

UNIVERSITÉ D'ANTANANARIVO - FACULTÉ DES SCIENCES

AEA - BIOCHIMIE APPLIQUEE AUX SCIENCES MEDICALES

COURS DE GENETIQUE MOLECULAIRE

**Chapitre XII: DIAGNOSTIC MOLECULAIRE
DES MALADIES INFECTIEUSES**

Voahangy RASOLOFO RAZANAMPARANY

Institut Pasteur de Madagascar

INTRODUCTION

Un des buts de microbiologie: identification et la classification des microorganismes en groupes d'affinité (taxons) → étudier leur extraordinaire diversité.

- **Approche diagnostique:** détection d'un germe connu dans un prélèvement éventuellement polymicrobien (produit pathologique tel que des selles ou un pus).

- **Approche taxonomique:** identification et classification de microorganismes, éventuellement inconnus.

→ Ces deux approches utilisent des techniques de "**recherche**" des microorganismes.

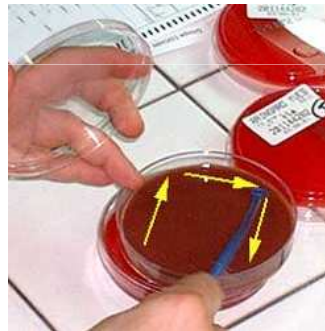
Globalement, pour identifier une bactérie dans un prélèvement:

1) Obtenir en culture pure (l'isoler des autres germes éventuellement présents dans le prélèvement)

Prélèvements



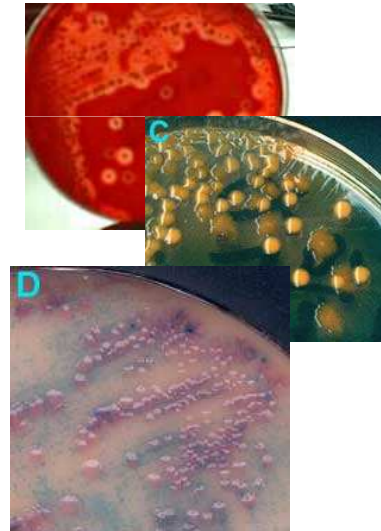
Etalement sur milieu de culture



Incubation dans une étuve
18 à 24h (ou plus)



Résultat: colonies bactériennes



2) Déterminer certains de ses caractères morphologiques, biochimiques, antigéniques et cultureux.

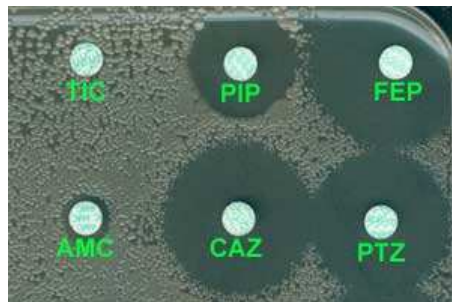
2) puis déterminer certains de ses caractères morphologiques, biochimiques, antigéniques et cultureux.

-Tests d'orientation rapide : oxydase, catalase, coagulase...

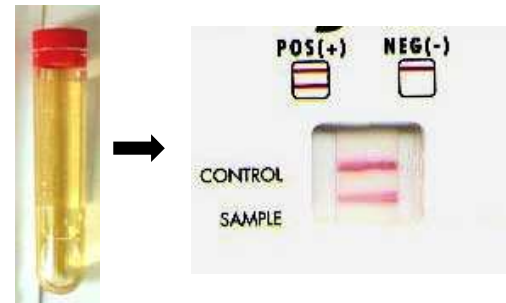
-Ensemencement d'une galerie biochimique adaptée : API



- Antibiotogramme



- Recherche d'antigène soluble



→ Délai: ~ 24 heures ou quelques heures avec automate

Limites des techniques traditionnelles d'identification des bactéries :

- Existence de bactéries non cultivables de façon traditionnelle au laboratoire (ex: *Mycobacterium leprae*) ; ou importants délais, parfois plusieurs jours (exemple: *M. tuberculosis*); ou difficilement cultivables
- Nécessité d'un personnel spécialisé
- Elles sont automatisables mais automates coûteux et nécessitant maintenance régulière.



- Evolution des techniques d'identification et critères de classification
 - Développement des techniques de biologie moléculaire par l'étude de la présence de certains gènes, l'étude de leur séquence etc
-
- ➔ Introduction de nouveaux critères d'identification
 - ➔ Extrême variété des génomes
 - ➔ différenciation de germes jusqu'alors confondus
 - ➔ définitions de gènes ou de séquences d'ADN spécifiques (facteurs de virulences particuliers, résistance à antibiotique etc.)

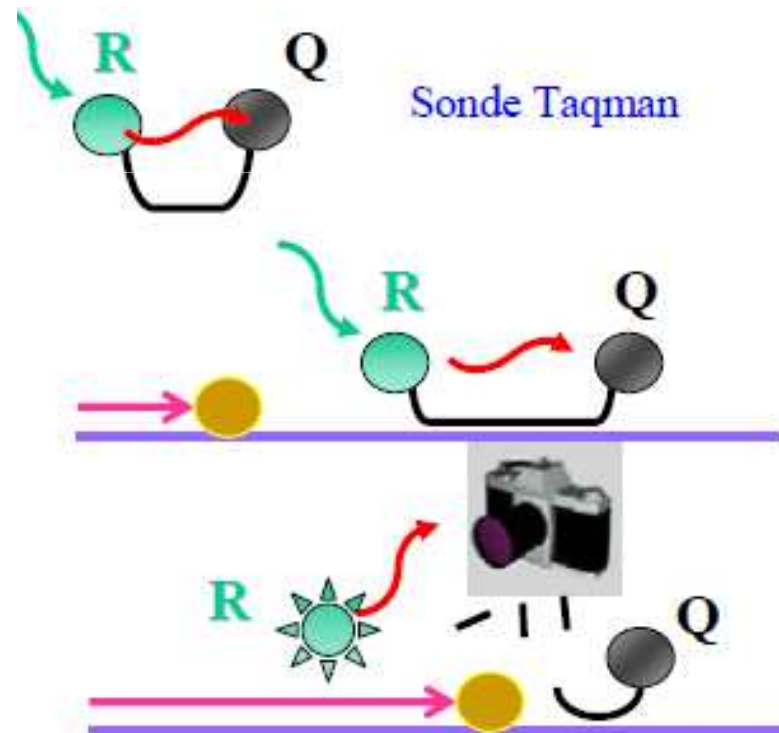
I – LES MÉTHODES MOLÉCULAIRES DANS LE DIAGNOSTIC DES INFECTIONS VIRALES

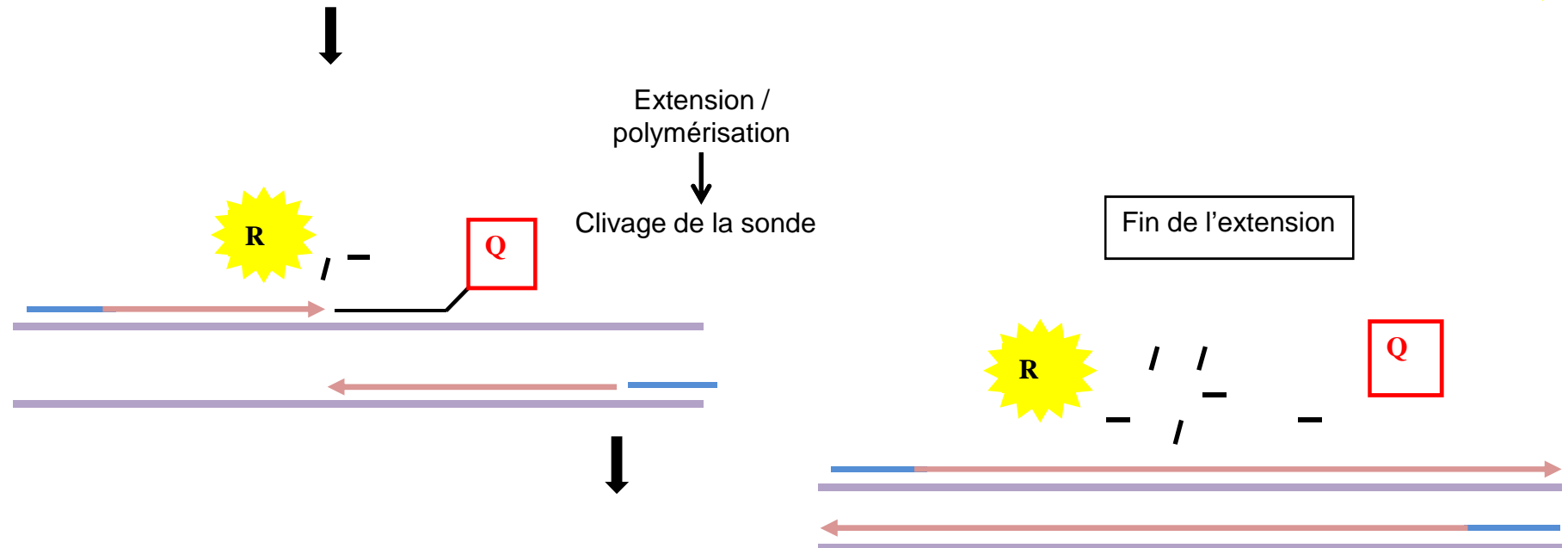
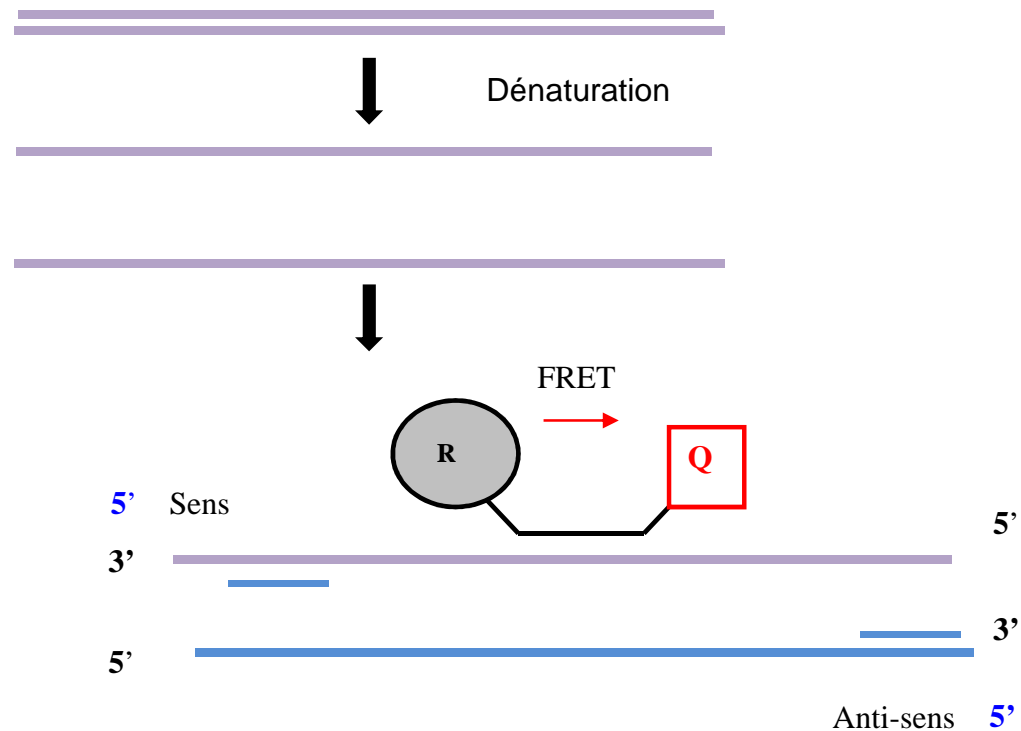
Le développement des méthodes moléculaires a permis:

