

L'AMPLIFICATION GÉNIQUE PAR PCR

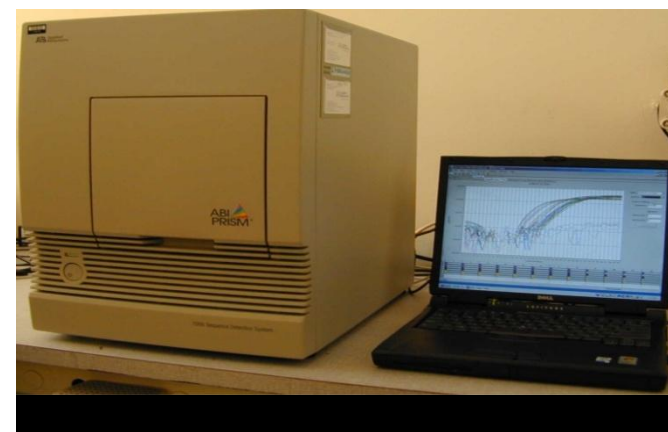
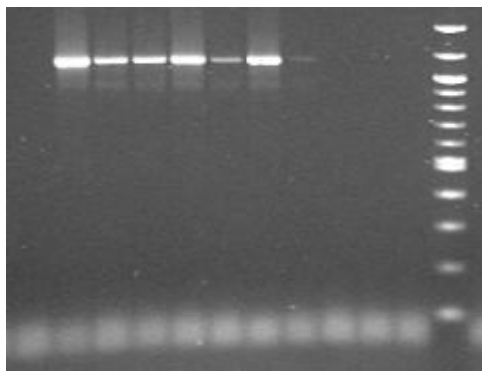
(Polymérase Chain Reaction)

ATELIER DE FORMATION SUR LE DIAGNOSTIC DE LA FIEVRE APHTEUSE

21 mai 2012

Corinne SAILLEAU
Corinne.sailleau@anses.fr

Agence Nationale de Sécurité Sanitaire
Laboratoire de Santé Animale de Maisons-Alfort



Recherche du génome d'un agent infectieux à partir de



Provenant



etc ...

Extraction des acides nucléiques



PCR ou RT-PCR



RT : Reverse-transcription (ARN \Rightarrow ADNc)

Quels sont les pré-requis pour développer une PCR ?



Sélection du gène candidat

Diagnostic tous sérotypes ou spécifique de sérotype



Connaitre la séquence ou une partie

Choix et synthèse des amorces spécifiques



ADN ou ADNc

Utilisation d'une ADN polymérase

Cible sélectionnée



Amorces sélectionnées
Sens et anti-sens



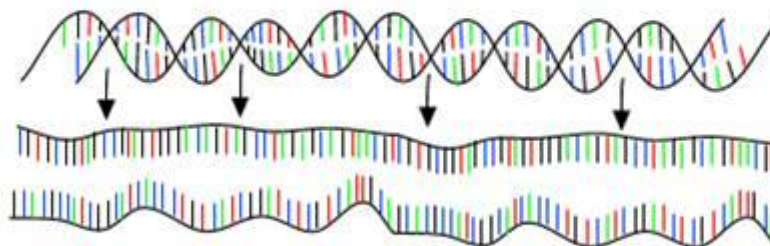
Synthèse de l'ADN
À l'aide de la Taq Polymérase
et de dNTP

PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps :

Step 1 : denaturation

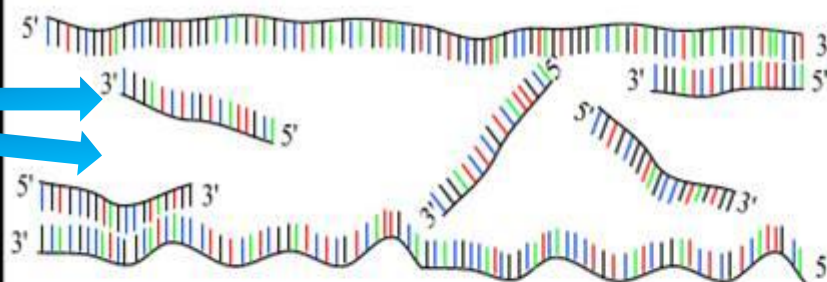
1 minut 94 °C



Step 2 : annealing

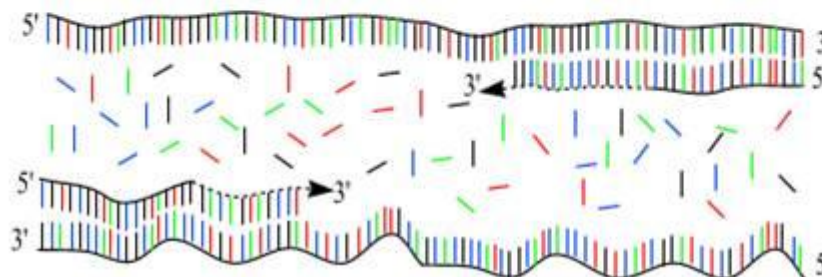
45 seconds 54 °C

forward and reverse
primers !!!

