

## Notions de biologie moléculaire

### PCR et applications en Parasitologie et Mycologie médicales

#### • INTRODUCTION

L'identification moléculaire des micro-organismes « parasites et champignons » grâce à la détection et l'identification de leurs acides nucléiques.

Permet le diagnostic précoce et précis d'espèces à partir de différents prélèvements biologiques ou des milieux de cultures

Plusieurs techniques de biologie moléculaire /exemple : PCR : **Polymérase Chain Reaction**

#### 1. Intérêts de la PCR en parasitologie

- Essentiellement dans un but **diagnostic**: meilleure sensibilité de détection et une spécificité absolue (un petit fragment de l'ADN parasitaire peut être détecté dans le produit pathologique);
- Un but **épidémiologique** : typage de nouvelles espèces et souches grâce à leurs gènes (taxonomie génomique)
- Un intérêt **thérapeutique** : détecter les gènes impliqués dans la résistance à certaines molécules thérapeutiques (MDR : « *multi Drogue Resistance genes* » des Leishmanies et des Plasmodiums);
- Et enfin, en **prophylaxie** : un espoir de vaccin à ADN : isoler un gène stable impliqué dans une bonne réaction immunitaire douée d'une mémoire.

#### 2. Principe de la PCR:

- L'amplification d'un fragment d'ADN par répllication enzymatique (*in vivo* : dans une cellule eucaryote se fait grâce à l'enzyme → l'ADN polymérase).
- La technique **PCR** utilise le même principe de répllication d'un fragment d'ADN, grâce à une **ADN polymérase Thermostable** appelée la **Taq polymérase** (issu d'une bactérie vivant en eau chaude : le ***Thermus aquaticus***) → utilisation *in vitro*.
- La technique PCR utilise également un **couple d'amorce oligo-nucléotidique**
- Dans un procédé répétitif de **3 étapes successives** réalisées dans un appareil appelé le **thermocycleur (voir figure 1)**:
  - ✓ **Dénaturation** à 94°- 95°C pendant 1 min ;
  - ✓ **Hybridation** à 54°C pd 30 sec à 1 min ;
  - ✓ **Elongation** à 72°C pd 30 sec à qlq min.

#### 3. Etapes de la PCR :

- A. Préparation des réactifs (dNTP, Amorces, Taq pol.) → c'est le mix (**mélange réactionnel**) [figure 2] ;
- B. Extraction de l'ADN de l'échantillon (par la technique au phénol – chloroforme)
- C. Amplification (ds le thermocycleur → cycles de la PCR) (exponentiel **2<sup>n</sup>**) [n: nombres de cycles ≈ 35] (**figure .3**) ;

**D.** Détection des fragments d'ADN amplifiés selon 3 procédés possibles, mais si l'échantillon est négatif au bout de 30 cycles → on ne détecte rien que les amorces :

Les 3 procédés possibles de détection des fragments d'ADN amplifiés (produits de la PCR) sont :

- **Migration sur gel d'agarose** → Révélation / **Bromure d'Ethidium** (détection selon la taille des fragments)
- **Hybridation** sur plaque type Elisa (détection selon la fluorescence) → c'est le couplage **PCR-EIA** (immuno-enzymatique assay)
- **Southern Blot**, c'est la méthode de référence (Détection selon la taille + fluorescence)



Fig. 1 : le Thermocycler

#### Dans un microtube :

- ADN à amplifier ou matrice : 50ng à 5 µg (20-25 nucléotides)
- les 2 amorces
- dNTP : désoxy Nucléotides Triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- Taq Polymérase
- tampon avec Mg<sup>++</sup>