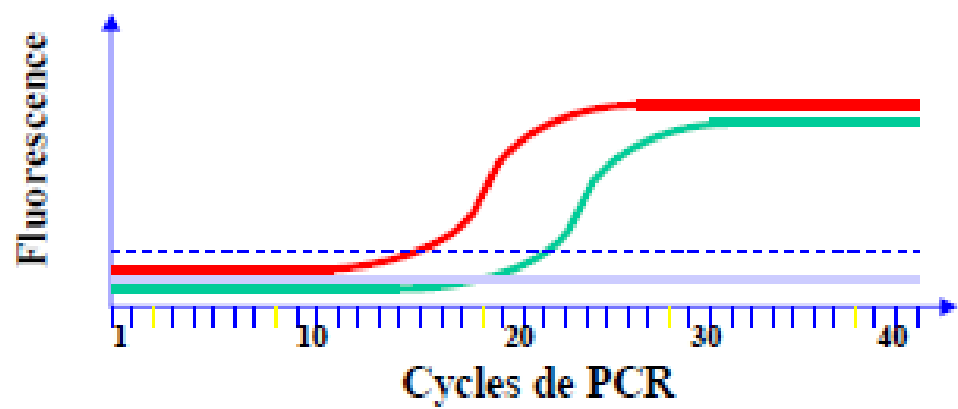
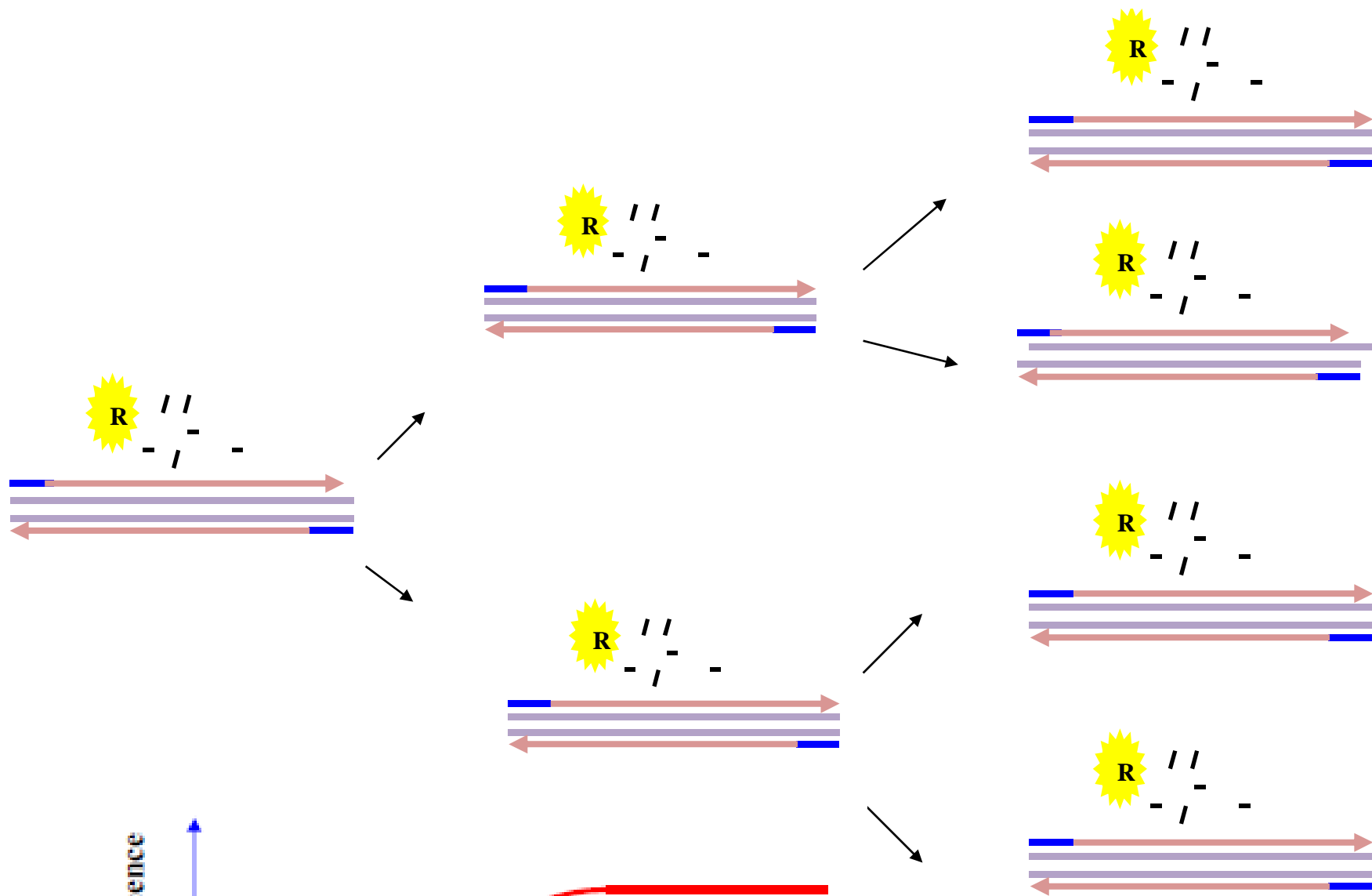
- La découverte de virus dont la culture était impossible (HPV, VHC);
- Relais de certaines méthodes classiques peu sensibles et peu spécifiques ;
- La détection des acides nucléiques viraux, le plus souvent marqueurs d'une infection virale active
- La quantification des "charges virales" pour déterminer le taux de virus circulant (VIH, VHB, VHC) ;
- Le séquençage du génome viral pour la recherche de mutations responsables de résistance aux antiviraux, typage viral.

La PCR et la RT-PCR sont aussi utilisées pour la quantification virale. La méthode de PCR en temps réel permet la détection qualitative et quantitative des virus, utile pour le diagnostic ou pour le suivi de traitements.

- Marqueur spécifique : Sondes fluorescentes (exemple: Taqman)



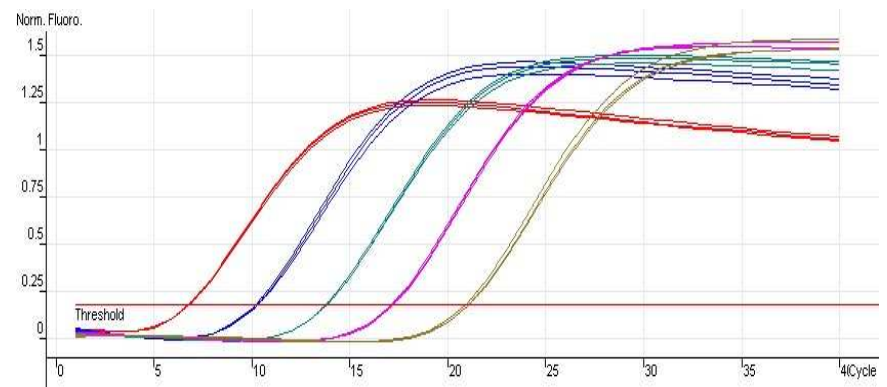
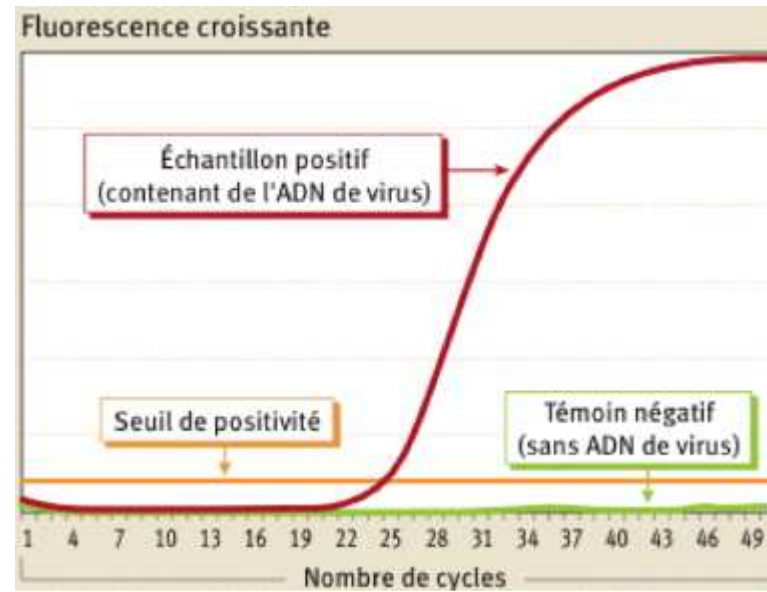