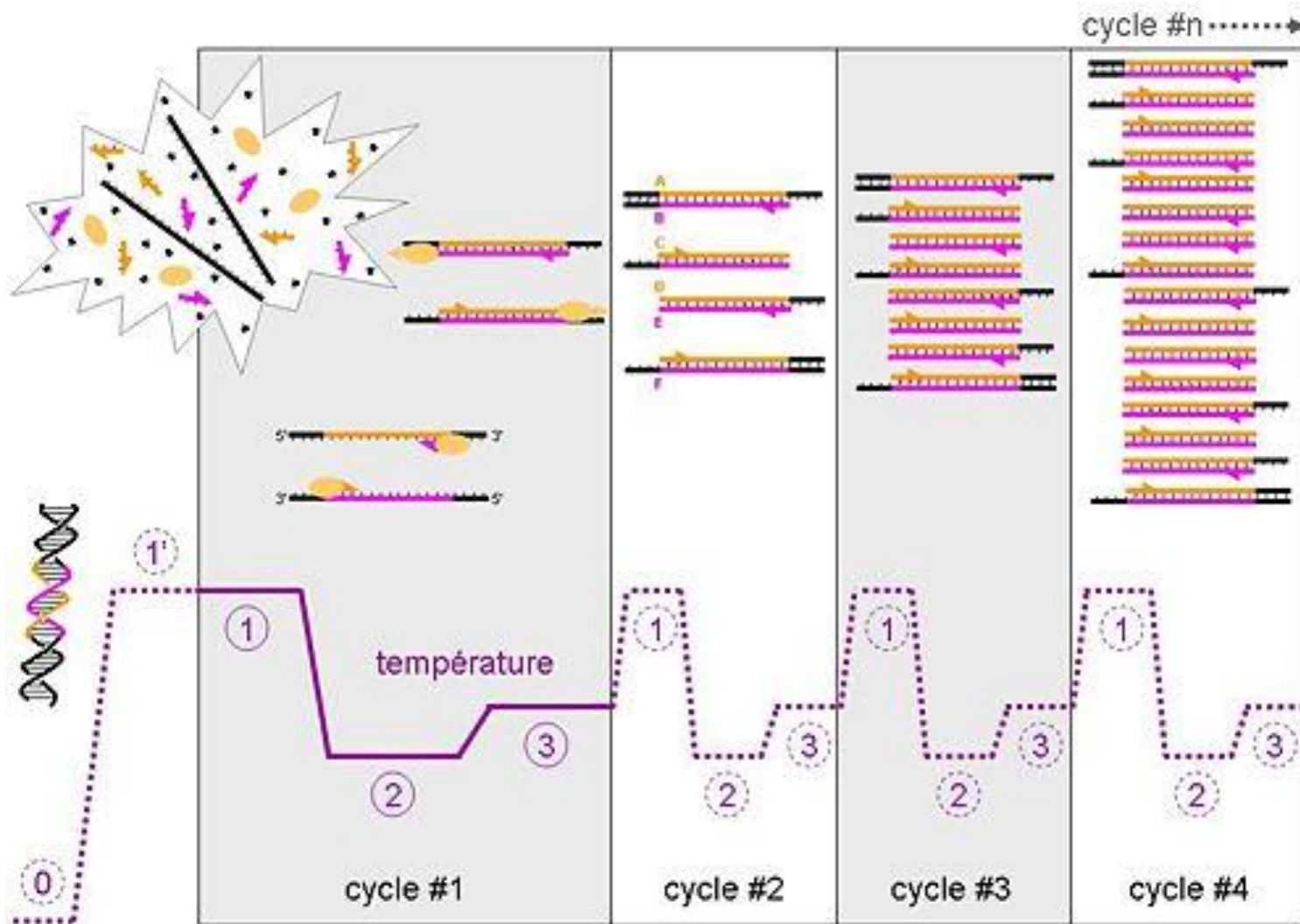


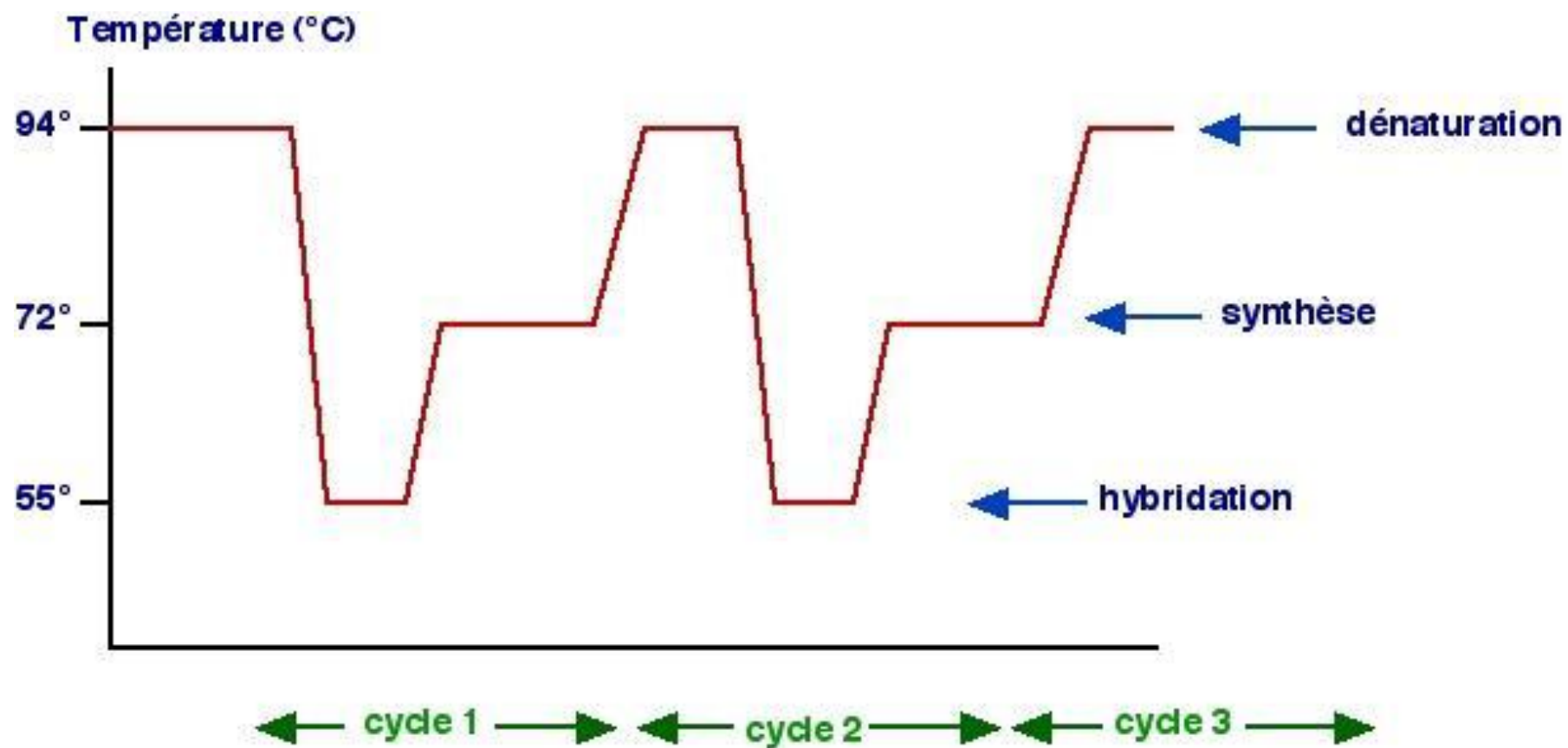
Step 3 : extension

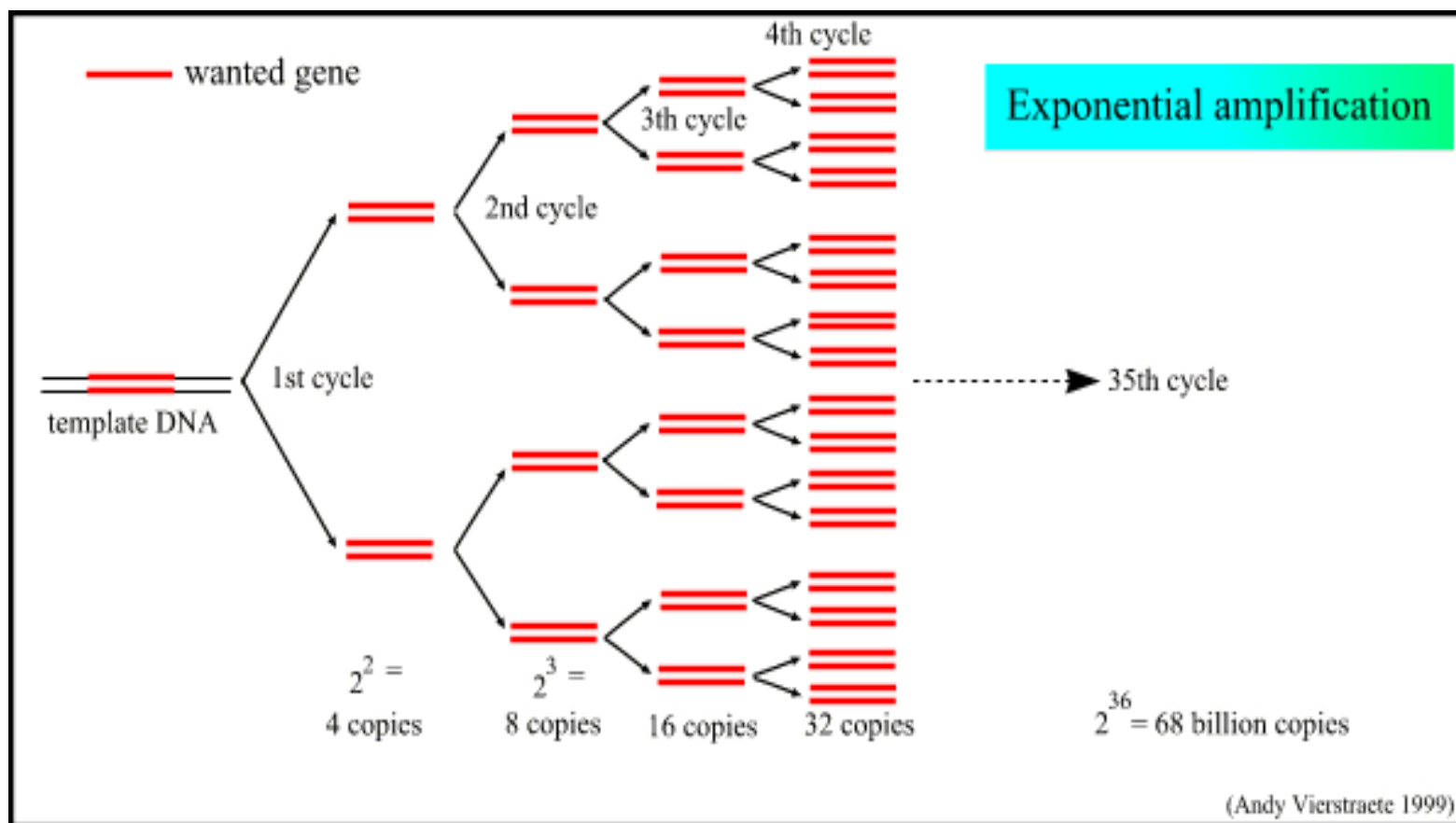
2 minutes 72 °C
only dNTP's



(Andy Vierstraete 1999)



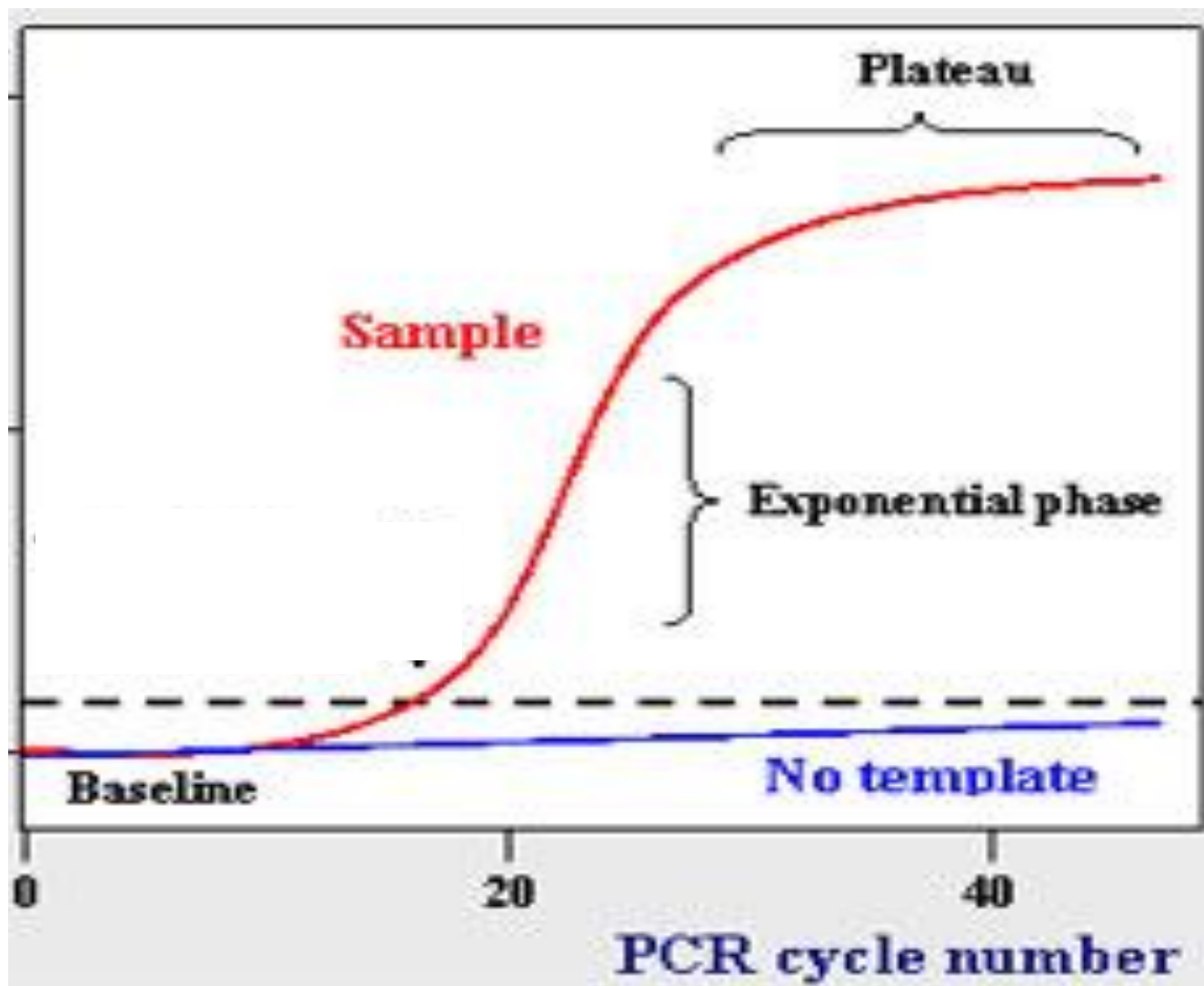




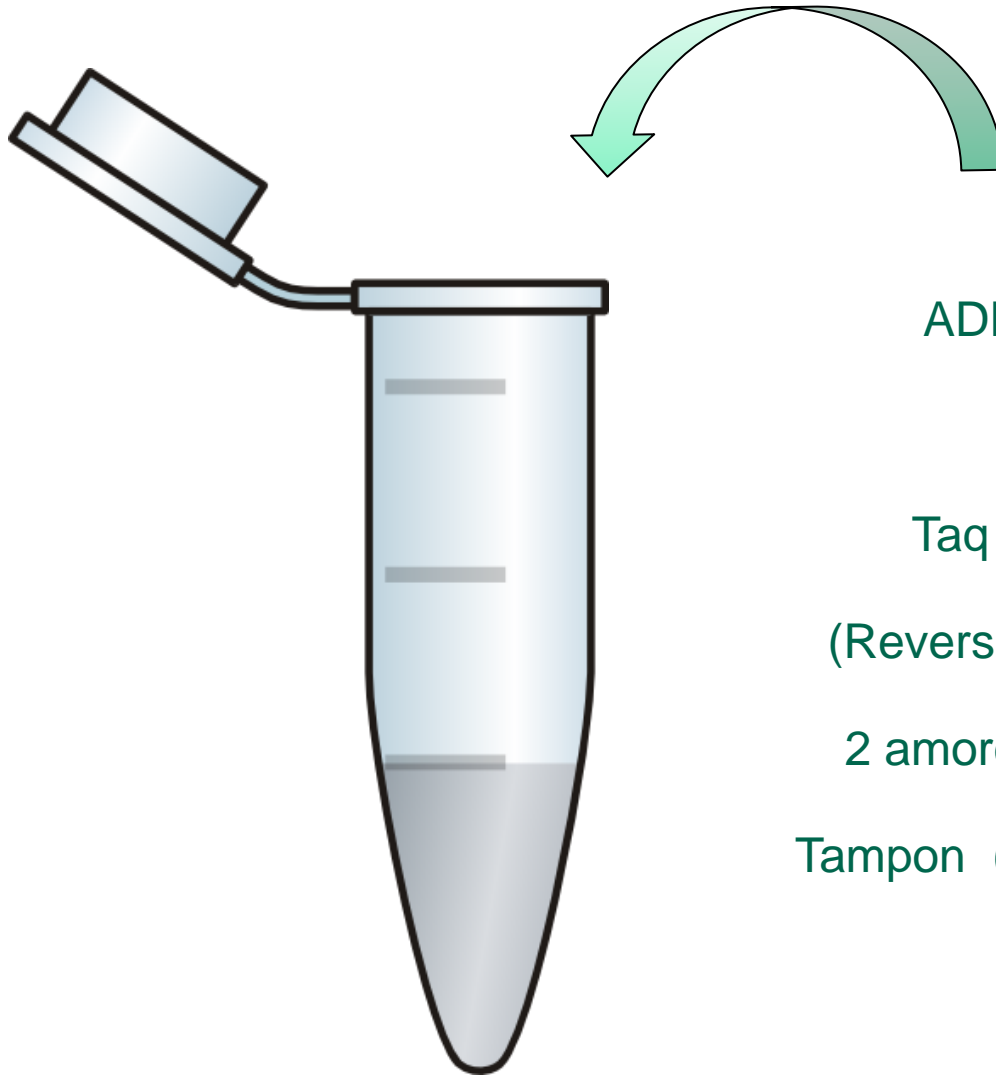
$$a \cdot 2^n$$

a : nombre initial de copies du génome
 n : nombre de cycles

Quantité de produit amplifié



Composition du mélange réactionnel (mix)



ADN ou ARN ?

dNTPs

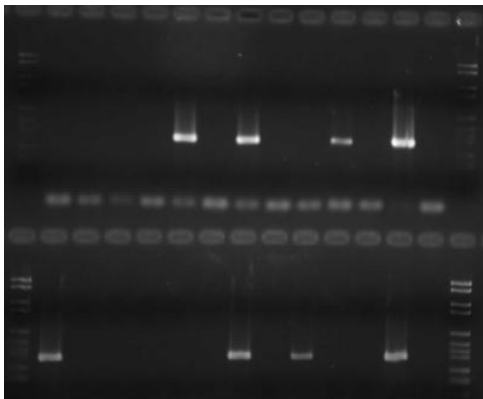
Taq Polymérase

(Reverse Transcriptase)

