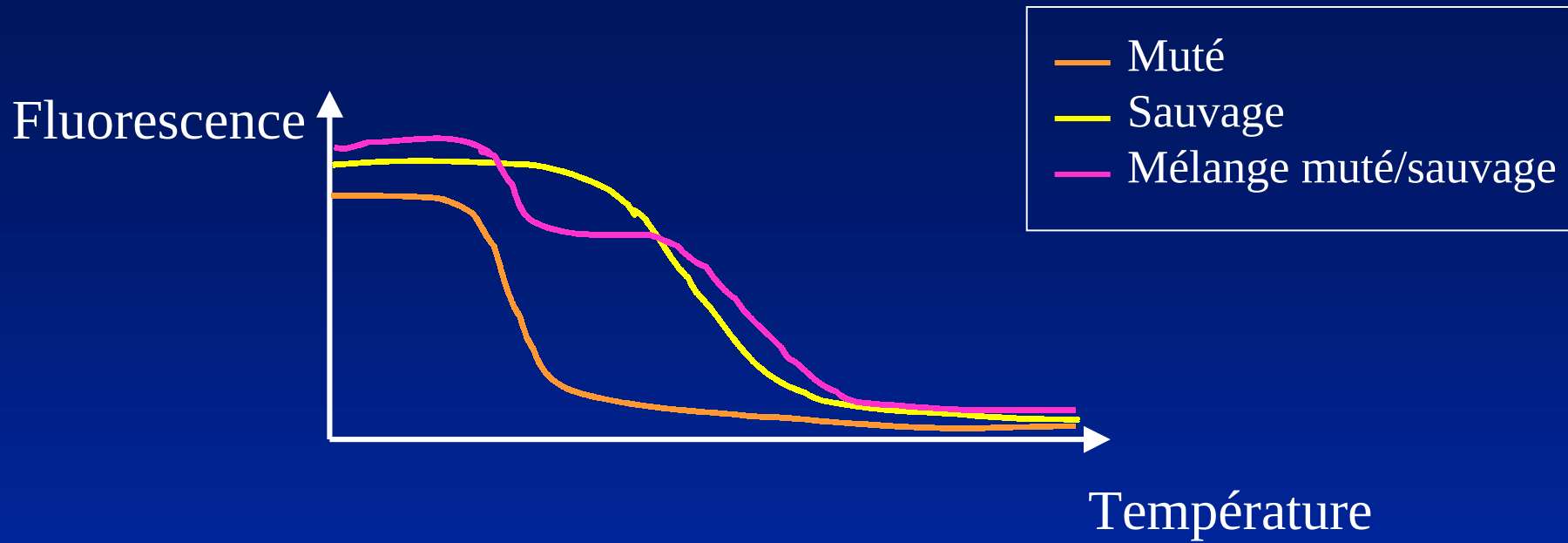
Gène muté



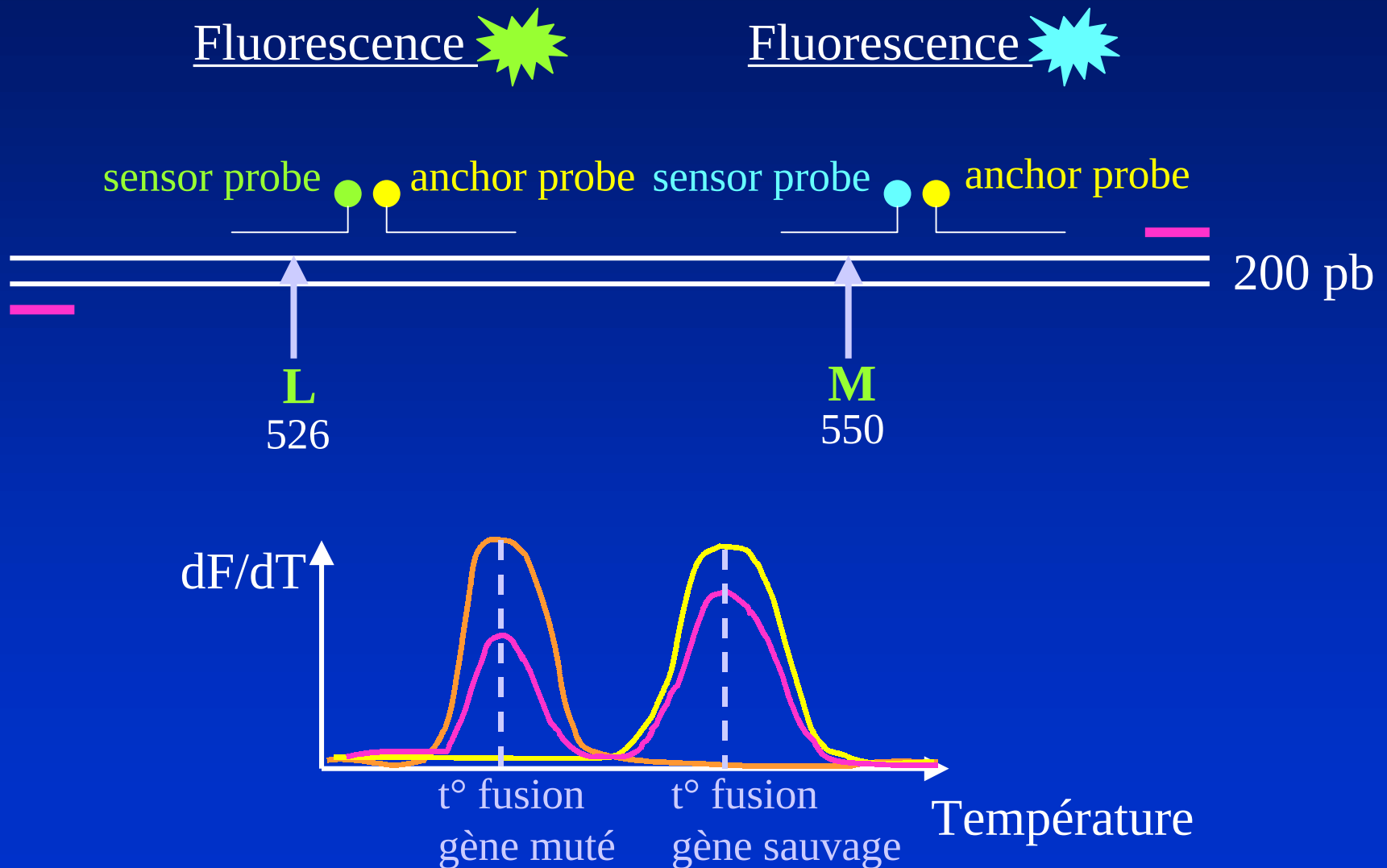
➡ PCR + courbe de fusion



Dans le cas du gène muté, la sensor probe se détachera à une t° plus basse que dans le cas du gène sauvage



Application



Conclusions (1)

- ➡ Pas de manipulation post-PCR
 - Réduction du risque de contamination
- ➡ Permet de quantifier l'ADN amplifié
- ➡ Automatisation
- ➡ Rapidité (de 20 min à 2h selon l'appareil utilisé)

Conclusions (2)

- ➡ Bonne reproductibilité (seuil = 10 copies)
- ➡ Obtention aisée de données « analytiques » sur la PCR (mise au point plus rapide)
- ➡ Bel outil pour réaliser des PCR multiplex