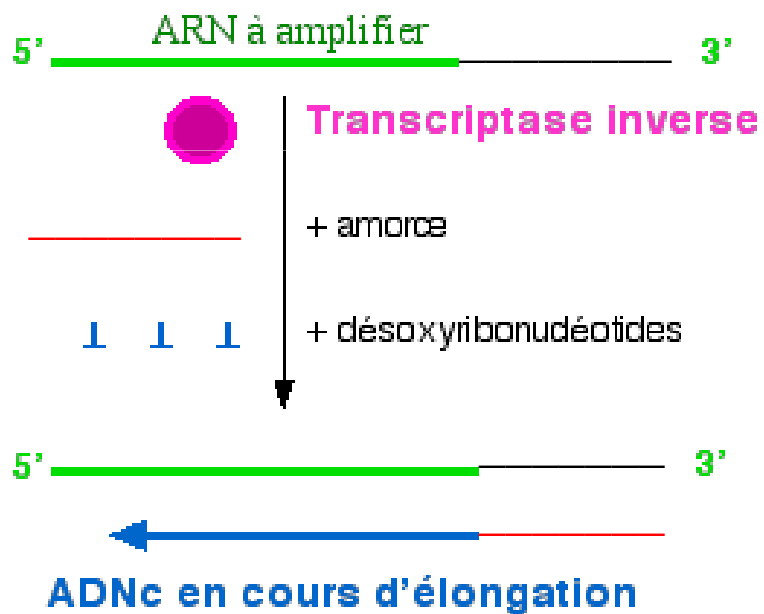
Ordinateur +
Logiciel

Thermocycleur +
fluoromètre

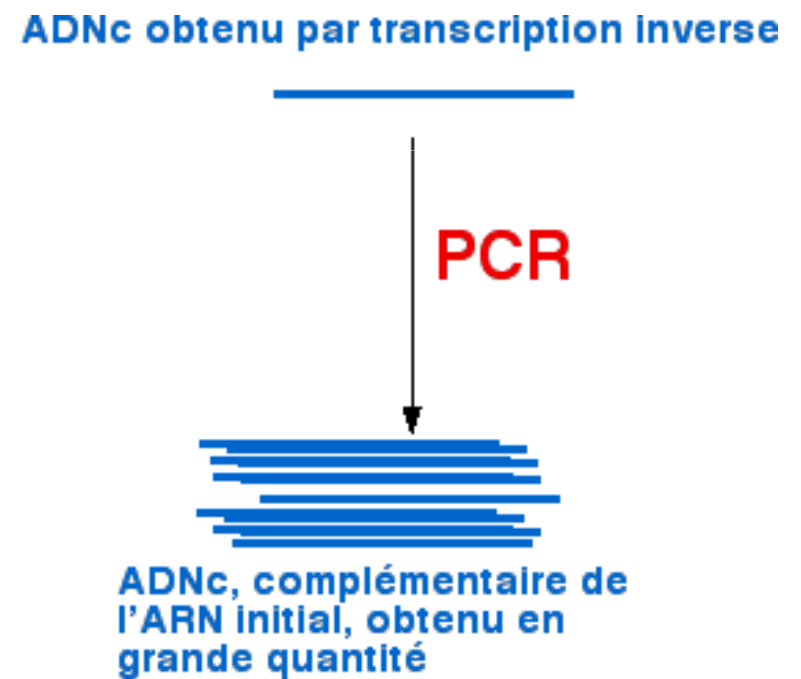


Exemple: quantification du virus VIH par RT-PCR (Reverse-Transcriptase PCR)