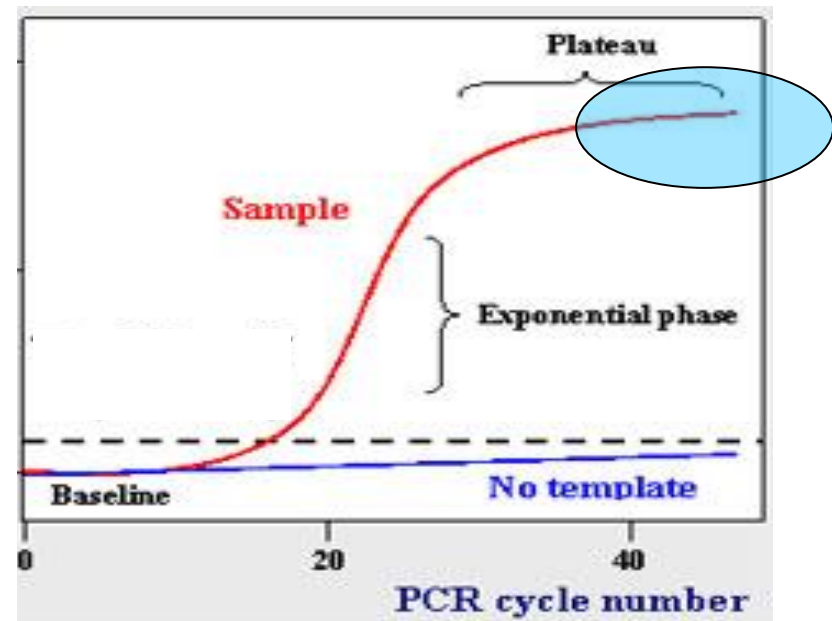
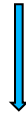
2 amorces spécifiques

Tampon (Tris, KCl, MgCl₂)

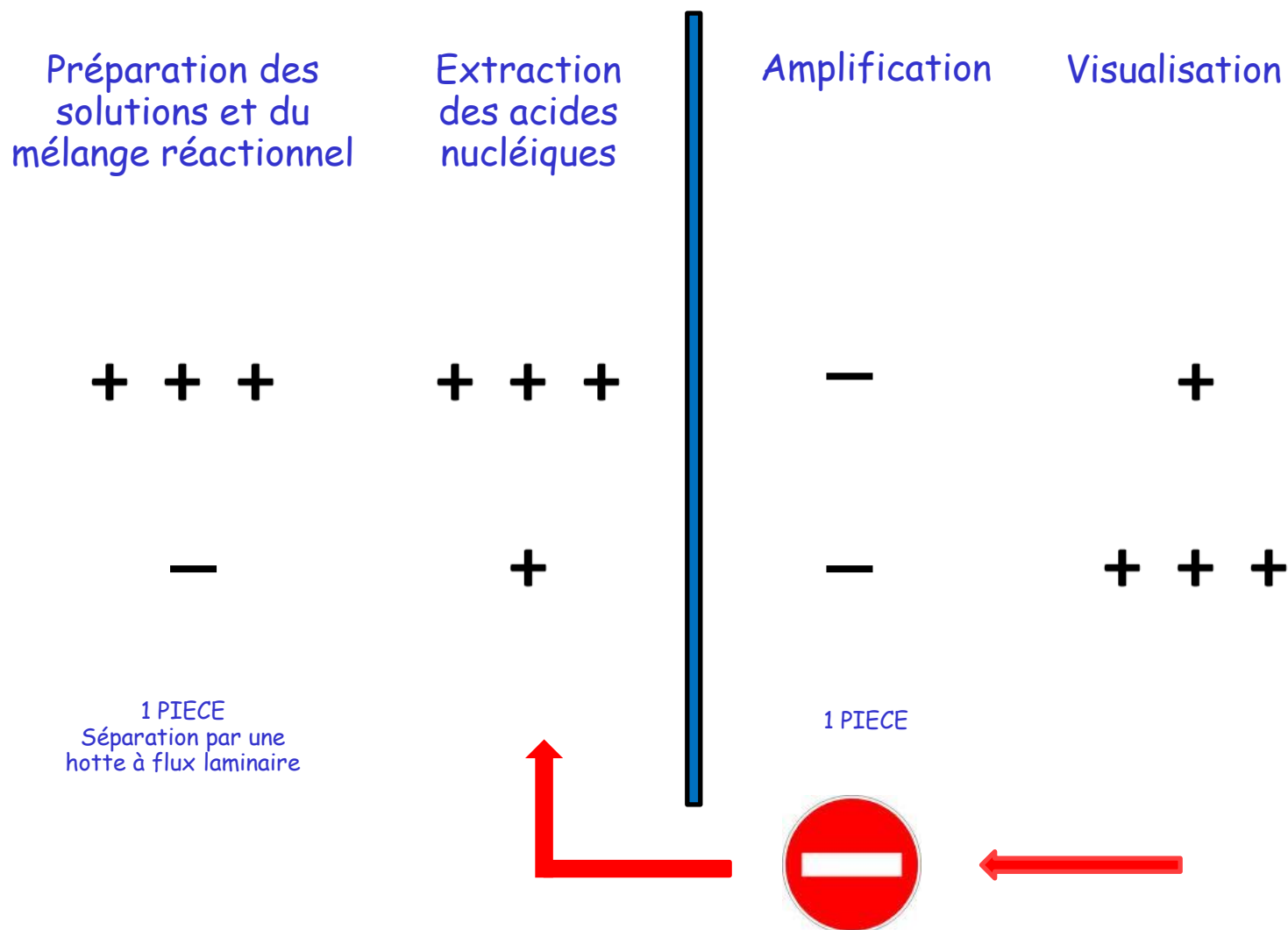
La PCR conventionnelle



Lecture des résultats (en point final)

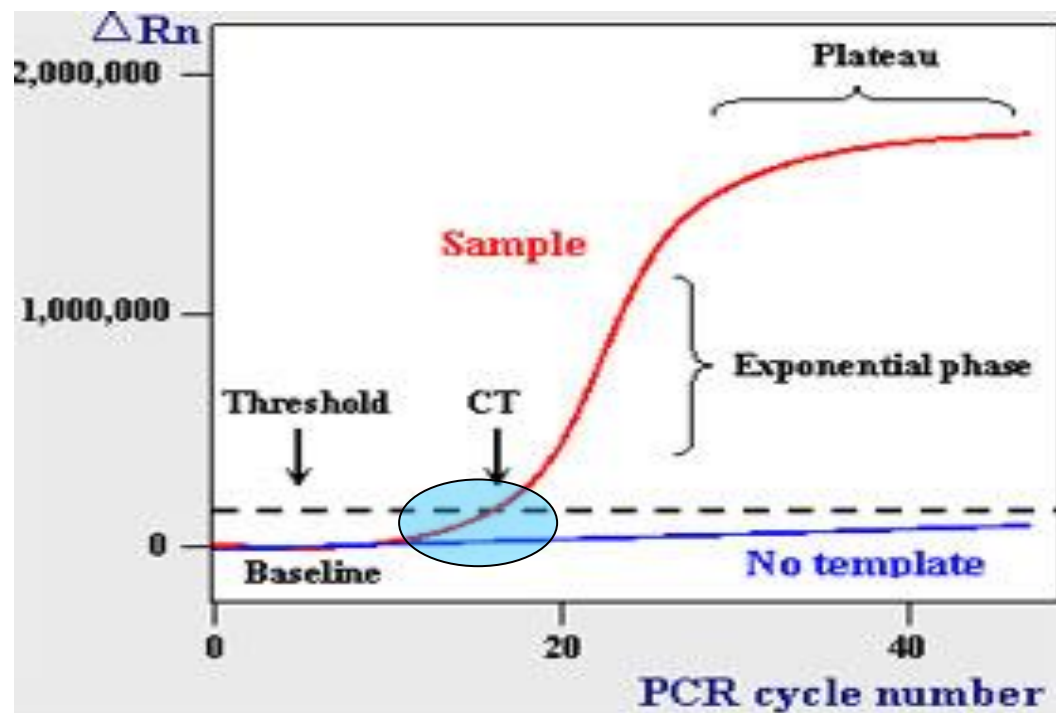
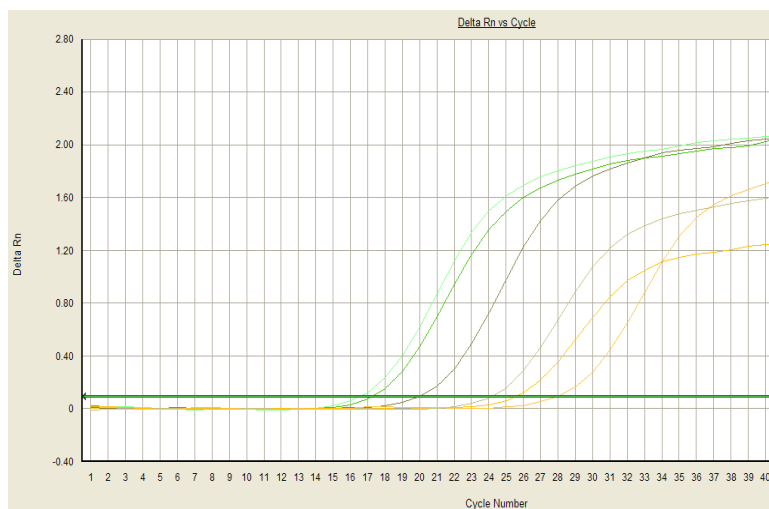
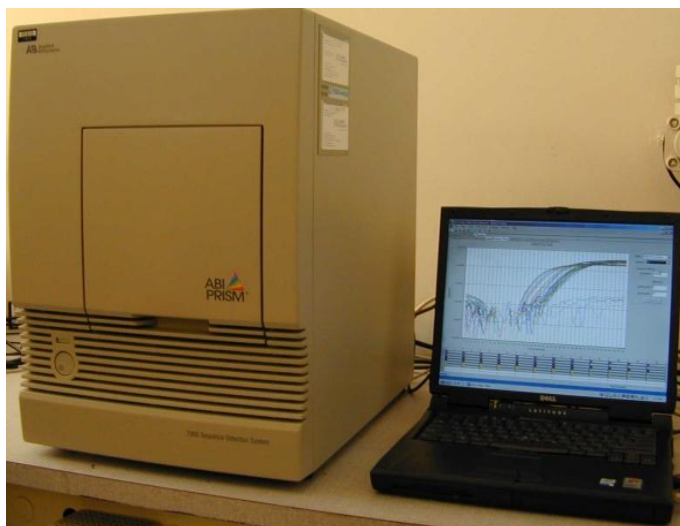