#### Fig.2 : Le Mix = mélange

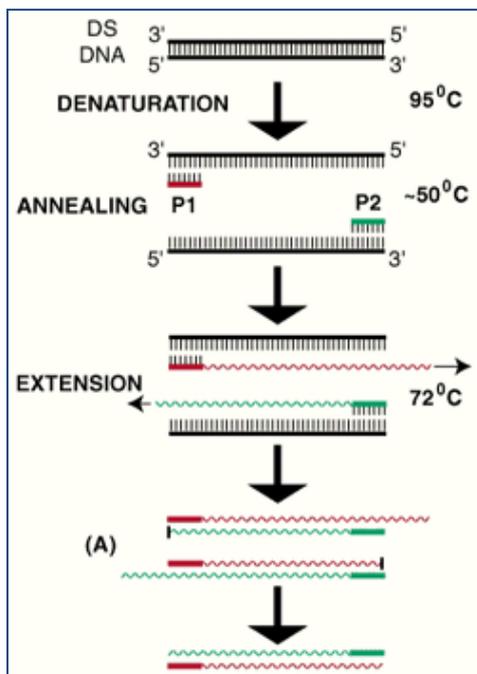


Fig. 3 : cycle d'une PCR

**4. Avantages de la PCR :**

- Simplicité (automatisation, temps réduit)
- Sensibilité élevée (peut détecter 1 pico-gramme d'adn)
- Spécificité bonne (mais dépend du choix des amorces → soit cibler un fragment spécifique d'ADN parasite ou un fragment commun à plusieurs espèces)

**5. Limites de la PCR****5.1. Faux positifs**

- ✓ Contamination par portage d'ADN préalablement amplifié (lors d'un test précédent)
- ✓ Contamination croisée entre les différents échantillons
- ✓ Contamination à partir des milieux de cultures du pathogène
- Pour éviter ces problèmes :
  - Organisation des locaux du laboratoire (3 pièces au moins)
  - Respect des règles de déplacement du personnel (toujours ds un seul sens : entrée différentes de la sortie, sans revenir aux pièces précédentes) (voir schéma)
  - Matériels dédiés (pipettes dans chaque unité du labo.)
  - Utiliser des pipettes à pression → embout avec système anti-reflux
  - Inactivation de l'ADN contaminant par système UNG (Uracil -N-Glycosylase) /dUTP → qui élimine l'ADN précédemment amplifié
  - Incorporation de Témoin négatif
  - Choix des amorces et sondes spécifiques

**5.2. Faux négatifs :** provoqué par les inhibiteurs de la PCR

- Héparine proscrite (utilisé comme anticoagulant l'EDTA)
- Sang ne doit pas être hémolysé
- Gants sans talc
- Eliminer traces éthanol (utilisé lors de l'extraction ADN)
- Contrôler par un témoin positif (garantie protocole)

**6. Applications de la PCR: parasitologie****• Toxoplasmose :**

- gène cible : B1 (répéter 30 fois ds l'ADN du Toxoplasme), gène 529
- applicable sur tout type de prélèvement : sang, placenta, HA, liq Amn

**• Leishmaniose:**

- l'avantage est que ça se pratique sur tous types de prélèvements (moelle, sang, biopsie ganglionnaire...).
- permet de détecter les gènes de résistance aux TRT.

- **Paludisme:**
  - utiliser essentiellement la variante PCR-RFLP (restriction de fragments de longueur polymorphe) → détecté les mutations impliquée ds les résistances aux TRT.
- **Autres parasitoses :**
  - Cryptosporidiose, Giardiose, Cyclosporidiose → recherche de leur ADN dans l'eau (pollution hydrique des piscines...)

#### 7. Applications de la PCR: Mycologie médicale :

Diagnostic groupé des mycoses par la recherche d'une « séquence universelle, communes aux champignons par un couple d'amorces Panfongique /Exp. ADN → ARNr 18S → commun à *Candida* sp./ *Aspergillus* sp./ Dimorphiques/ Pneumocyste → ce qui permet de confirmer ou infirmer l'origine fongique de l'infection suspectée.

#### Les gènes recherchés spécifiques / espèces :

- Actine, 14  $\alpha$  lanostérol Méthylase → *Candida* sp.
- Aspartyl protéinase, HSP90 → *Candida albicans*
- IgE Binding Protein, protéase alcaline → *Aspergillus fumigatus*

#### Intérêt :

- Identifier les souches impliquées ds les infections nosocomiales
- Un grand apport ds le diagnostic des champignons Dimorphiques pour lesquels la culture est dangereuse