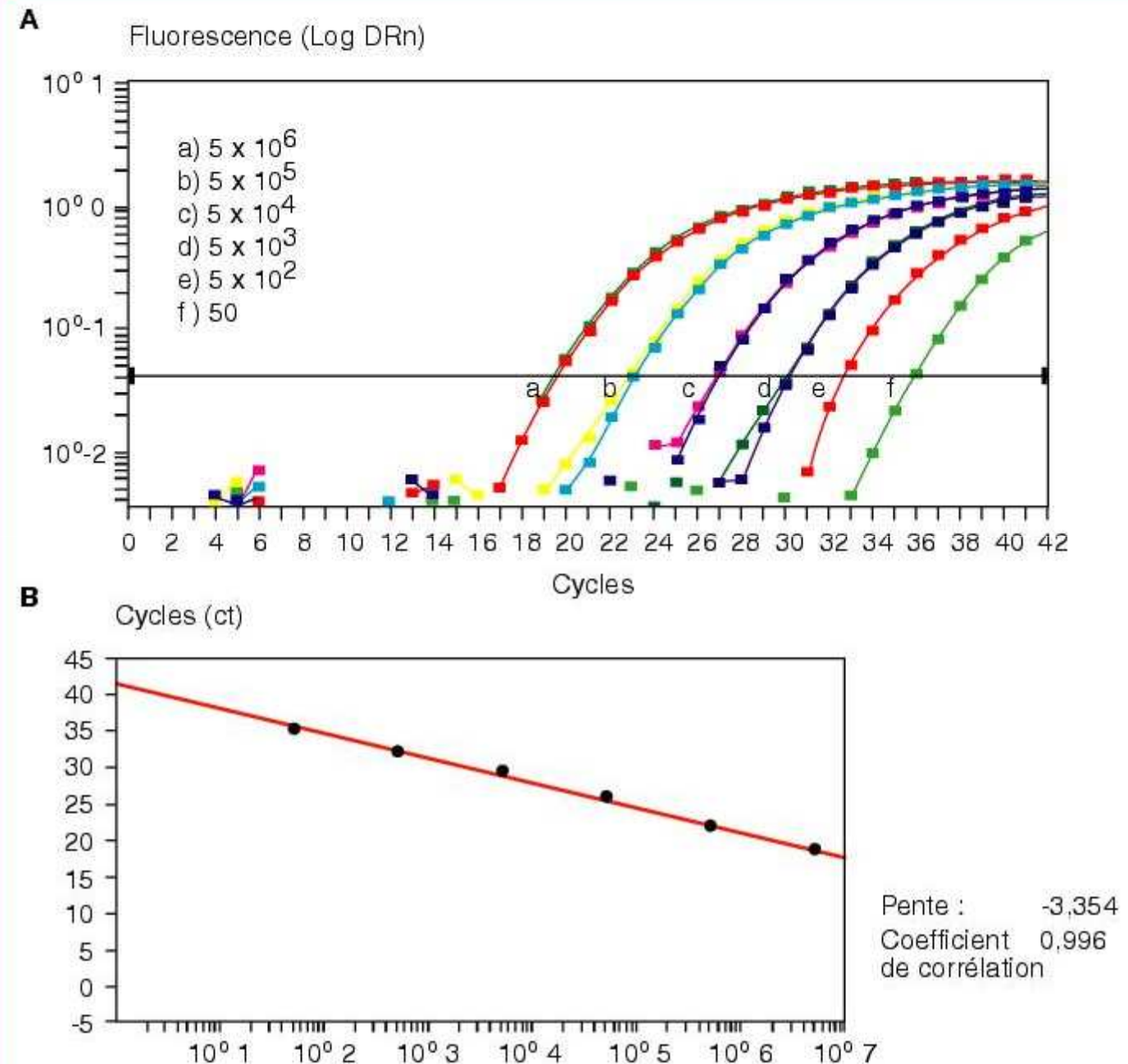
1) Transcription réverse de l'ARN



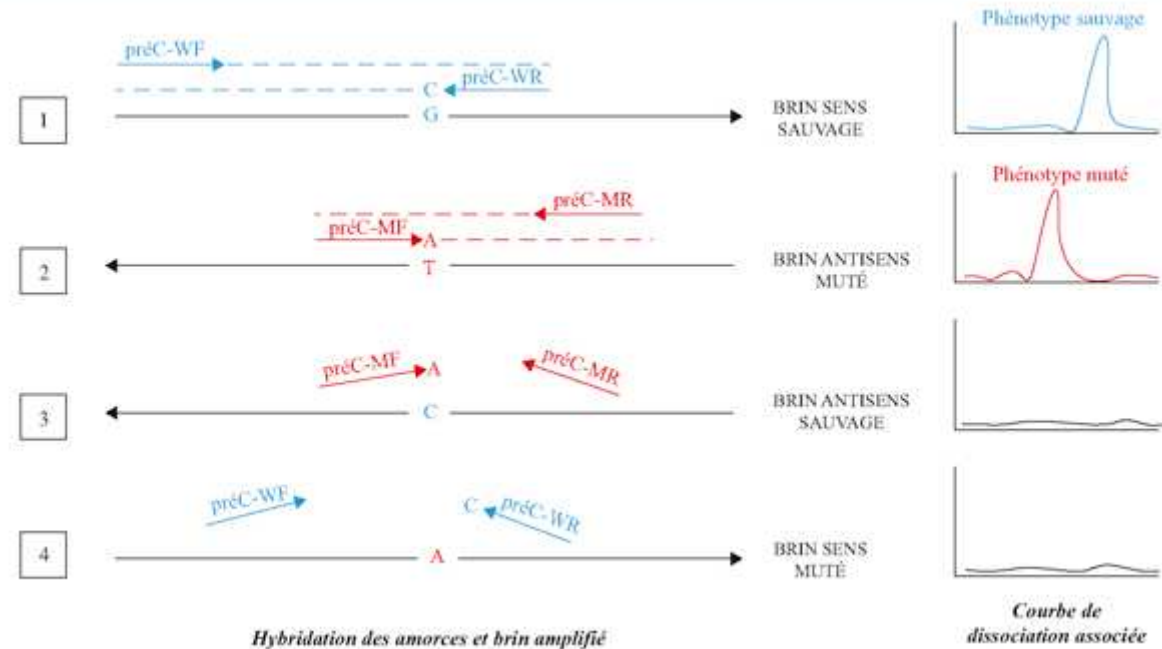
2) Amplification par PCR de l'ADNc



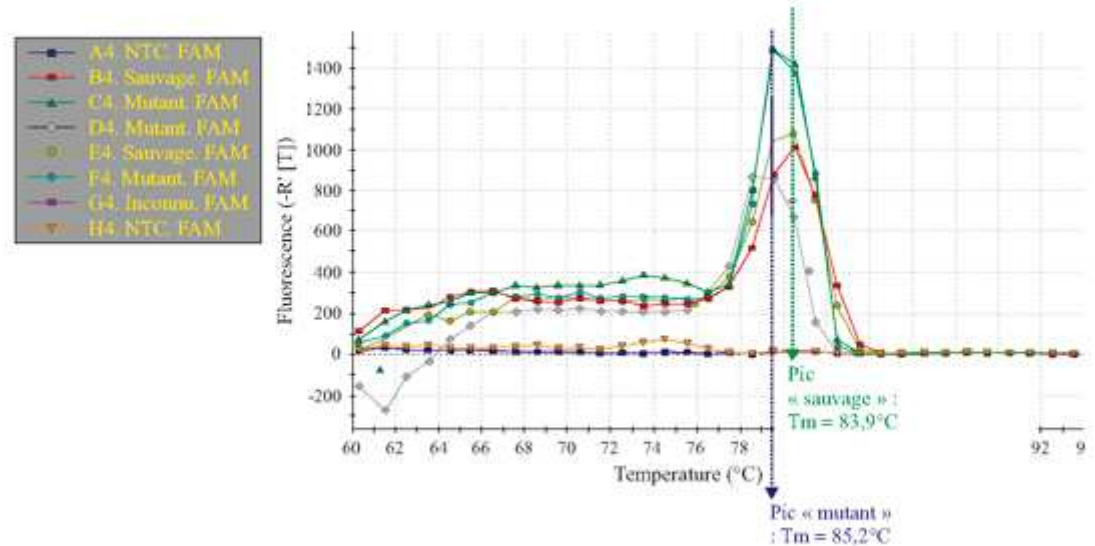
3) Quantification par PCR en temps réel



La PCR et la RT-PCR sont employées pour le génotypage et pour la détection des mutations.



Courbe de fusion permettant la détermination du phénotype précocore sauvage ou muté en position 1896 du VHB :



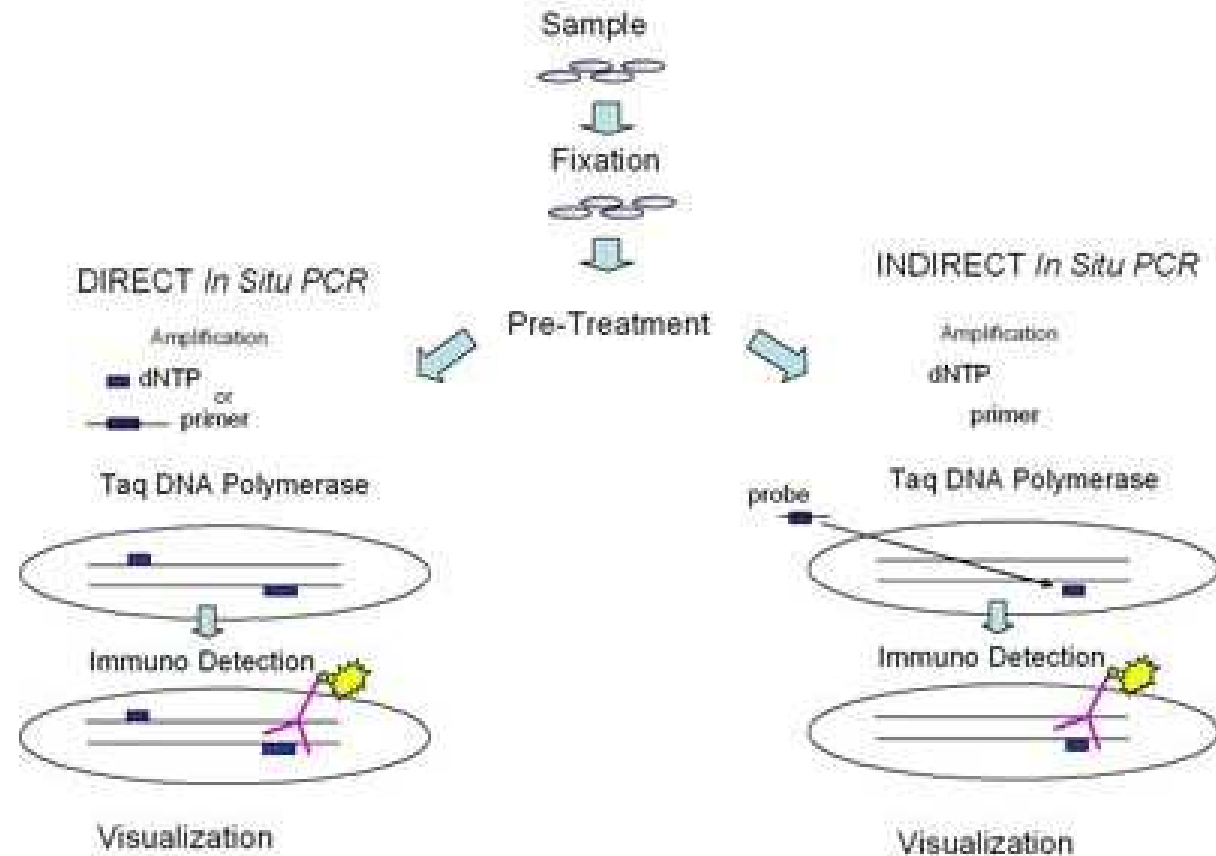
Diverses techniques sont utilisées . L'hybridation moléculaire est pratiquée par dot-blot, par Southern-blot ou par Northern-blot.

d'une structure tissulaire. Exemple : virus HPV.

Elle peut aussi être faite en milieu liquide : lyse des particules virales, dénaturation, hybridation avec sondes ARN, capture des hybrides ARN-ADN par AC anti-hybrides fixés sur des cupules de microplaques, révélation par 2^{ème} AC anti-hybride marqué à la PAL.

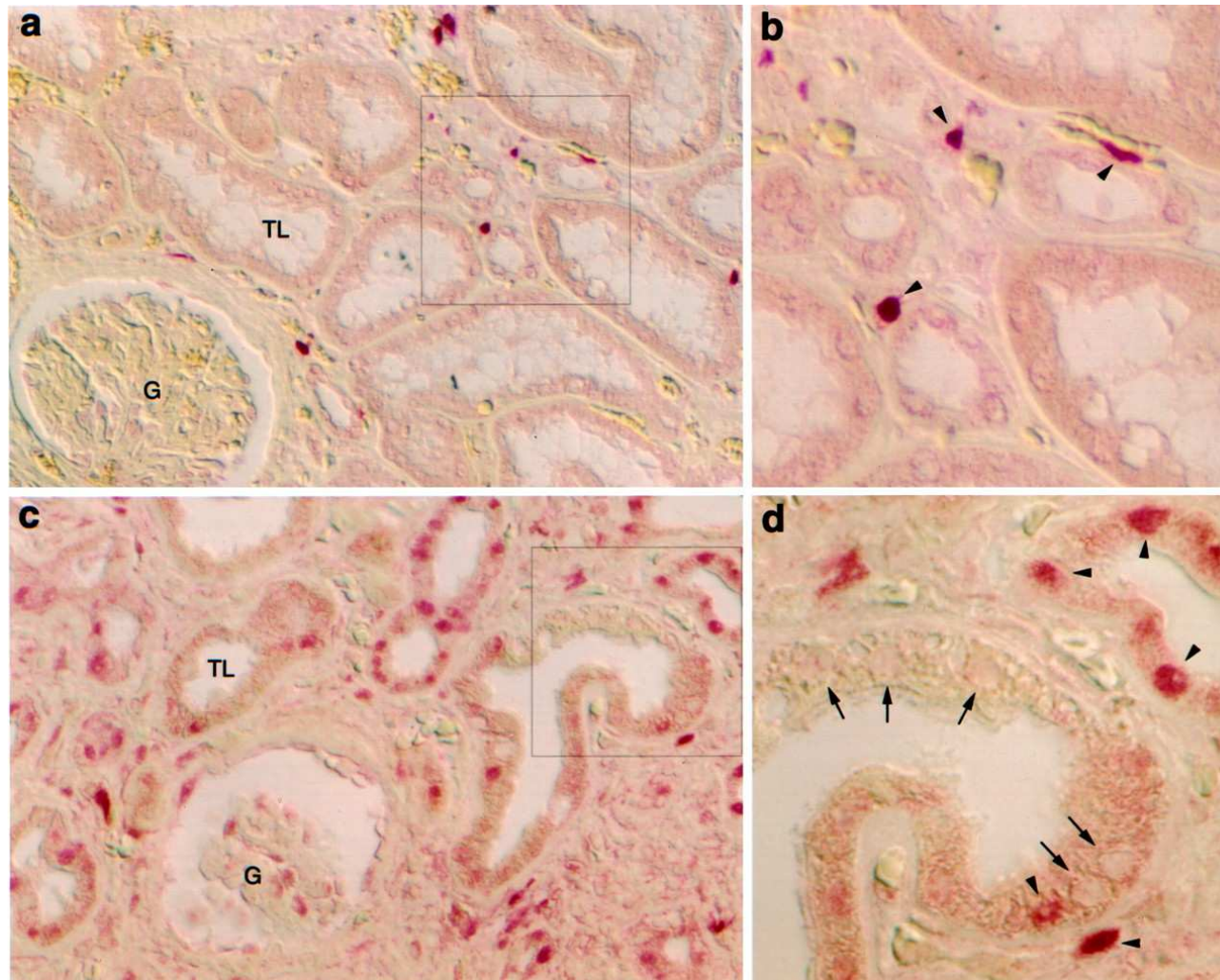
Exemple : recherche semi-quantitative d'HPV dans des frottis cervico-vaginaux, quantification de CMV dans le sang total, ou d'HBV dans le sérum, etc.

✓ PCR *in situ*



L'hybridation peut aussi être faite directement sur coupes de tissus ou sur cellules, sans extraction (hybridation *in situ*). Elle permet la localisation cellules infectées au sein d'une structure tissulaire. Exemple : virus HPV.