PRECAUTIONS PROPRES A LA MANIPULATION PCR

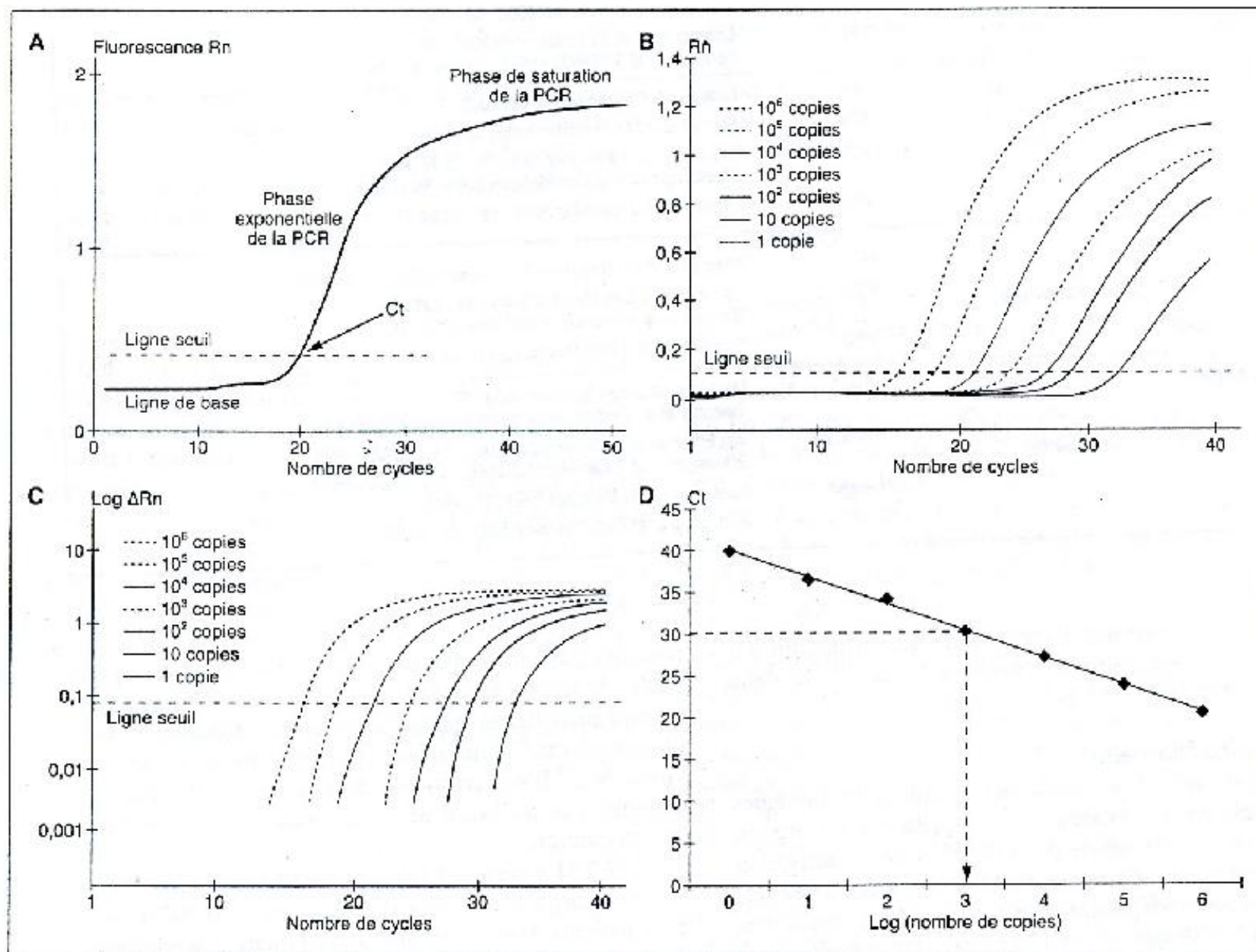


Utilisation de gants - Pointes à filtres - Matériel dédié à chaque pièce et poste de travail

La PCR en temps réel ou PCR quantitative



La PCR en temps réel- Principe



Dilution 1/2



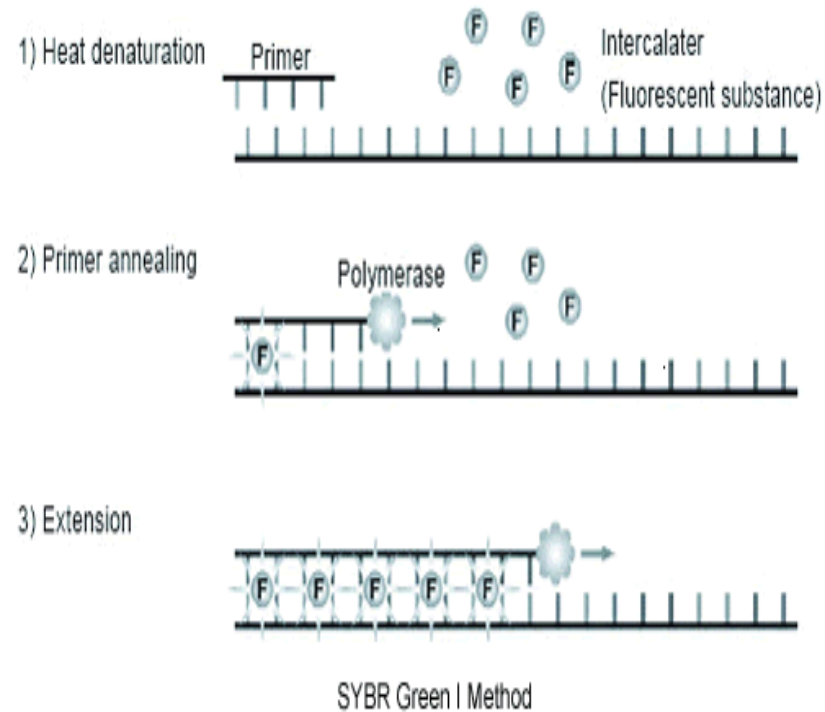
$\Delta CT : 1$

Dilution 1/10

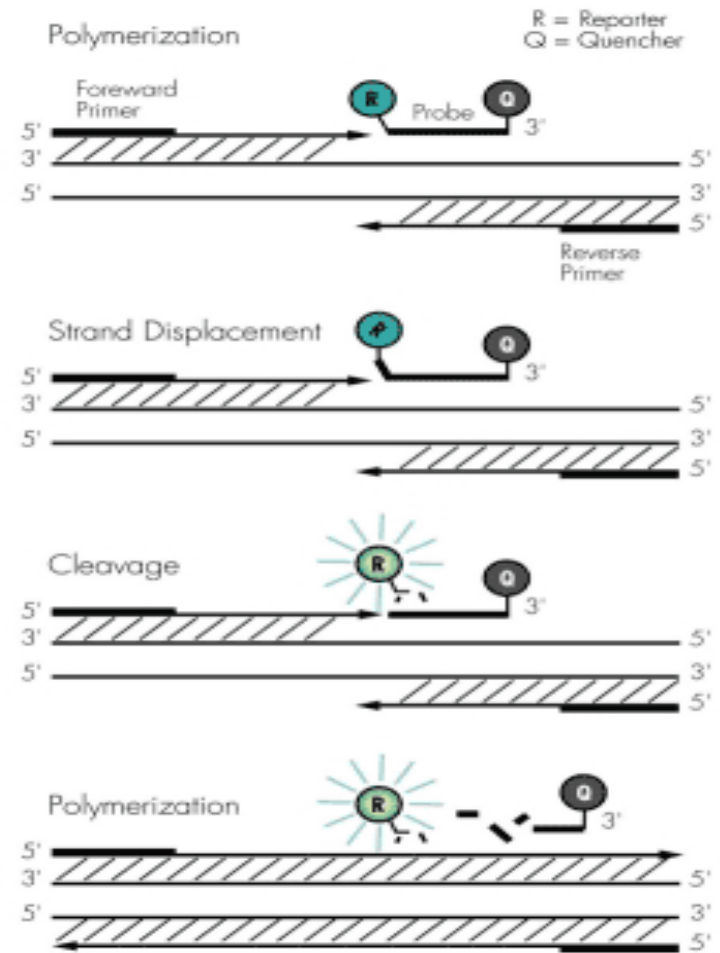


$\Delta CT : 3.32$

Le système SYBR GREEN



Le système Taqman



Fluorophores utilisés



Multicolor Detection

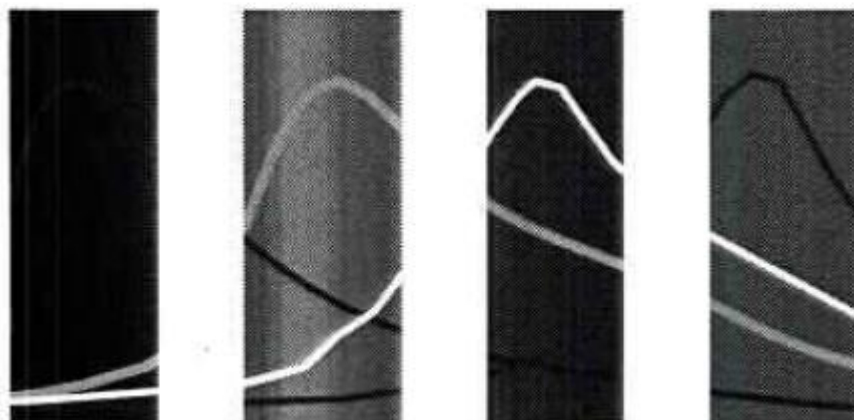
Filters	7000 Sequence Detection System 7300 Real-Time PCR System	7500 Real-Time PCR System
A	SYBR® Green I, FAM™ dyes	SYBR® Green I, FAM™ dyes
B	VIC®, JOE™ dyes	VIC®, JOE™ dyes
C	NED™, TAMRA™ dyes	NED™, TAMRA™, CY3™ dyes
D	ROX™ dye	ROX™, Texas Red® dyes
E	-	CY5™ dye