✓ PCR *in situ* de l'ADN proviral de HIV-1. (a) et (c) PCR *in situ* chez des patients séropositifs, l'ADN viral est en rouge. (b) et (d) Agrandissement x60

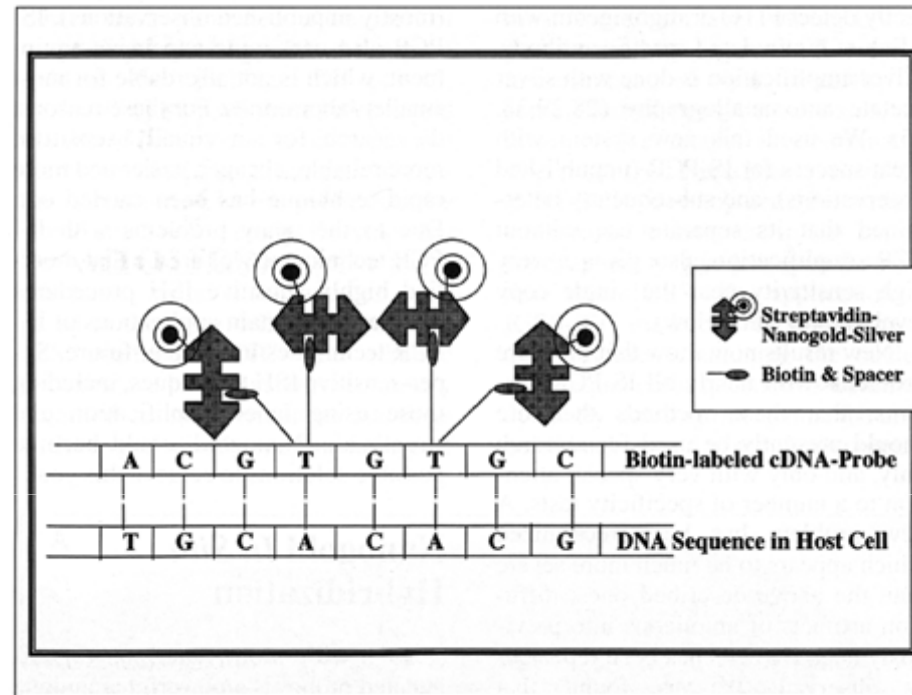


BRUGGEMAN L A et al. JASN 2000;11:2079-2087



✓ Hybridation *in situ*

Nanogold®-Streptavidin *In Situ* Hybridization



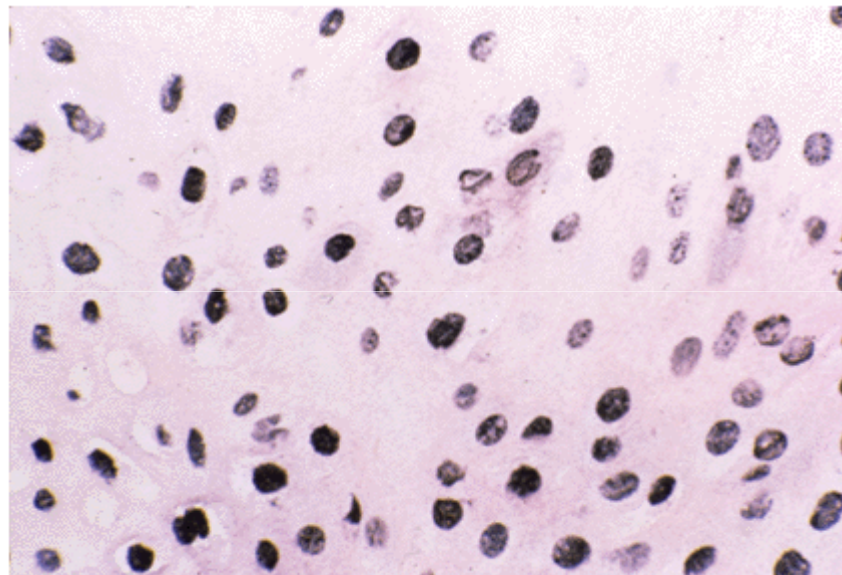
© Eaton Publishing Co.; used by permission.

Diagram 1: Schematic representation of the Nanogold-Silver *In Situ* Hybridization technique. The DNA sequence in the host cell is detected by hybridization with a biotin-labeled cDNA probe. Biotin bound covalently with spacer arms is then detected using streptavidin-Nanogold and subsequently silver-enhanced using silver acetate or silver lactate autometallography. For simplicity, only four such biotin and streptavidin-Nanogold molecules are shown.

Hacker, G. W., Hauser-Kronberger, C., Zehbe, I., Su, H., Schiechl, A., Dietze, O., and Tubbs, R.; *Cell Vision*, **4**, 54-65 (1997).

✓ Hybridation *in situ*

Detection of the Human Papillomavirus (HPV) type 6/11 genome using this method is shown below; as can be seen, the [Nanogold®-silver](#) staining gives a dense black signal which in many cases is clearer than that obtained using conventional enzyme substrates.



HPV 6/11 in condyloma acuminatum detected by Nanogold-silver ISH. In this case, strong labeling was obtained. Most infected nuclei showed dense black or granulated black staining. A few nuclei also showed single black spots of labeling, indicating the presence of very low copy numbers of this DNA virus. Staining was as described in the [protocol](#); formalin-fixed, 7-micrometer-thick paraffin section, counterstained with hematoxylin and eosin. Magnification, X 285.

II – LES MÉTHODES MOLÉCULAIRES DANS LE DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE

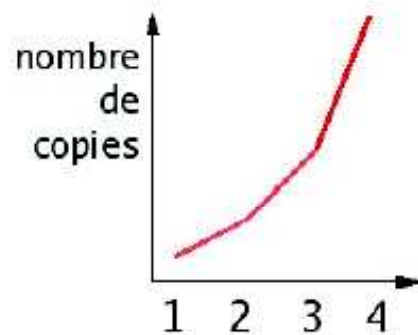
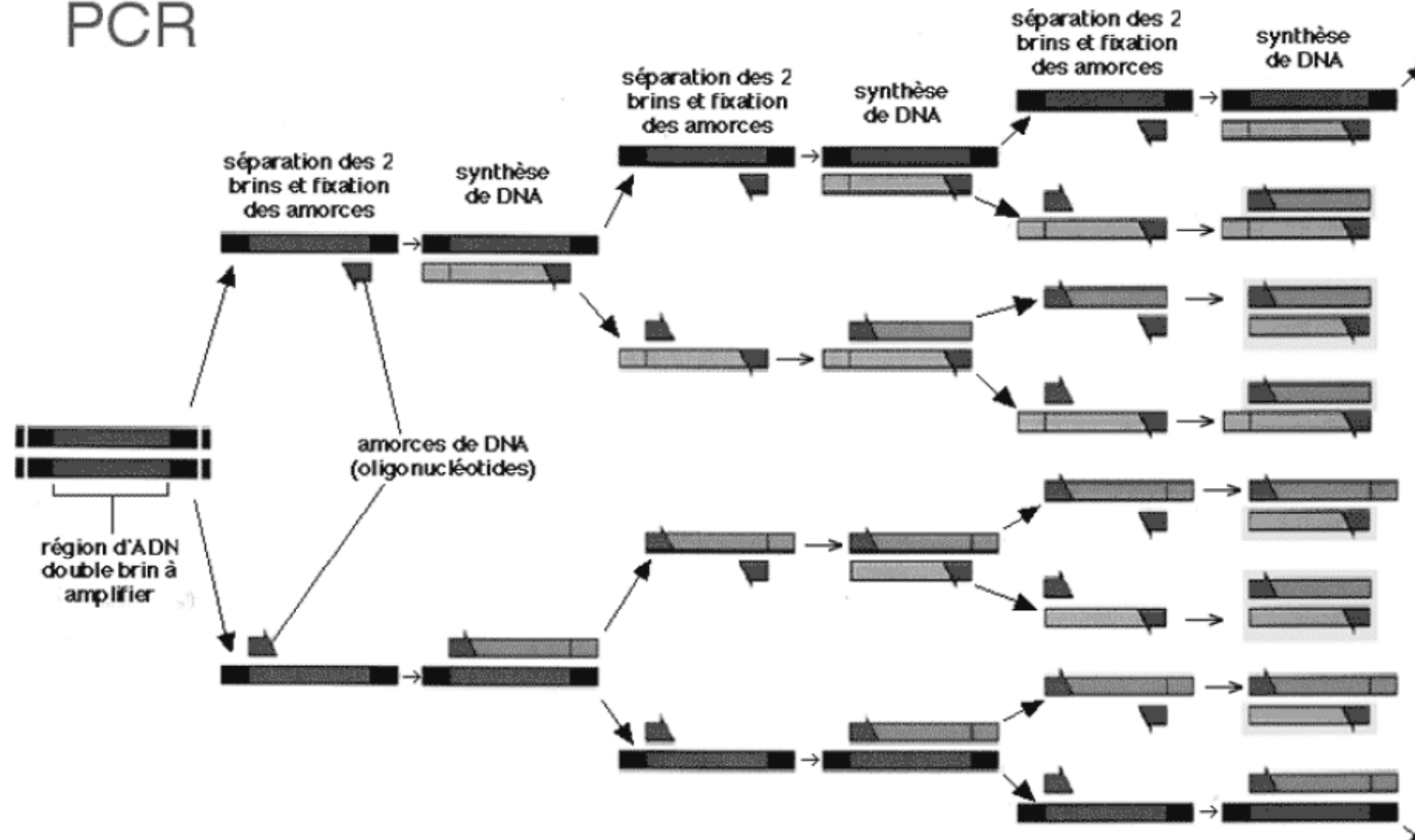
Principe: recherche d'un **gène spécifique** de la bactérie, par

- **Hybridation** avec une sonde nucléique
- Amplification du gène entier ou partie de ce gène avec des amorces spécifiques par **PCR**, puis révélation du produit amplifié (amplicon):
 - électrophorèse
 - et/ou hybridation avec une sonde nucléique
 - ou séquençage

La technique de PCR est *a priori* :