FAM™
SYBR® Green

VIC®
JOE™

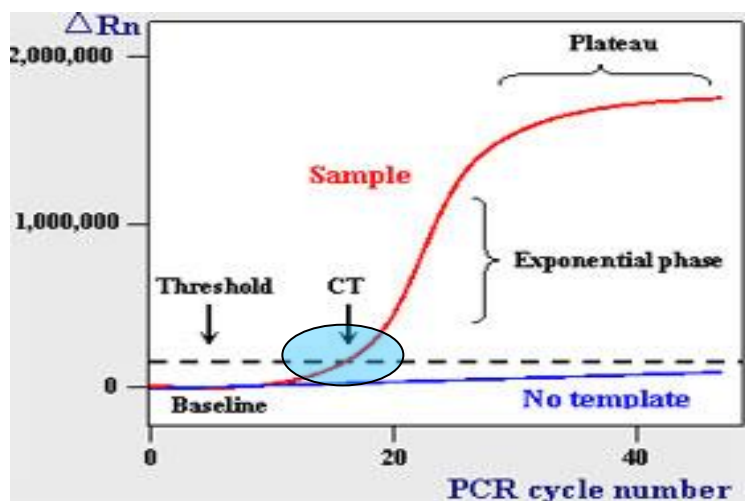
TAMRA™
NED™

ROX™

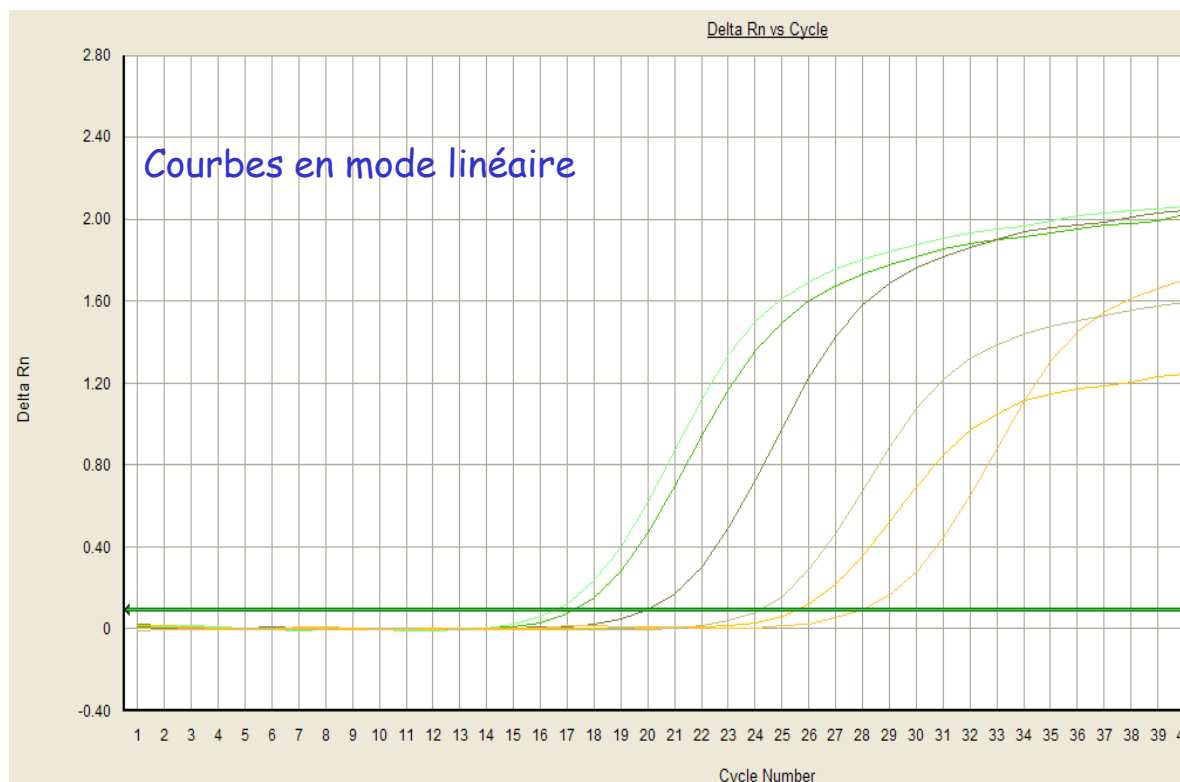


Spectres d'émission

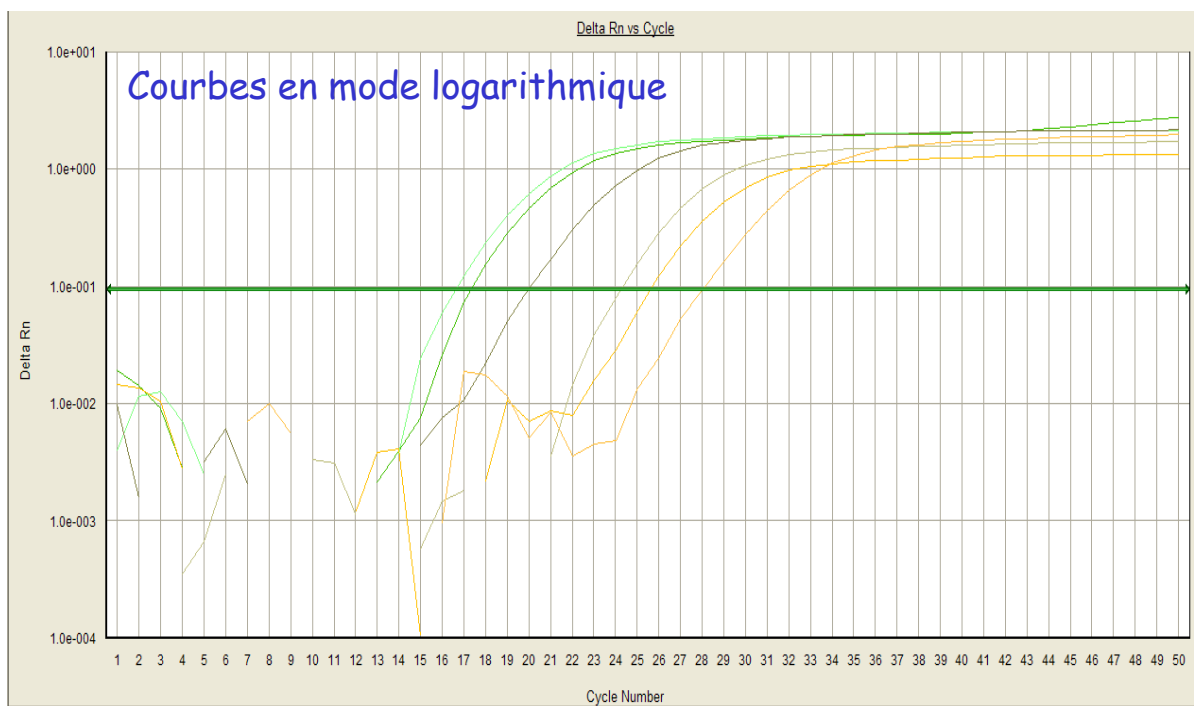
Lecture des résultats



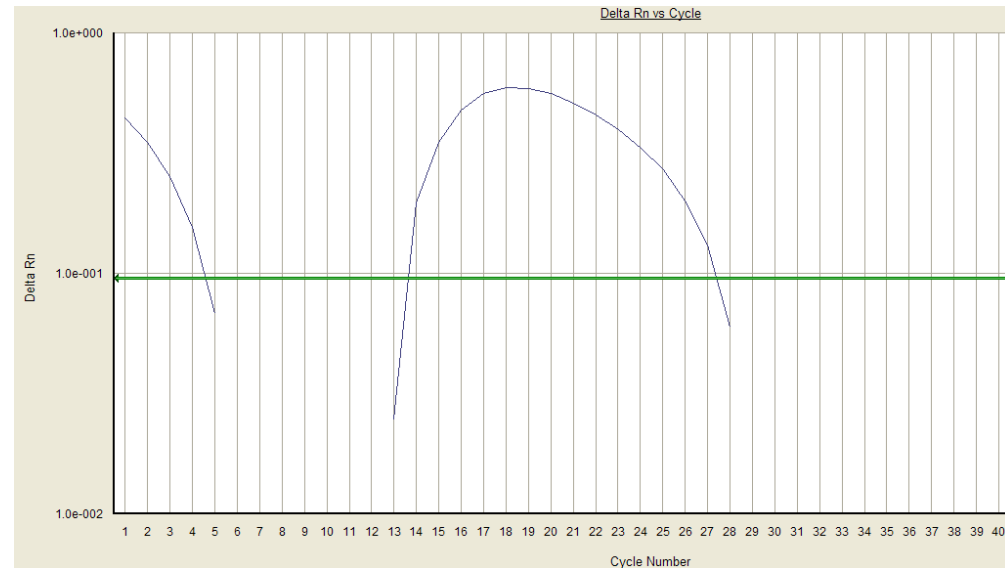
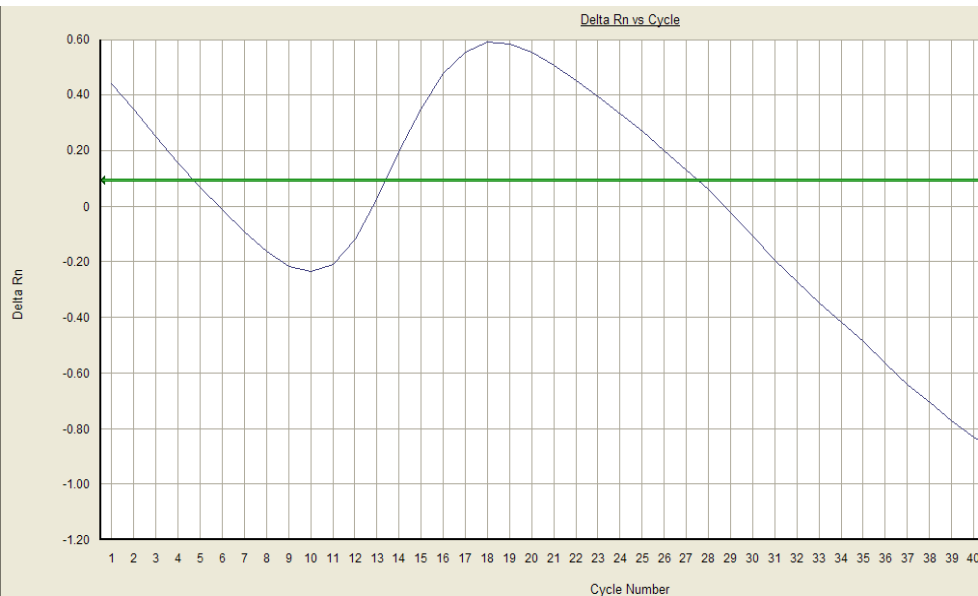
Lecture des résultats
(phase exponentielle)



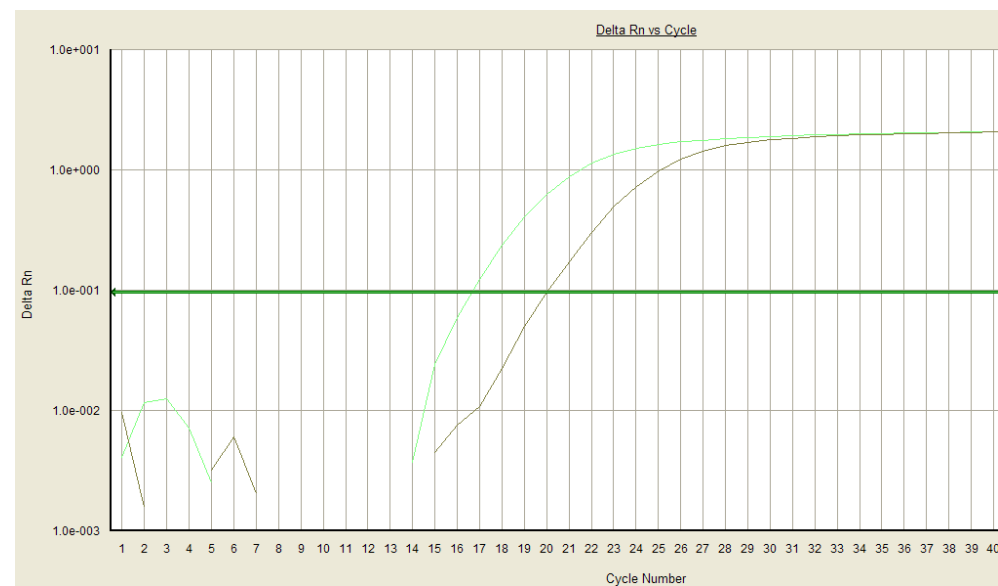
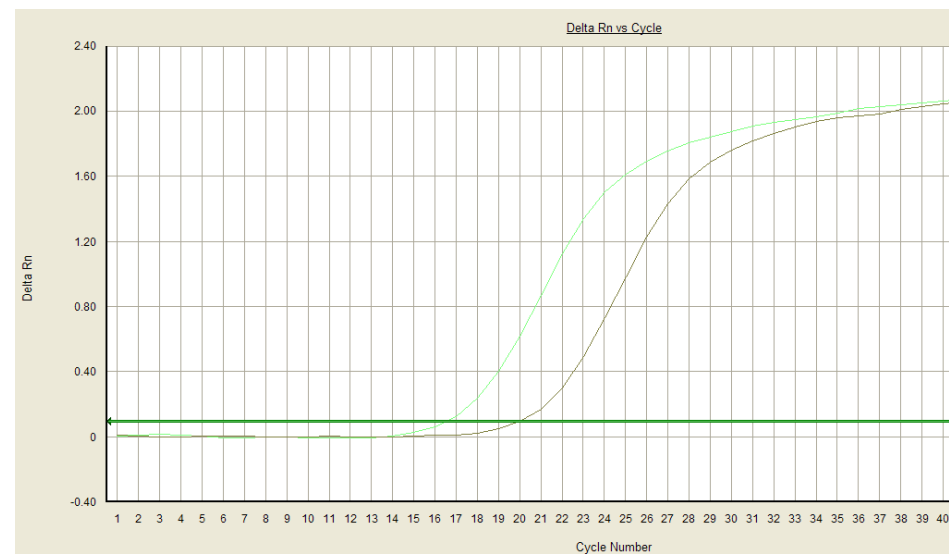
Courbes en mode logarithmique