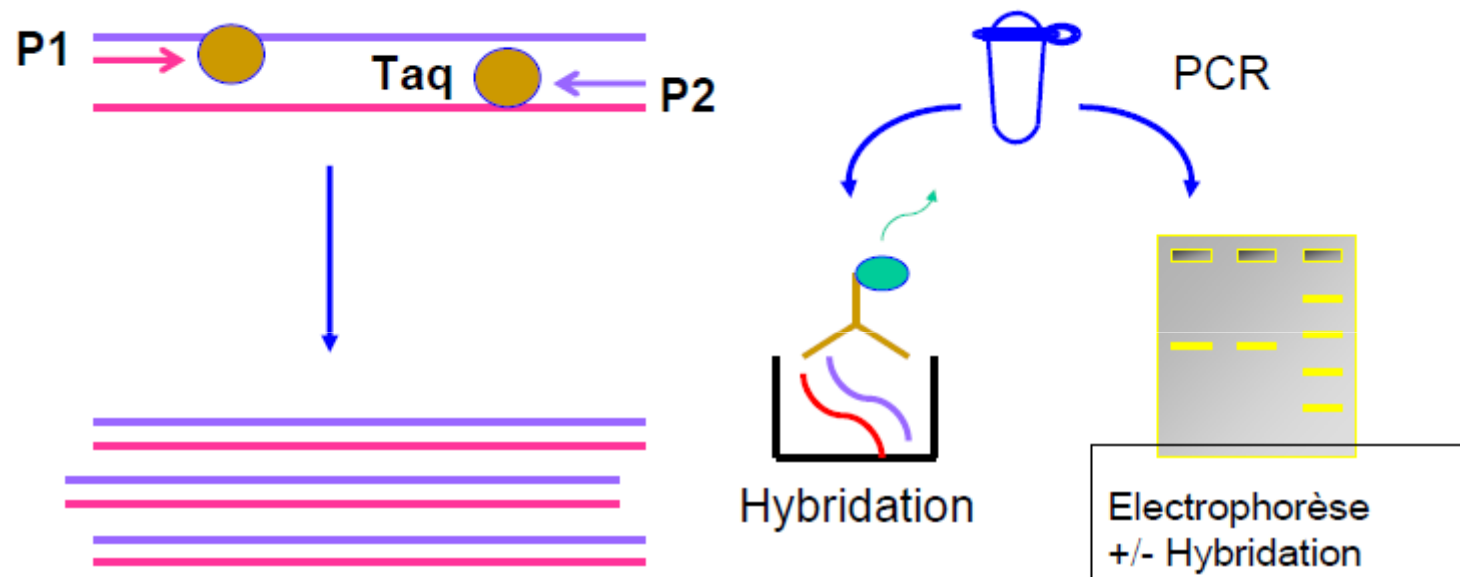
- très sensible; peut dans certains cas s'appliquer directement à l'échantillon à analyser, supprimant ainsi les délais de mise en culture et les problèmes liés aux germes non cultivables ou de culture difficile;
- très spécifique; elle reste (et cela peut, par contre, être considéré comme inconvénient), une démarche orientée ; Mais elle permet l'identification des germes inhabituels à partir des cultures.
- simple, automatisable et rapide d'exécution; par ailleurs d'un coût modéré justifiant une utilisation de plus en plus routinière dans les laboratoires de biologie.

PCR



Le nombre de copies augmentent de façon géométrique. À partir du 2ème cycle des ADN simple brins sont produits qui sont encadrés par les deux amorces.

$n \text{ cycles} > 2^n \rightarrow 30 \text{ cycles} > 2^{30} = \sim 10^9 \text{ copies}$



✓ **Gel d'agarose après PCR et electrophorèse.** Le gel est photographié sous lumière UV. Les signaux positifs apparaissent sous l'aspect de bandes claires nettes
Le résultat n'est interprétable que s'il existe des témoins positifs (la réaction a fonctionné) et un témoin négatif (il n'existe pas de contamination).

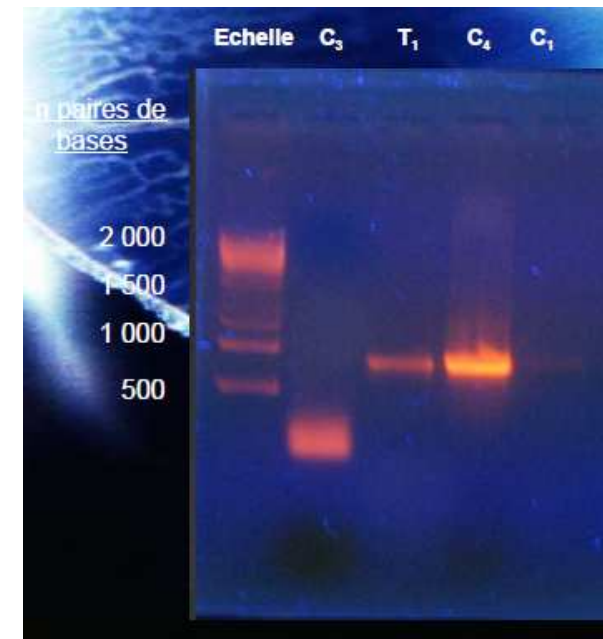
**Thermocycleur
(appareil pour PCR)**



**Visualisation du gel sur
transluminateur UV**

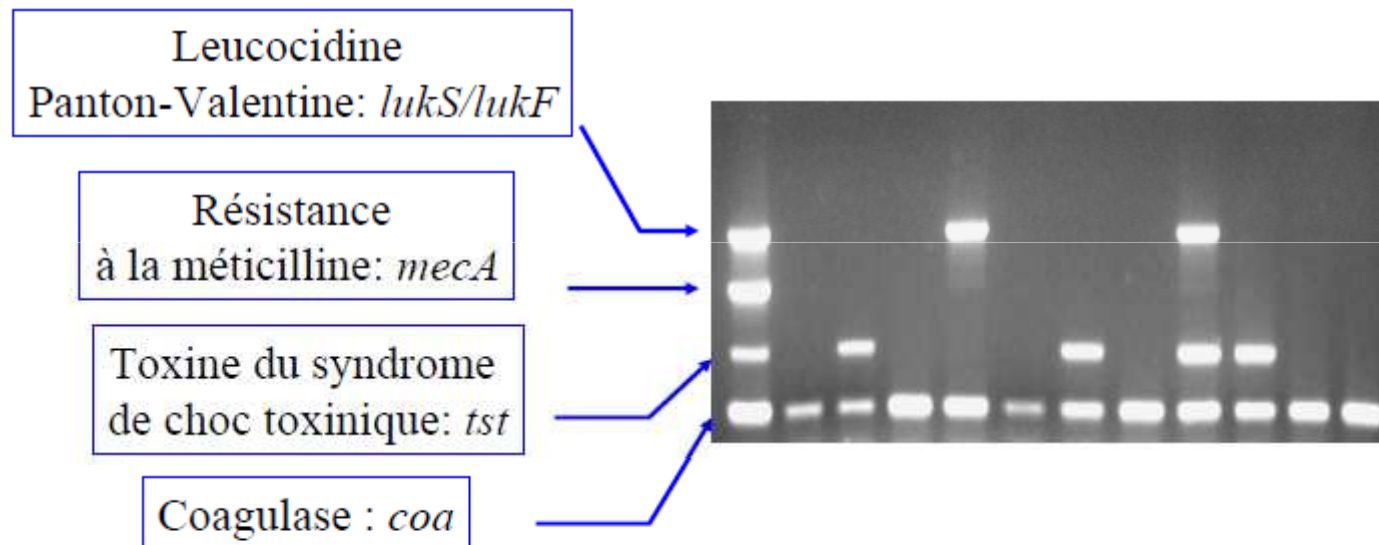


**Gel d'électrophorèse
avec bandes d'ADN
colorées au bromure
d'éthidium (Bet)**



EXEMPLES

Staphylococcus aureus: détection de la résistance et de la virulence par PCR

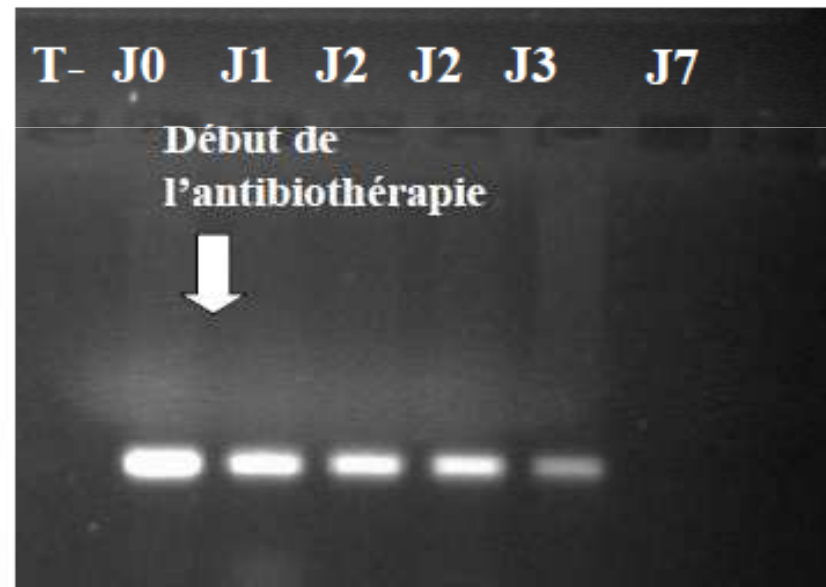


Utilisation du gène ARNr 16S pour le diagnostic microbiologique

- Présents dans toutes les bactéries
 - Régions très conservées
 - Régions variables
- Séquences → dans zones identiques chez toutes les bactéries
 - différents des gènes codant pour ARNr de l'homme
 - n pourra « isoler » ADN bactérien/ADN humain avec amorces permettant amplifier que gènes codant pour ARNr 16S bactérien
- Séquences → Zones spécifiques de genre ou d'espèce bactérienne
 - identification de la bactérie

Utilisation du gène ARNr 16S pour le diagnostic microbiologique

Cinétique de la PCR du 16S dans le sang chez un patient présentant un sepsis à méningocoque



- La PCR est couramment utilisée pour le diagnostic à partir du produit pathologique de germes de culture difficile, voire impossible, comme:

- **Pathogènes respiratoires**

- *Mycobacterium tuberculosis*, mycobactéries atypiques
- *Legionella*
- *Bordetella pertussis*
- *Mycoplasma pneumoniae*
- *Chlamydia pneumoniae*

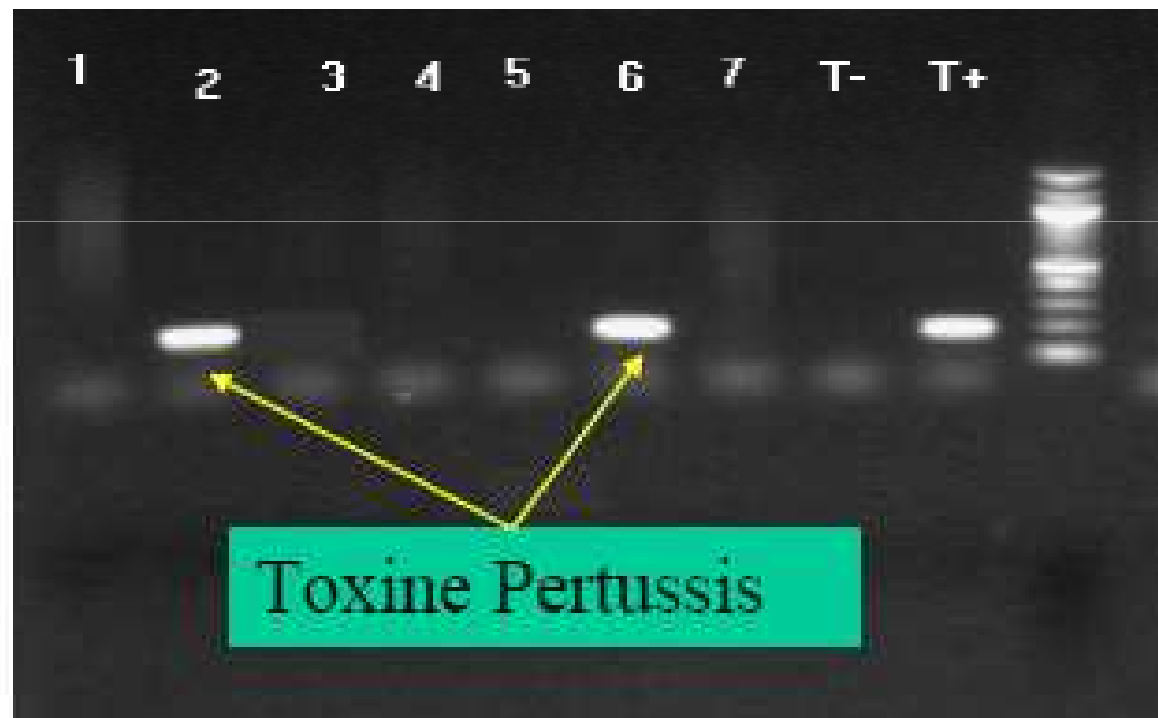
- **Pathogènes de l'appareil génital**

- *Treponema pallidum*
- *Chlamydia trachomatis*
- *Haemophilus ducreyi*
- *Mycoplasma genitalium*

- **Bactéries pathogènes de l'appareil digestif**

- La PCR est utilisée pour mettre identifier une bactérie pathogène par la présence de gènes de virulence

Exemple: *Bordetella pertussis* (coqueluche)

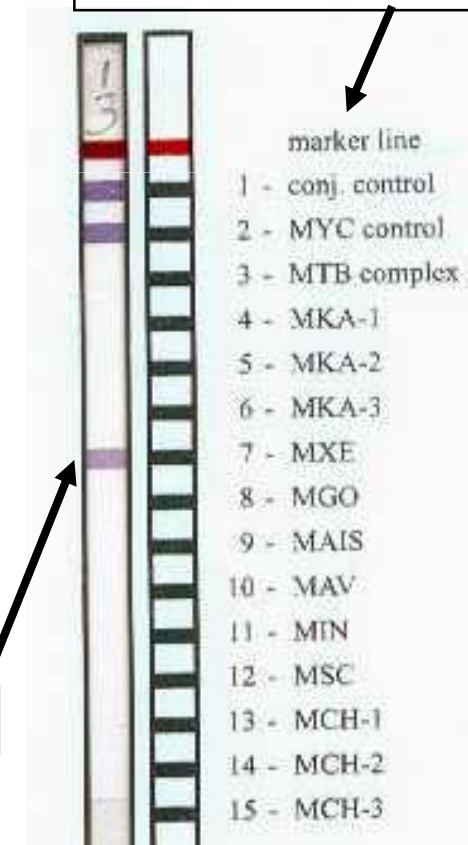


- La PCR peut être utilisée pour l'identification d'une espèce de mycobactérie avec le réactif Inno-Lipa®: le produit ou ADN amplifié par PCR peut être hybridé avec une sonde spécifique déposée sur un filtre de nitrocellulose, puis révélé.



PCR positive pour *M. xenopi*

Les sondes de capture correspondant à chaque espèce sont déposées sur le filtre

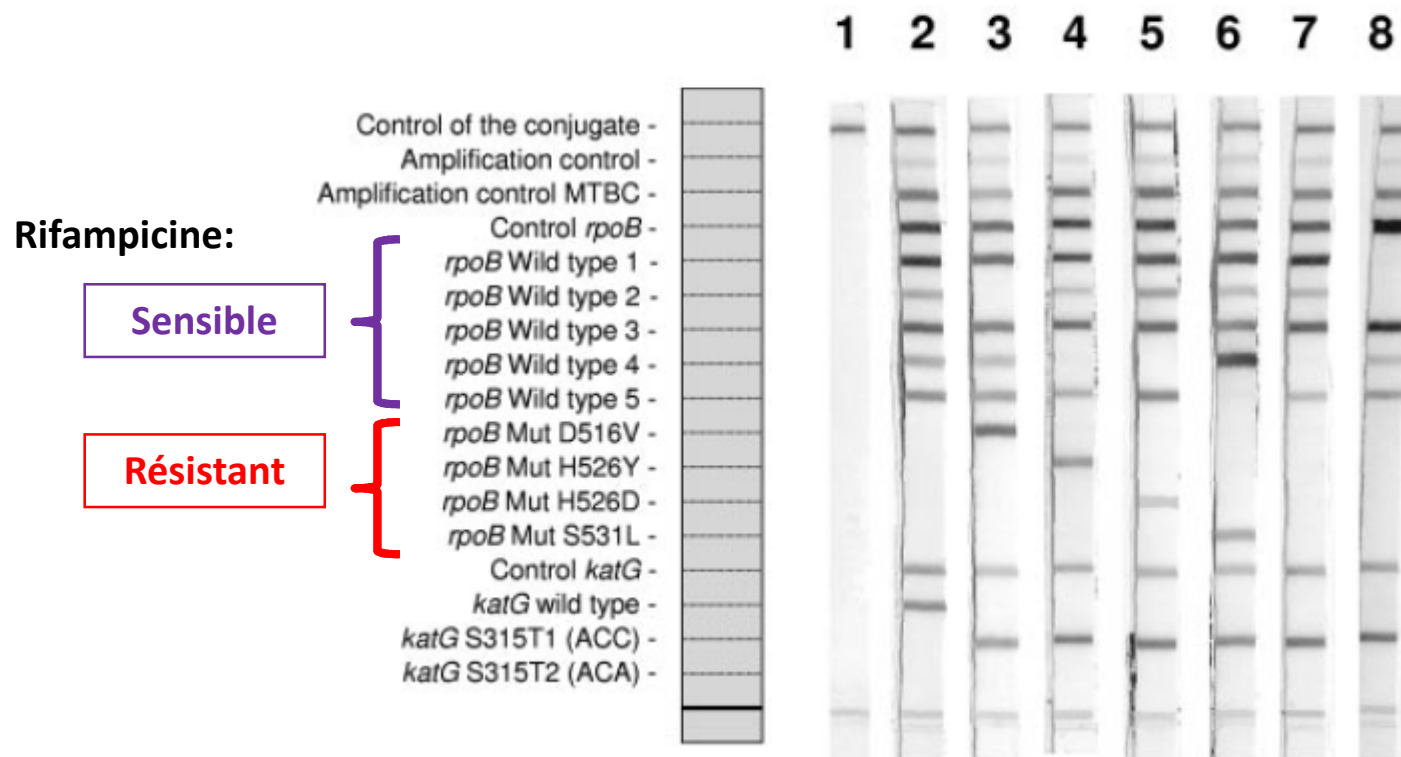


III – DETECTION DES RESISTANCES AUX ANTIBIOTIQUES

- La PCR peut être utile pour la détection de mutations responsables de résistance aux antibiotiques.

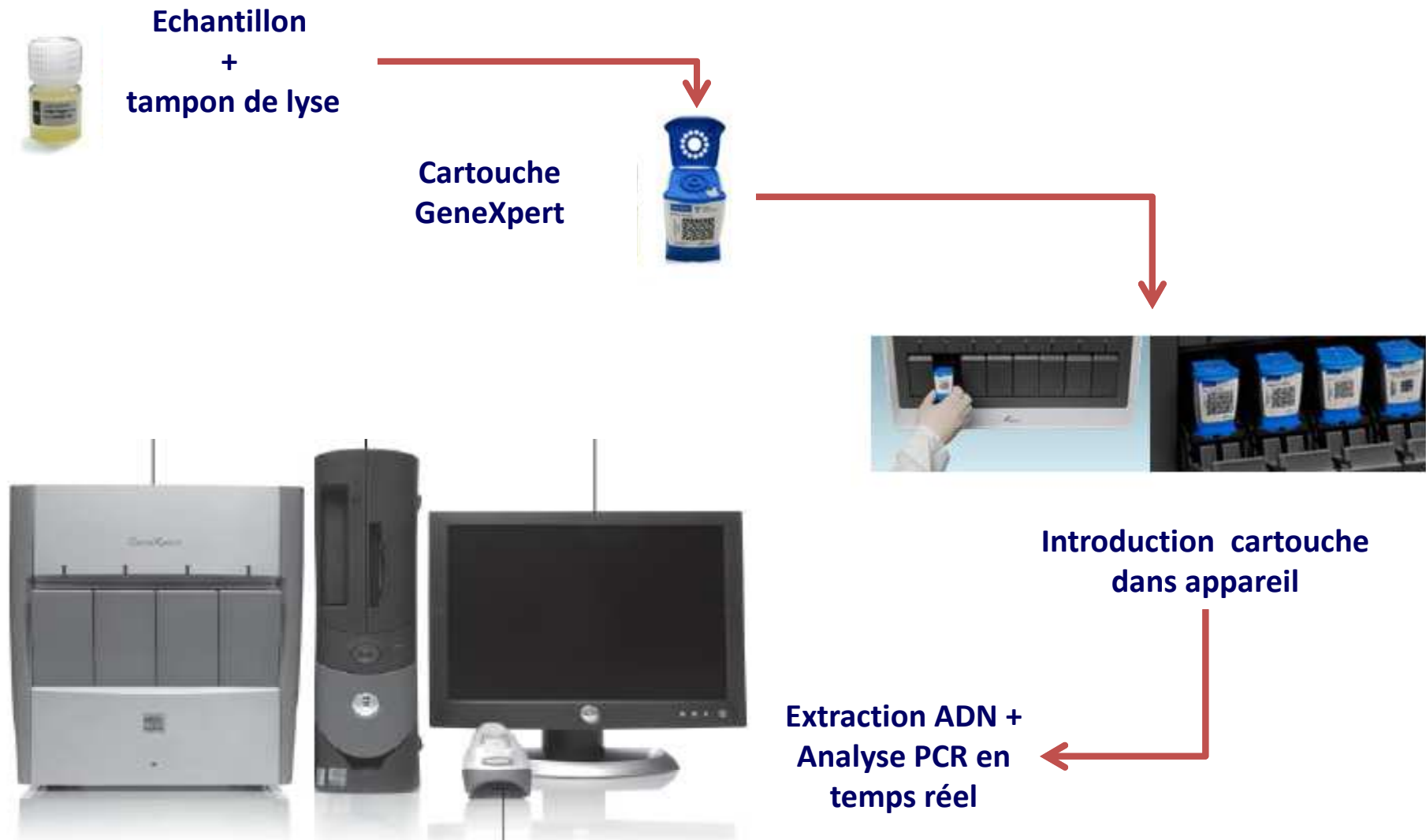
Exemple: Détection de la résistance de *M. tuberculosis* aux antituberculeux