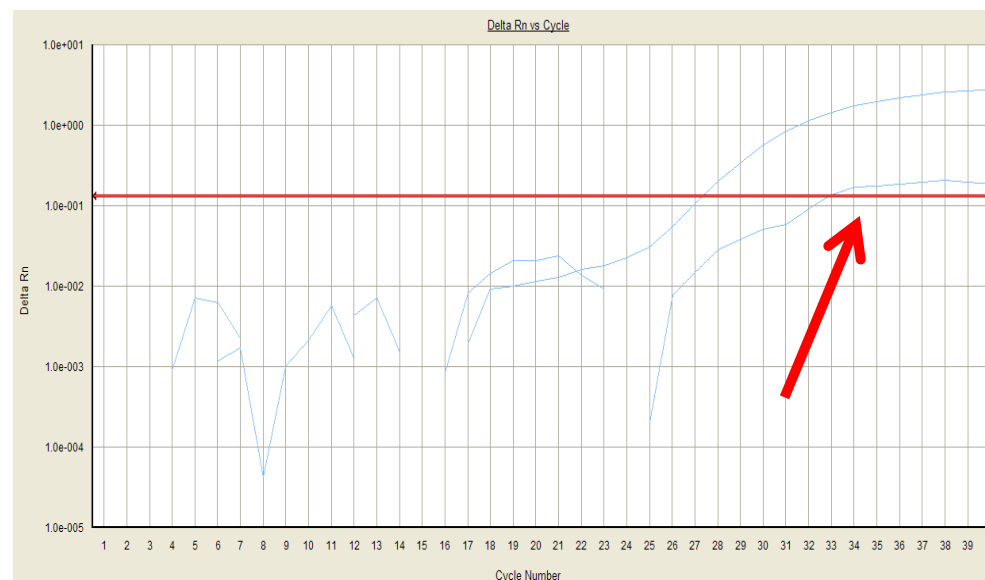
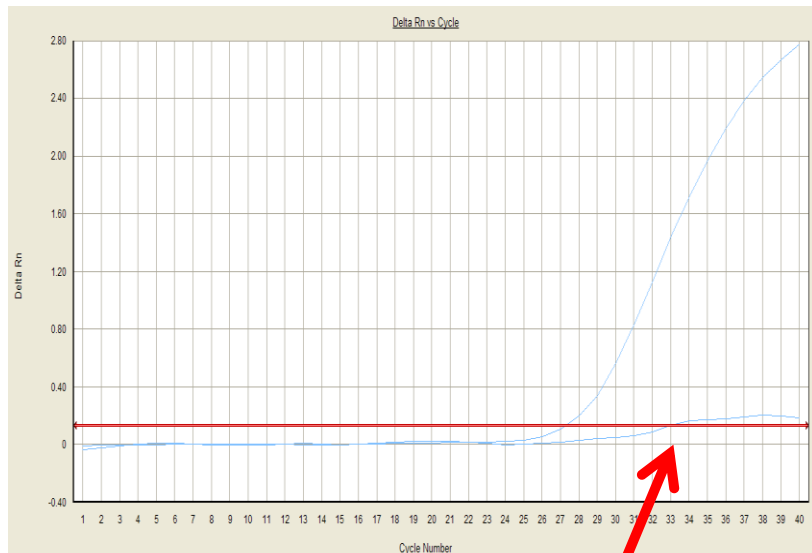


COURBES ATYPIQUES exemple : ARN trop concentré



Solution : dilution des ARN (1/10 et 1/100)





Setup	Instrument	Results				
Plate	Spectra	Component	Amplification Plot	Standard Curve	Dissociation	Report
Well	Sample Name		Detector		Task	Ct
H10	262		sondeMGB		Unknown	37.58
H10	262		sonde VIC		Unknown	28.02

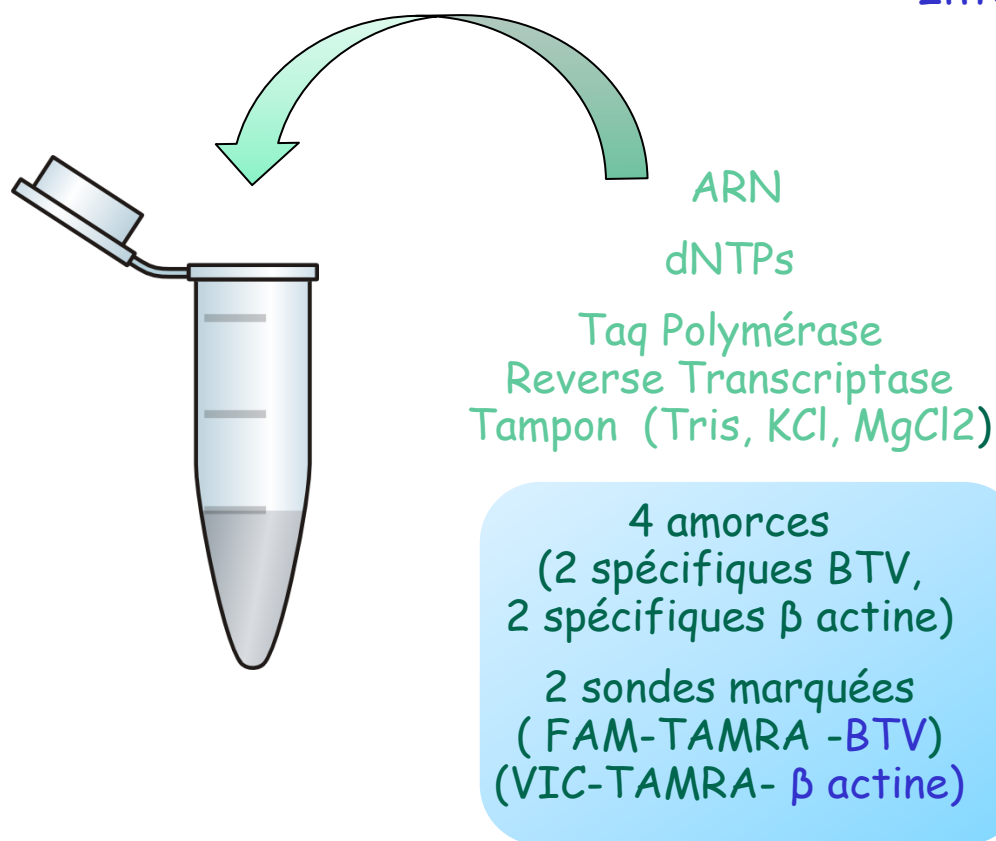
PCR en temps réel multiplex

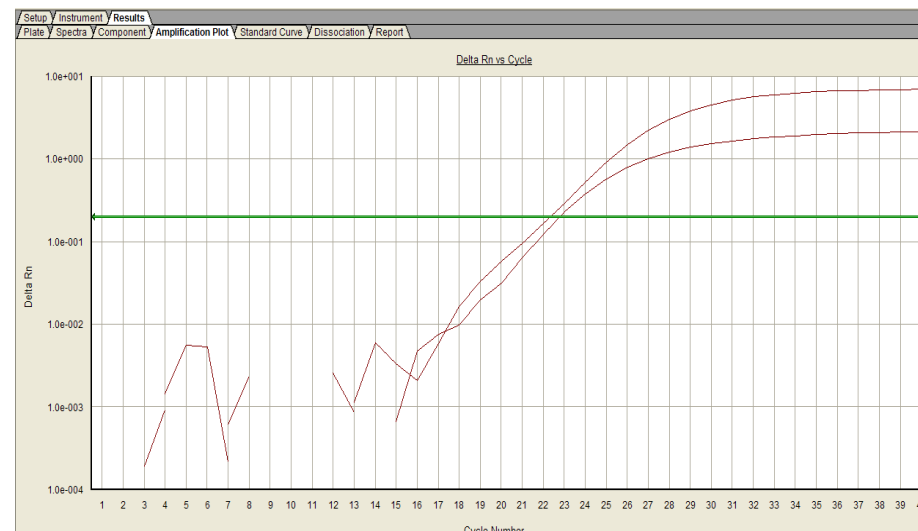
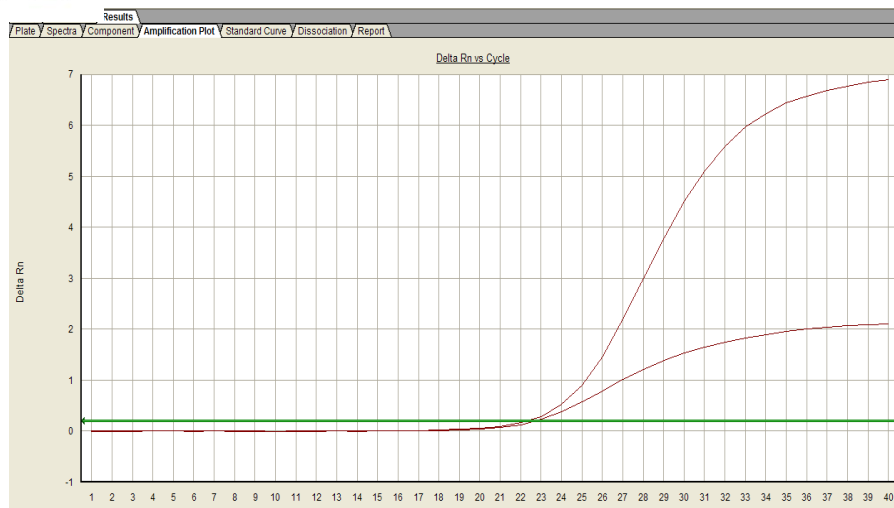
Amplification dans un même tube de plusieurs cibles

Exemple : Cible 1 Segment 10 BTV (sonde FAM) → Pathogène recherché

Cible 2 gène de la β actine (sonde VIC) → Gène présent dans les cellules animales

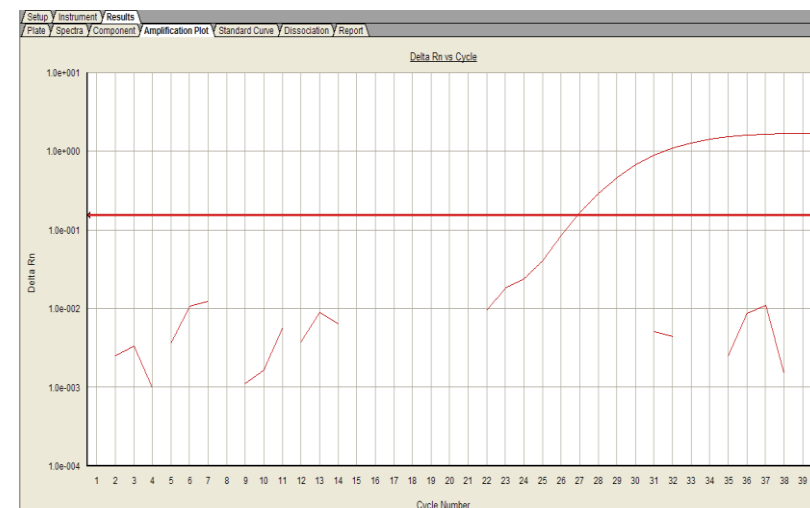
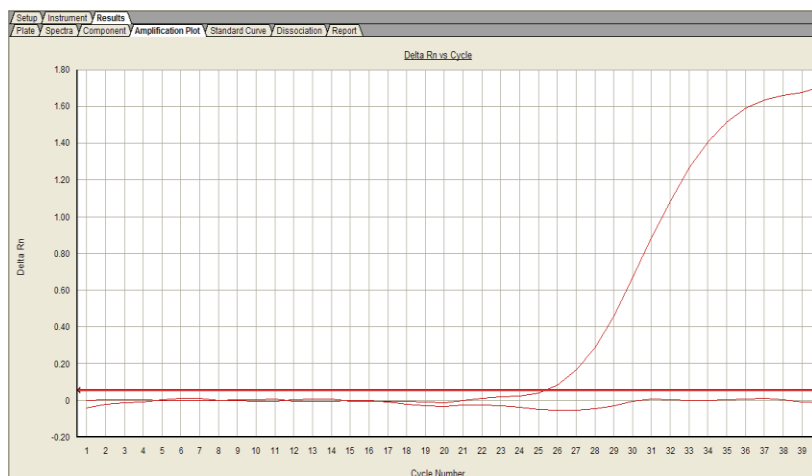
Internal Positive Control
IPC





Well	Sample Name	Detector	Task	Ct
A4	11-9	sondeMGB	Unknown	22.29
A4	11-9	sonde VIC	Unknown	22.74

Echantillon négatif




Well	Sample Name	Detector	Task	Ct
F1	11-6	sondeMGB	Unknown	Undet.
F1	11-6	sonde VIC	Unknown	26.97

Avantages

- ✦ Rapidité
- ✦ Outil très puissant (sensibilité ++++)
- ✦ Spécificité élevée
- ✦ Détection du génome (conditions de conservation du prélèvement moins importantes)

Inconvénients

- ✦ Sensibilité → Contamination (faux positifs) 
- ✦ Détection du génome →
 - Interprétation pas toujours évidente
 - Lien entre la présence du génome et la clinique !
- ✦ Coût

Application au diagnostic de la fièvre Aphteuse

Kamila Gorna

Atelier de formation sur le diagnostic de la FA

21-25 mai 2012

Méthodes RT-PCR en temps réel utilisées au laboratoire

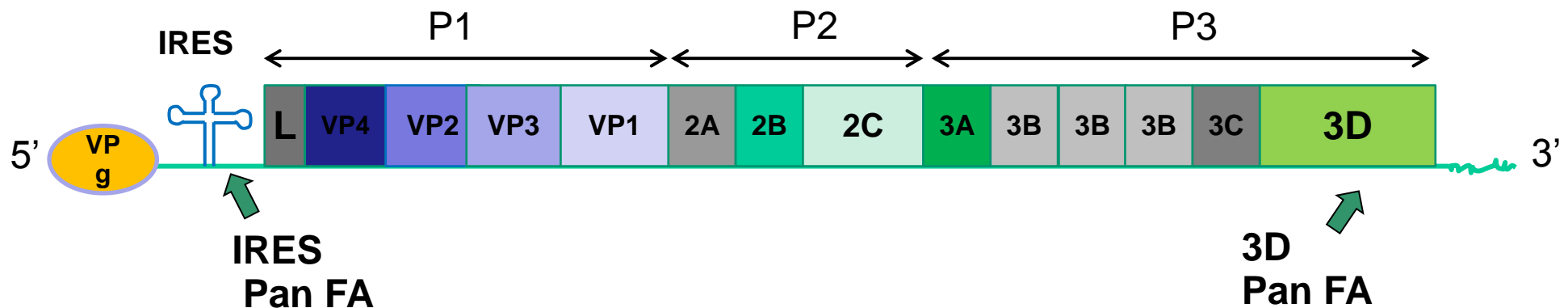


RT-PCR en temps réel **en deux étapes simplex** pour détection Pan FA
(détecte une cible dans une réaction)

Les cibles : IRES et/ou 3D, et cible endogène : β -actine

Sondes TaqMan[®] marquées FAM (en 5') et TAMRA (en 3')

Analyse d'un échantillon nécessite 3 réactions RT-PCR différentes



Méthodes RT-PCR en temps réel utilisées au laboratoire



RT-PCR en temps réel en **une étape duplex** pour détection Pan FA
(détecte deux cibles dans une réaction)
Les cibles : IRES et β -actine / 3D et β -actine



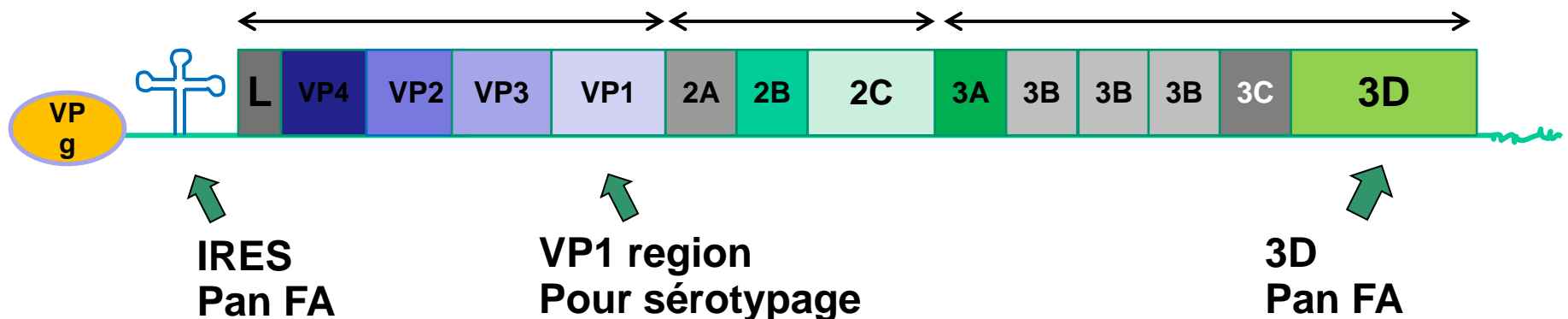
RT-PCR en temps réel en **une étape duplex** pour sérotypage
(détecte deux cibles dans une réaction)
Les cibles: O type- β -actine / A type - β -actine / Asia1 type - β -actine / SAT2 type- β -actine*

Sondes TaqMan® marquées **FAM (en 5')** et TAMRA (en 3') pour les **cibles de la FA**

Sondes TaqMan® marquées **VIC (en 5')** et TAMRA (en 3') pour le **cible β -actine**

Analyse d'un échantillon nécessite 2 réactions (pour Pan FA)

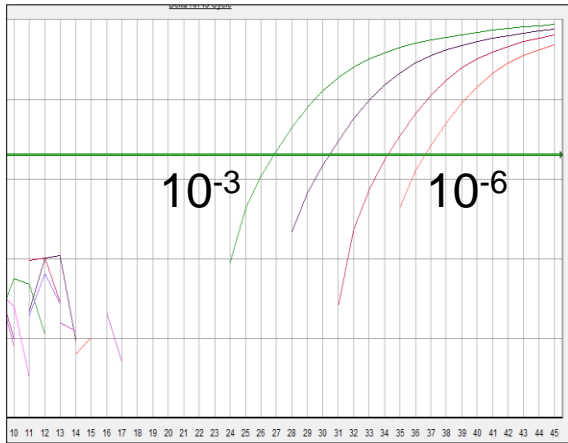
Suivant le contexte épidémiologique 1 à 4 réactions (pour sérotypage)



RT-PCR en temps réel en deux étapes simplex pour détection Pan FA

Gamme de dilution du virus FA type O (O Manisa)
(dilutions de 10 en 10 dans le broyat de la langue de bœuf)

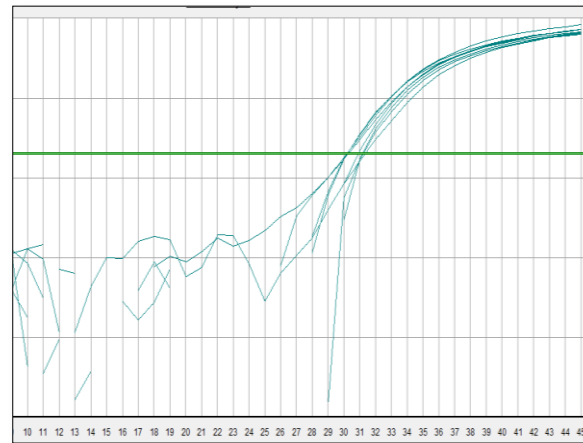
A)



B)

3D 10-3 U 26.78	3D 10-11 U Undet.	NTC U Undet.
3D 10-4 U 30.34	3D 10-12 U Undet.	
3D 10-5 U 34.13	3D 10-13 U Undet.	
3D 10-6 U 36.51	3D 10-14 U Undet.	
3D 10-7 U Undet.	3D T+ U 28.13	
3D 10-8 U Undet.	3D Teau U Undet.	
3D 10-9 U Undet.	3D T Broyat U Undet.	
3D 10-10 U Undet.	NTC RT U Undet.	

C)



D)

OM 10-3 U 31.15	OM 10-11 U 30.48	NTC U Undet.
OM 10-4 U 31.11	OM 10-12 U 30.05	
OM 10-5 U 30.85	OM 10-13 U 30.03	
OM 10-6 U 30.22	OM 10-14 U 30.02	
OM 10-7 U 31.27	OM T+ U 25.36	
OM 10-8 U 30.14	OM Teau U Undet.	
OM 10-9 U 30.16	OM T Broyat U 28.51	
OM 10-10 U 30.14	NTC RT U Undet.	

A) Courbes de RT-PCR pour le cible 3D

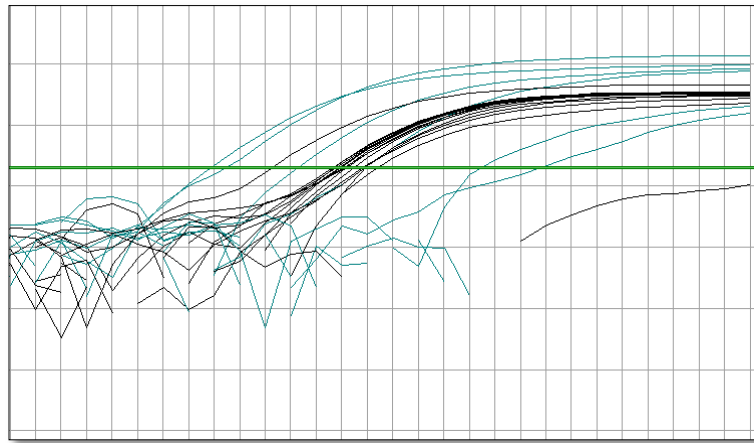
B) Plan de plaque/résultats avec des valeurs CT pour la cible 3D de la FA

C) Courbes de RT-PCR pour les cible β -Actine

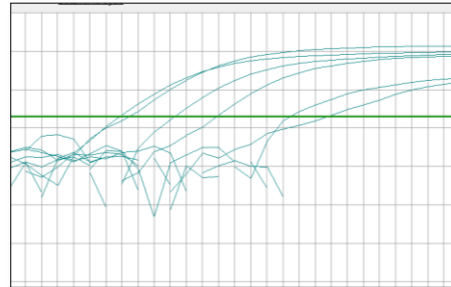
D) Plan de plaque/résultats avec des valeurs CT pour la cible β -Actine

RT-PCR en temps réel en une étape duplex pour génotypage

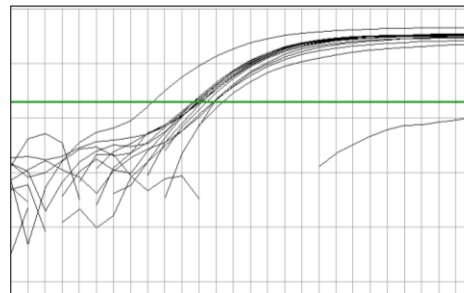
Gamme de dilution du virus FA type O (O Manisa)
(dilutions de 10 en 10 dans le broyat de la langue de bœuf)



Courbes pour les cibles:
FA/3D avec la sonde FAM (Verts)
 β -actine avec la sonde VIC (Noirs)



Courbes pour FA la cible
3D



Courbes pour la cible β -actine

4		5	
OM 10-3	U 23.82 U 30.32	OM 10-11	U Undet. U 28.60
OM 10-4	U 27.19 U 29.77	OM 10-12	U Undet. U 29.13
OM 10-5	U 29.82 U 29.37	OM 10-13	U Undet. U 29.06
OM 10-6	U 34.39 U 29.85	OM 10-14	U Undet. U 28.85
OM 10-7	U Undet. U 29.83	OM T+	U 24.37 U 26.22
OM 10-8	U 36.73 U 29.02	OM Teau	U Undet. U Undet.
OM 10-9	U Undet. U 28.57	OM Tbroyat	U Undet. U 28.66
OM 10-10	U Undet. U 28.88	NTC	U Undet. U Undet.

Plan de plaque/résultats avec les valeurs CT en **vert** pour 3D et en **noir** pour β -actine

RT-PCR classique pour la détection de la Fièvre Aphteuse

Sérotype	Région nom	Séquence (5'- 3')	Taille attendu
Tous*	IRES1 <i>sens</i>	CCT GGT CTT TCC AGG TCT AGA	375 bp
Tous*	IRES4 <i>reverse</i>	CCT ATT CAG GCG TAG AAG CTT	
Tous*	3D <i>sens</i>	TTC GAG AAC GGC ACG GTC GGA	957bp
Tous*	3D <i>reverse</i>	GTAAAG TGA TCT GTA GCT TGG	
Tous**	IRES <i>sens</i>	CGT CHG CGC ACG AAA CGC	527 bp
Tous**	IRES <i>reverse</i>	RCG ATR AAR CAG TCR GTY R	
Tous**	3D <i>sens</i>	GAC AAA GGT TTT GTT CTT GGT CA	295 bp
Tous**	3D <i>reverse</i>	TCA CCG CAC ACG GCG TTC A	

* Utilisé principalement pour la détection de la FA

** Utilisé aussi pour la recherche de mutations dans la région des cibles IRES et 3D de la rtRT-PCR

Exemple de résultats

RT-PCR avec les amorces pour amplification des fragments IRES et 3D
(Détection de la FA)

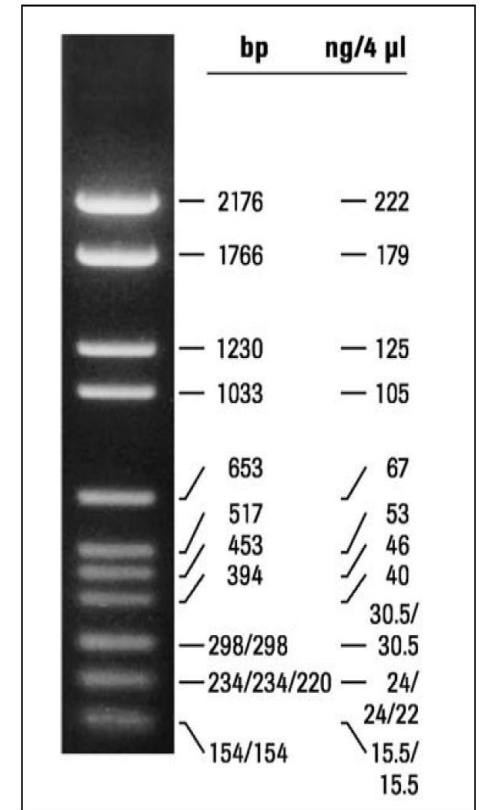
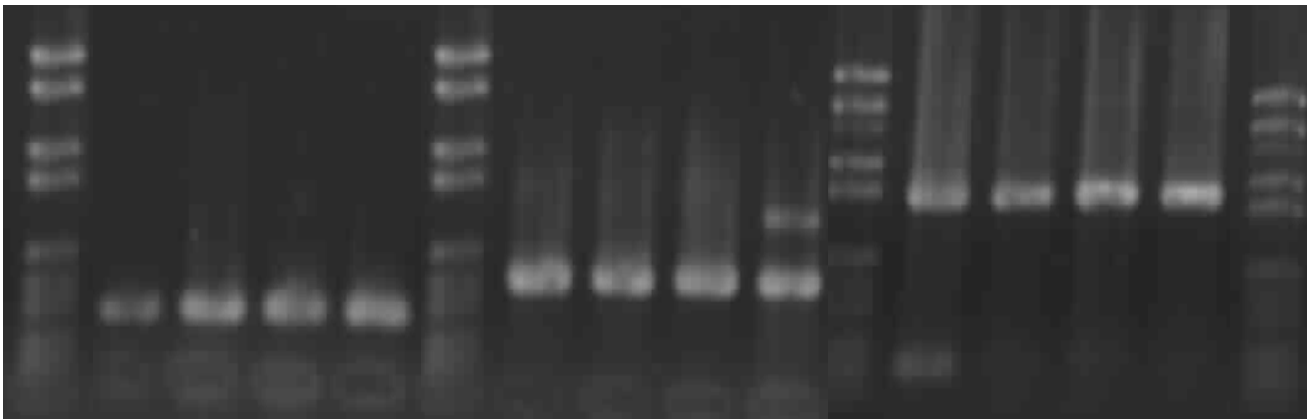
Amorces:
IRES1 (F) IRES4 (R)
Taille attendu: 375bp



Amorces:
IRES (F) IRES (R)
Taille attendu: 527bp



Amorces:
3D (F) 3D (R)
Taille attendu: 957bp



RT-PCR classique pour le sérotypage de la Fièvre Apteuse

Sérotype	Nom	Séquence (5' - 3')	Taille attendu
Type O	VN-OF sens	AGATTTGTGAAAGTDACACCA	650bp
Type A	VN-AF sens	CTTGCACTCCCTTACACCGCG	416bp
Type Asia1	VN-AsiaF sens	GCGSTHRYYCACACAGGYCCGG	521bp
Tous	VN-VP1R reverse	CATGTCYTCYTGCATCTGGTT	NA
SAT2 (Lybie Egypte)*	SAT2 Fcl	GTAACCCGCTTTGCCATC	288bp
	SAT2 Rcl	CGCGTCGAATCTGTCTCTG	

**Multiplex
RT-PCR**

**RT-PCR
conventionnelle**

* Préconisé par IAH Pirbright

Exemple de résultats

RT-PCR avec les amorces pour amplification du fragment VP1 (Sérotypage)
pour les échantillons:
de sérotype O, A, Asia1 en RT-PCR multiplex
de sérotype SAT2 en RT-PCR conventionnelle

Multiplex RT-PCR

Amorces utilisées:

VN-OF sens

VN-AF sens

VN-AsiaF sens

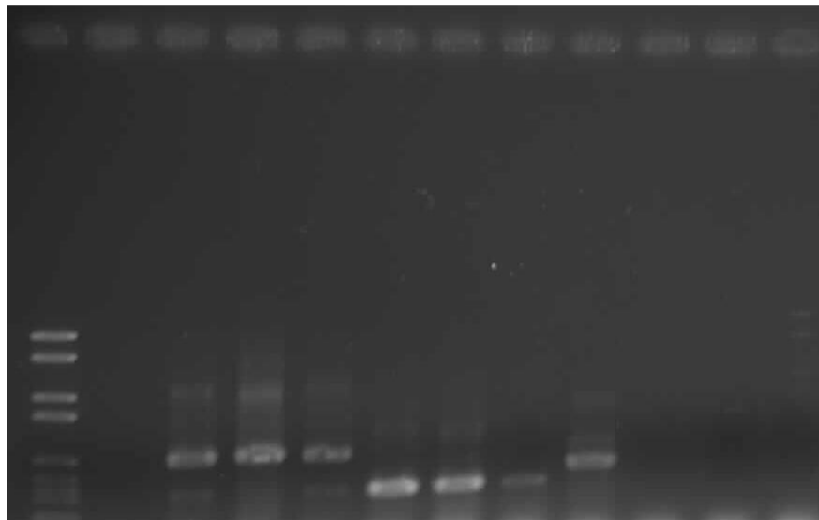
VN-VP1R
reverse

Taille attendue:

650bp

416bp

521bp

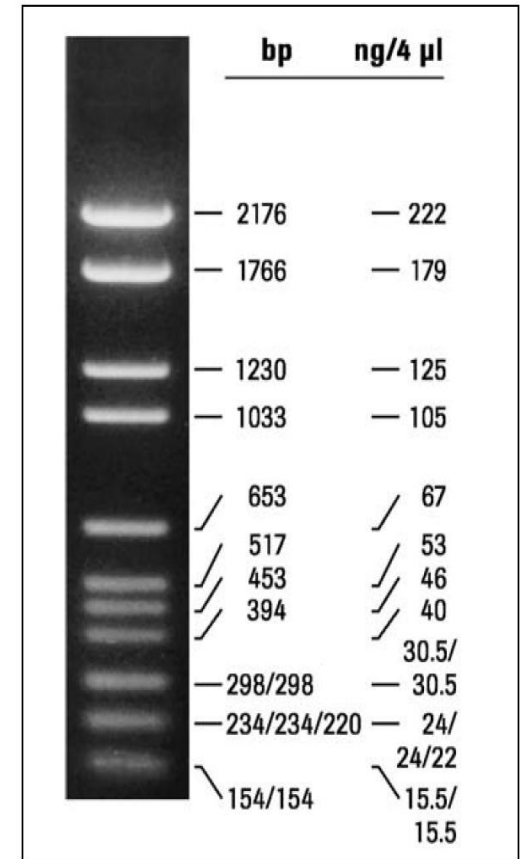
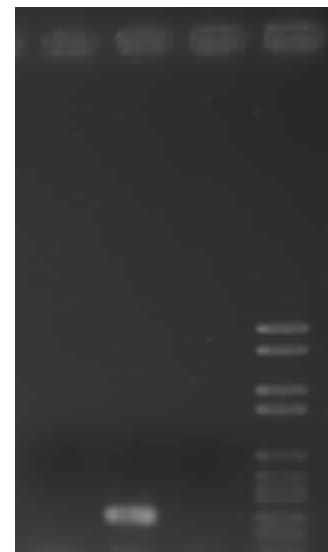


RT-PCR SAT2 conventionnelle

Amorces utilisées:

SAT2 Fcl et SAT2 Rcl

Taille attendue: 288bp



Sérotype

O

A

ASIA

SAT1

SAT2

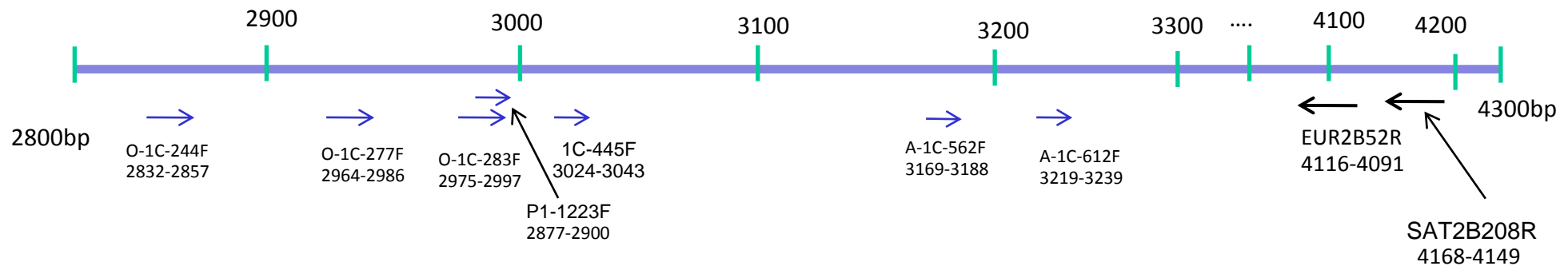
SAT2

SAT2

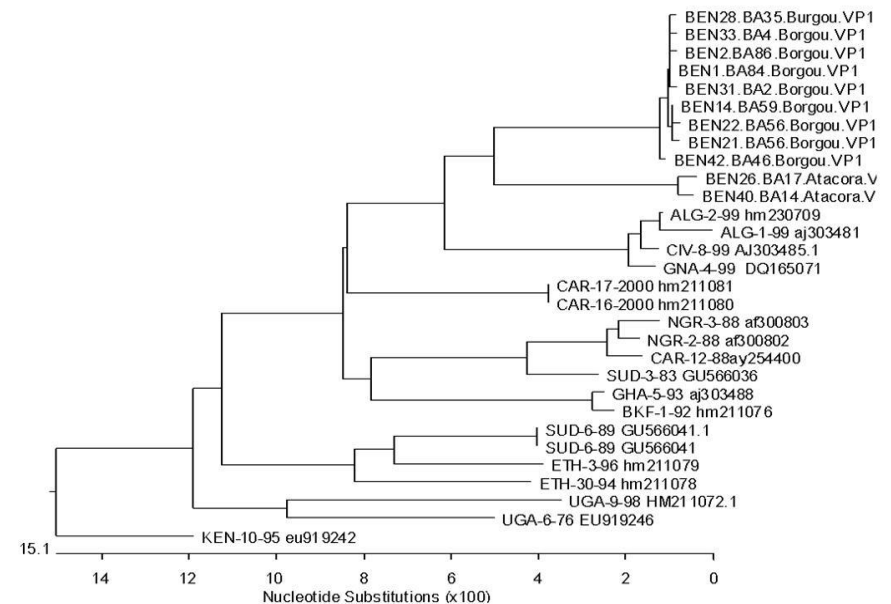
Erythrée Zimbabwe

RT-PCR classique ciblant la région VP1 (séquençage)

FA, fragment du génome



Sérotype	Amorce forward	Région (F)	Amorce reverse	Région (R)	Taille de fragment obtenu
O	1C-244F	VP3	EUR-2B52R	2B	1155bp
O	1C-272F	VP3	EUR-2B52R	2B	1130bp
O	1C-283F	VP3	EUR-2B52R	2B	1119bp
A	1C-562F	VP3	EUR-2B52R	2B	846bp
A	1C-612F	VP3	EUR-2B52R	2B	795bp
SAT2	1C-445F	VP3	SAT2B208R	2B	1125bp
SAT2	P1-1223F	VP3	SAT2B208R	2B	1255bp



Etude d'épidémiologie moléculaire