La résistance à la rifampicine est due à la présence d'une mutation sur le gène *rpoB*. Des sondes de capture correspondant à la séquence sauvage (wt) et à la séquence mutée (Mut) sont déposées sur un filtre de nylon. Le gène *rpoB* est amplifié par PCR puis hybridé avec le filtre de nylon.



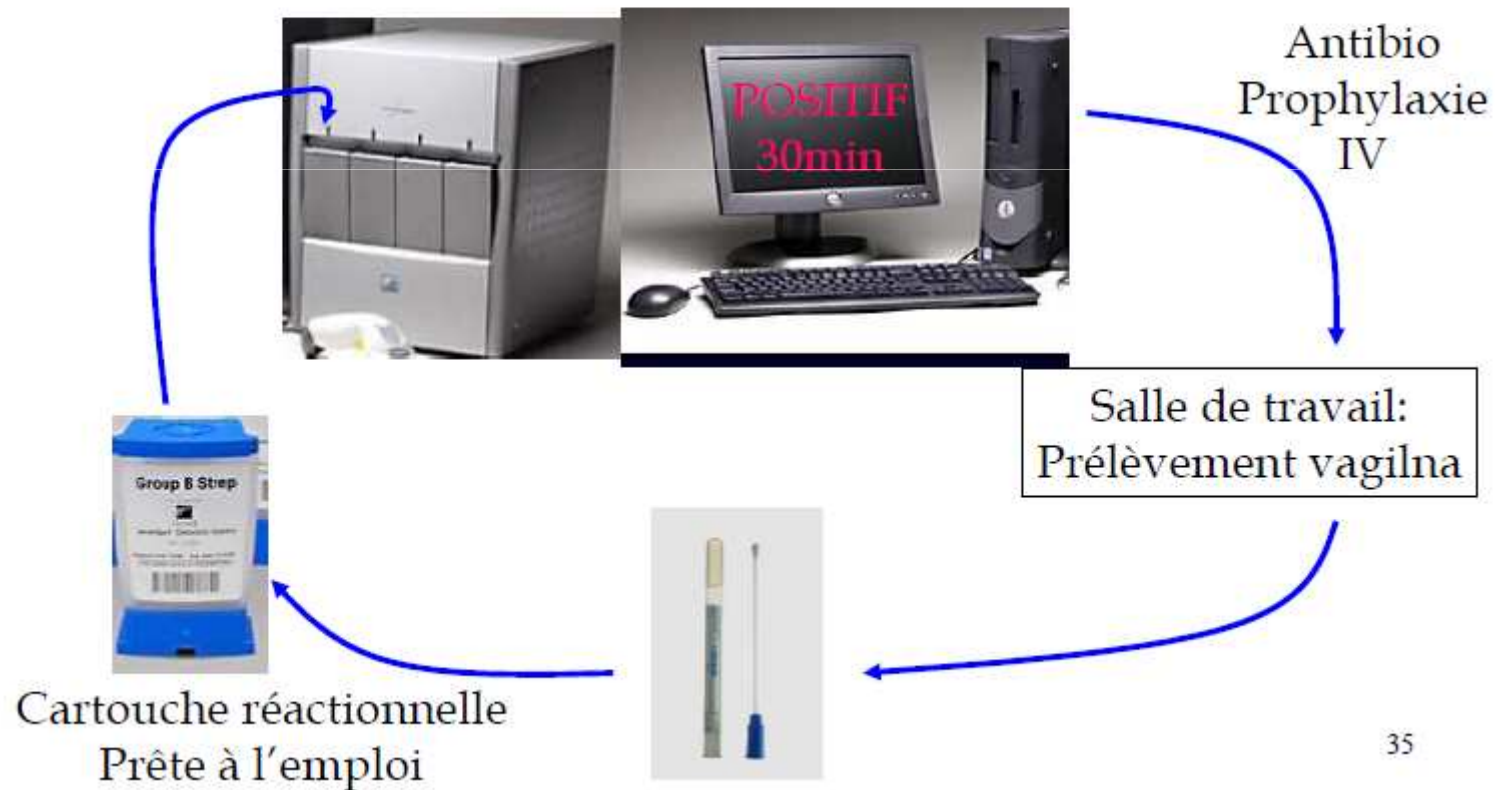
Systemes automatisés

Exemple: Diagnostic de la tuberculose et de résistance à la rifampicine avec Test GeneXpert

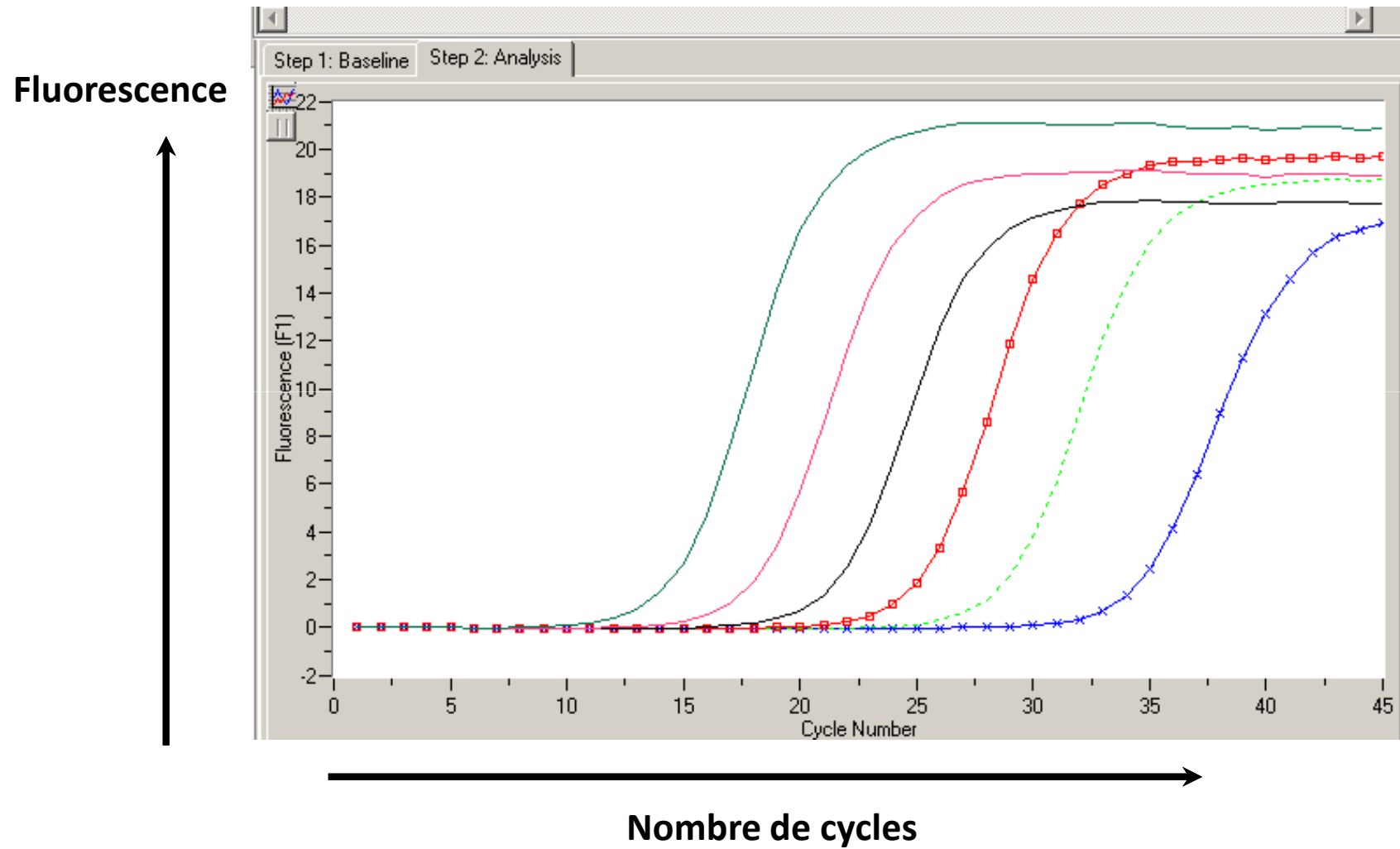


Autre exemple: Prévention de l'infection materno-fœtale à Streptocoque B

Prévention de l'IMF à Streptocoque B
PCR entièrement automatisée en 30 min



Exemple: Diagnostic de la tuberculose avec Test GeneXpert



III – GENOTYPAGE ET EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE