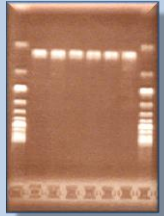


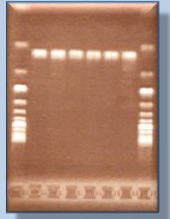
Microbiologie médicale

La PCR revisitée & Nouvelles approches de la vaccination

ORGANISATION



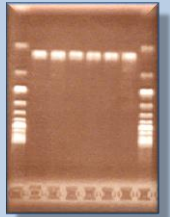
9 h – 9 h 30	Accueil et présentation du programme de la journée (IA-IPR)
9 h 30 à 12 h 30	<p>La PCR revisitée : comment la rendre compatible avec un diagnostic médical d'urgence ?</p> <p><i>Intervenant : M. Frédéric GOMEL</i> <i>IA-IPR - Rectorat</i></p>
12 h 30 à 13 h 30	Repas
13 h 30 à 16 h 30	<p>Nouvelles approches vaccinales</p> <p><i>Intervenant : M. Frédéric MARTINON,</i> <i>CEA – division d'immunologie et virologie (Fontenay au Roses)</i></p>



La PCR revisitée: comment la rendre compatible avec un diagnostic médical d'urgence ?

Un croisement entre concepts et technologies

Contexte



Diagnostic médical

- Examens ophtalmiques
- Auscultation générale
- Analyses médicales
- L'imagerie médicale



Données factuelles

- Dialogue, échanges
- Signes cliniques
- Signes paracliniques



Décision thérapeutique

Techniques et
technologies

Garantie de
résultats

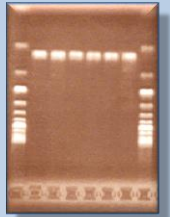
Certitudes

« evidence-based medicine" ou
médecine fondée sur les preuves

Jeu sérieux :

www.ludomedic.com/index.php?option=com_ludomedic&view=trip&id=10&Itemid=185

Contexte



Diagnostic médical

- Examens ophtalmiques
- Auscultation générale
- Analyses médicales
- L'imagerie médicale



Données factuelles

- Dialogue, échanges
- Signes cliniques
- Signes paracliniques



Décision thérapeutique

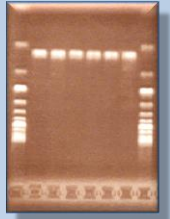
URGENCE

Facteur temps pour avoir accès aux données



Une technique de
biologie moléculaire

Spécificité et rapidité



PCR

bactéries

Staphylococcus aureus (MDR)

Streptococcus sanguinis, oralis, mutans, (dents ... endocardite)

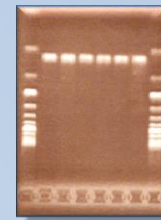
Streptococcus bovis (endocardite infectieuse)

Helicobacter pylori (formes d'ulcères à l'estomac)

Virus Ebola (fièvre hémorragique)

Entamoeba histolytica (amibe pathogène si associée à *B. subtilis* ...
dysenterie amibienne) examens cliniques des selles
(*E. dispar* non pathogène)

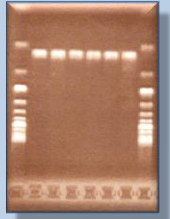
Contexte



Réalisation d'une
PCR
En moins de 4 MIN !

Innovative qPCR using interfacial effects to enable low threshold cycle
detection and inhibition relief
Dustin K. Harshman, Brianna M. Rao, Jean E. McLain, George S. Watts and
Jeong-Yeol Yoon
Science Advances 04 Sep 2015: Vol. 1, no. 8

Travail en groupes

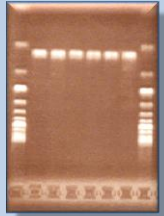


Mme GUILLAIS
Mme LESELLIER
M LEGOUEST
Mme RAUX

Mme HUMBERT
Mme MENUT
M. LEVALLOIS
Mme RAVE

Mme LEFEVRE-
MESSAOUDI
Mme.
WURSTEISEN
M MAZURIER
M THIBAUT
Mme REMUS

La PCR ?



C1. Proposer une définition ?

polymerase chain reaction

Amplification en chaîne polymérisique (A

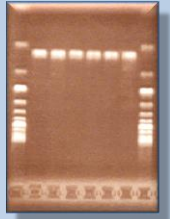
version courte :

Technique
d'amplification
spécifique
in-vitro d'un fragment
d'ADN

version longue :

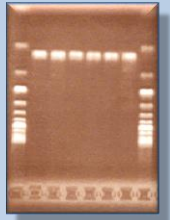
Technique d'amplification
spécifique *in-vitro* d'un fragment
d'ADN ...
basée sur la répétition de deux
réactions d'extension d'une
amorce, catalysées par une
ADN polymérase ADN
dépendante généralement
thermostable

La PCR ?



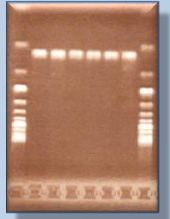
- Technique
- d'amplification
- spécifique
- *in-vitro*
- d'un fragment
- d'ADN

La PCR ?

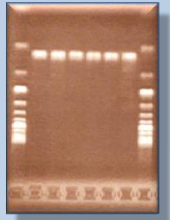


- **Technique**
- **d'amplification**
- **spécifique**
- *in-vitro*
- **d'un fragment**
- **d'ADN**

La PCR ?



- Technique
- **d'amplification**
- spécifique
- *in-vitro*
- d'un fragment
- d'ADN



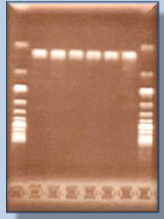
**Quantité
à l'arrivé
?**



**Quantité
de départ
?**

Quantité minimale : 100 molécules (copies) vraies !

ce que contient une goutte aérosol ... 50 pL



C2. Déterminer la quantité massique correspondante pour 100 molécules d'ADN humain ?

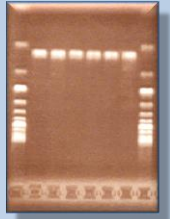
Données :

- *MM moyenne 1 pb = 660 g/mol*
- *Taille d'une molécule d'ADN humain (en pb) : ??*
- *X = copies # molécules*

$$m = \frac{(X)}{N} \times (MM_{1\text{ pb}} \times (N))$$

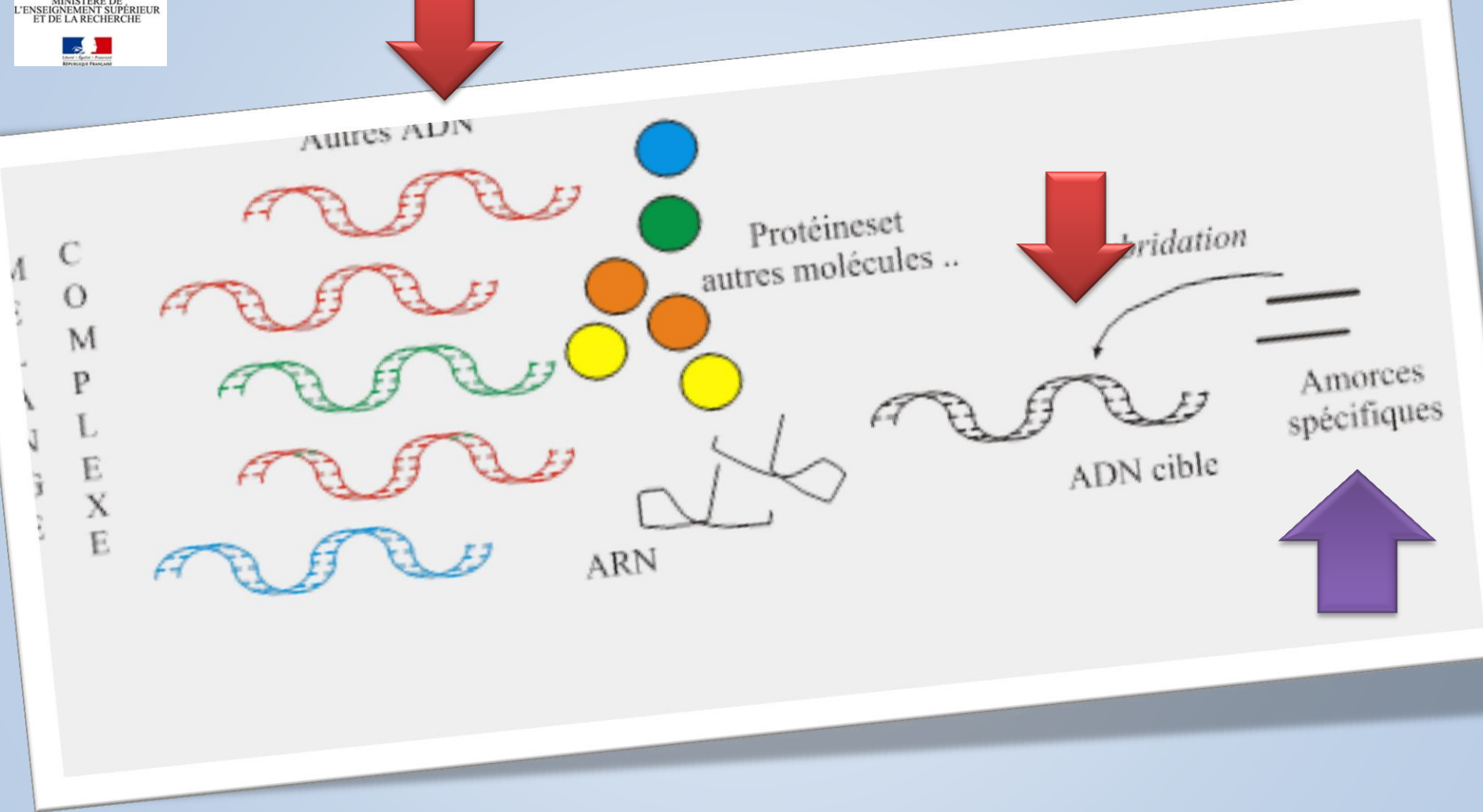
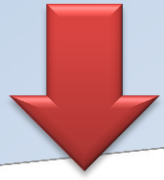
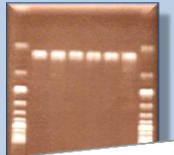
0,4 ng

La PCR ?

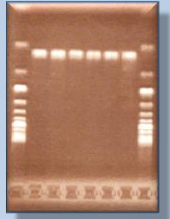


- Technique
- d'amplification
- **spécifique**
- *in-vitro*
- d'un fragment
- d'ADN

C3. Justifier pourquoi la spécificité de la PCR se situe à deux niveaux ?

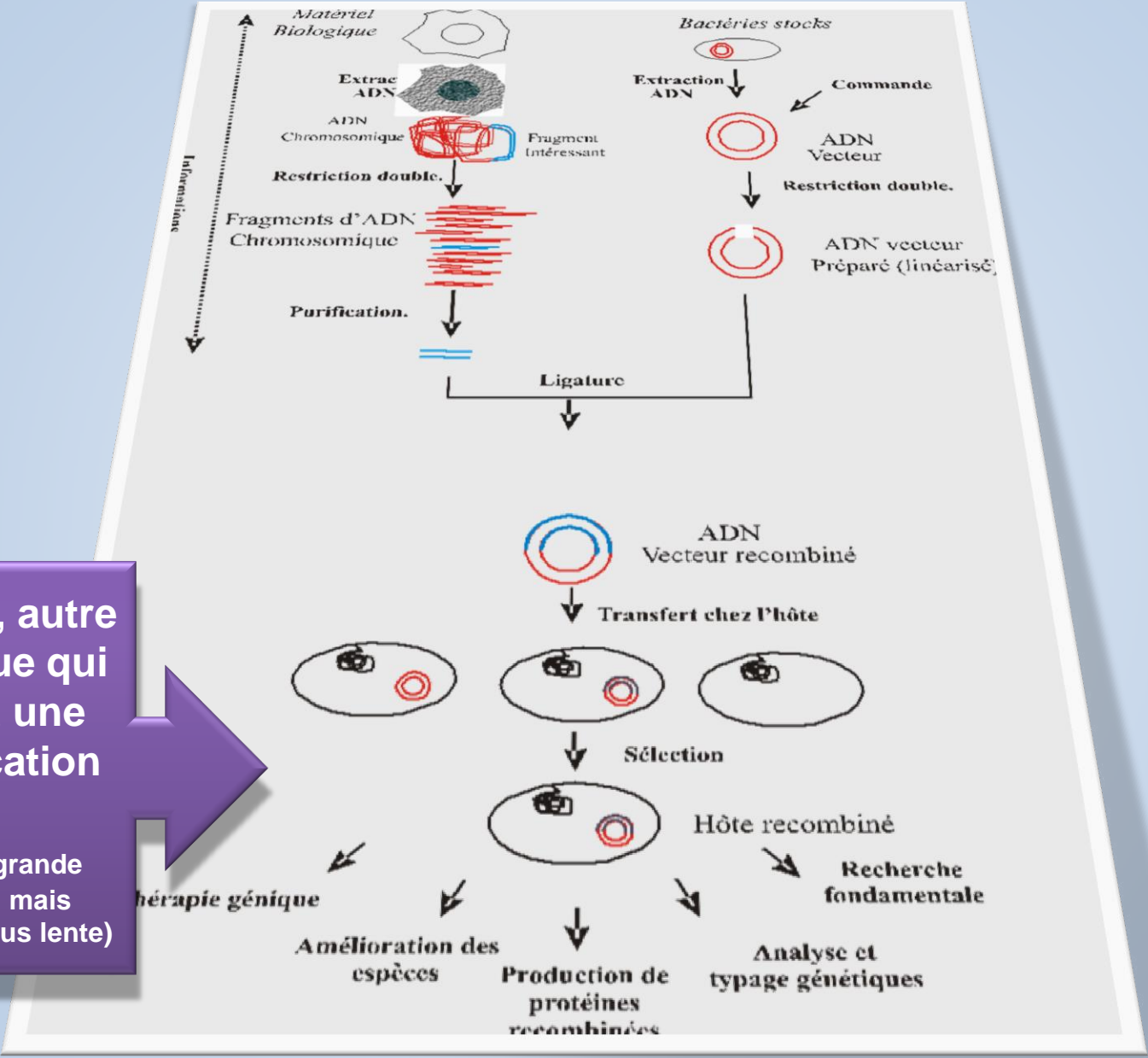
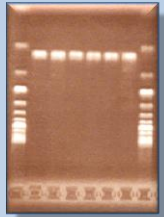


La PCR ?



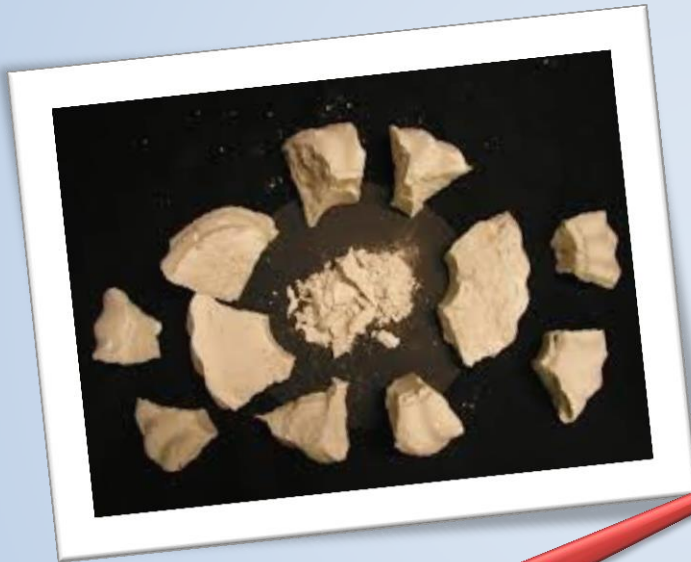
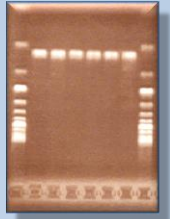
- Technique
- d'amplification
- spécifique
- *in-vitro*
- d'un fragment
- d'ADN

C4. Justifier la nécessité d'ajouter ce qualificatif ?



Clonage, autre technique qui permet une amplification
 (de plus grande qualité ... mais nettement plus lente)

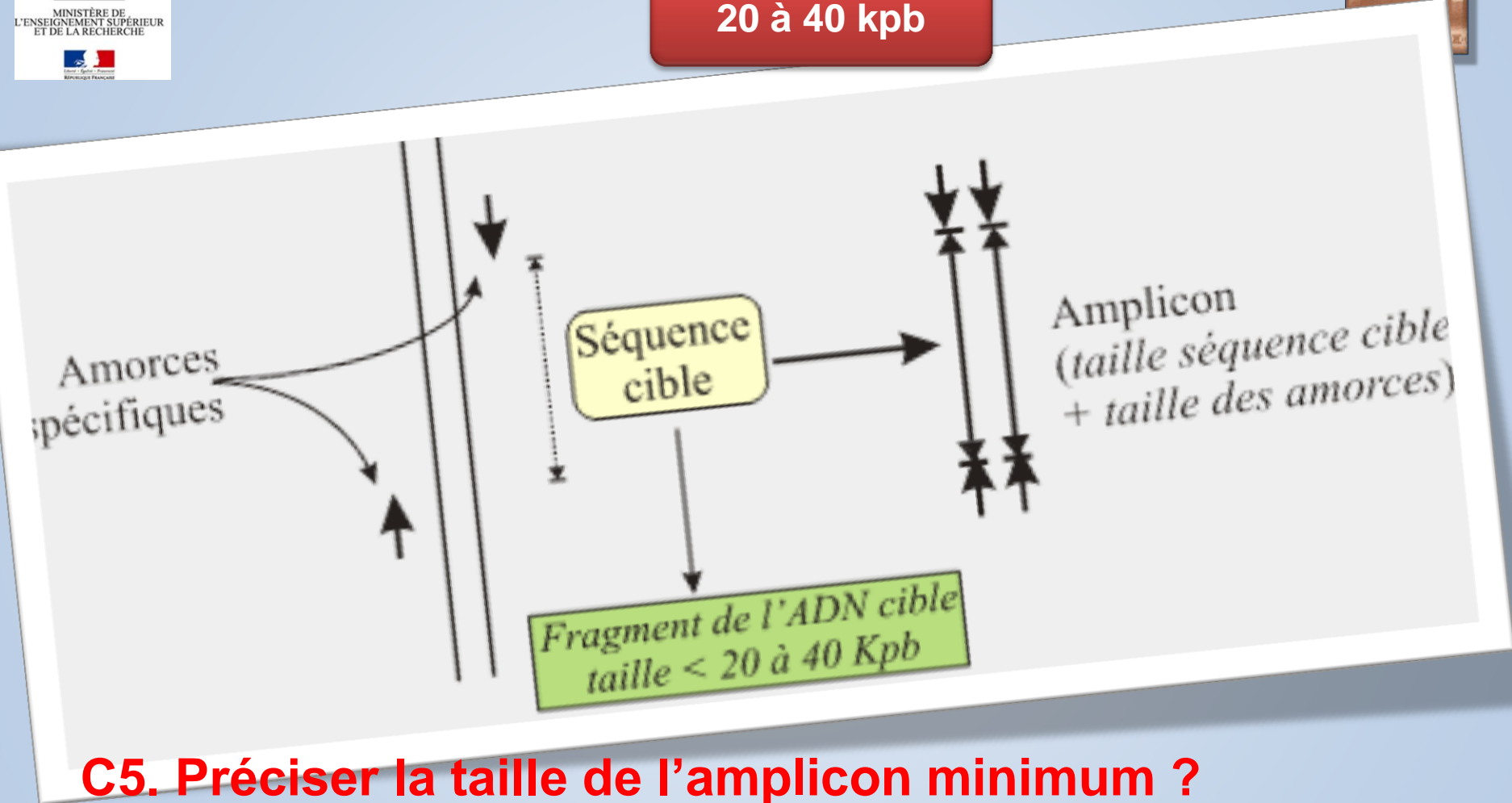
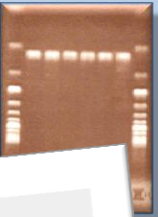
La PCR ?



- Technique
- d'amplification
- spécifique
- *in-vitro*
- **d'un fragment**
- **d'ADN**

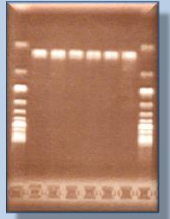
Taille maximale

20 à 40 kpb



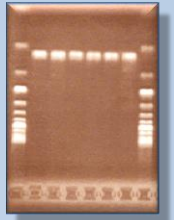
C5. Préciser la taille de l'amplicon minimum ?

La PCR ?

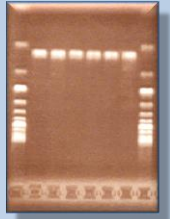


- Technique
- d'amplification
- spécifique
- *in-vitro*
- d'un fragment
- **d'ADN**

C6. Indiquer l'élément technologique qui rend possible une PCR sur des molécules d'ARNm ?



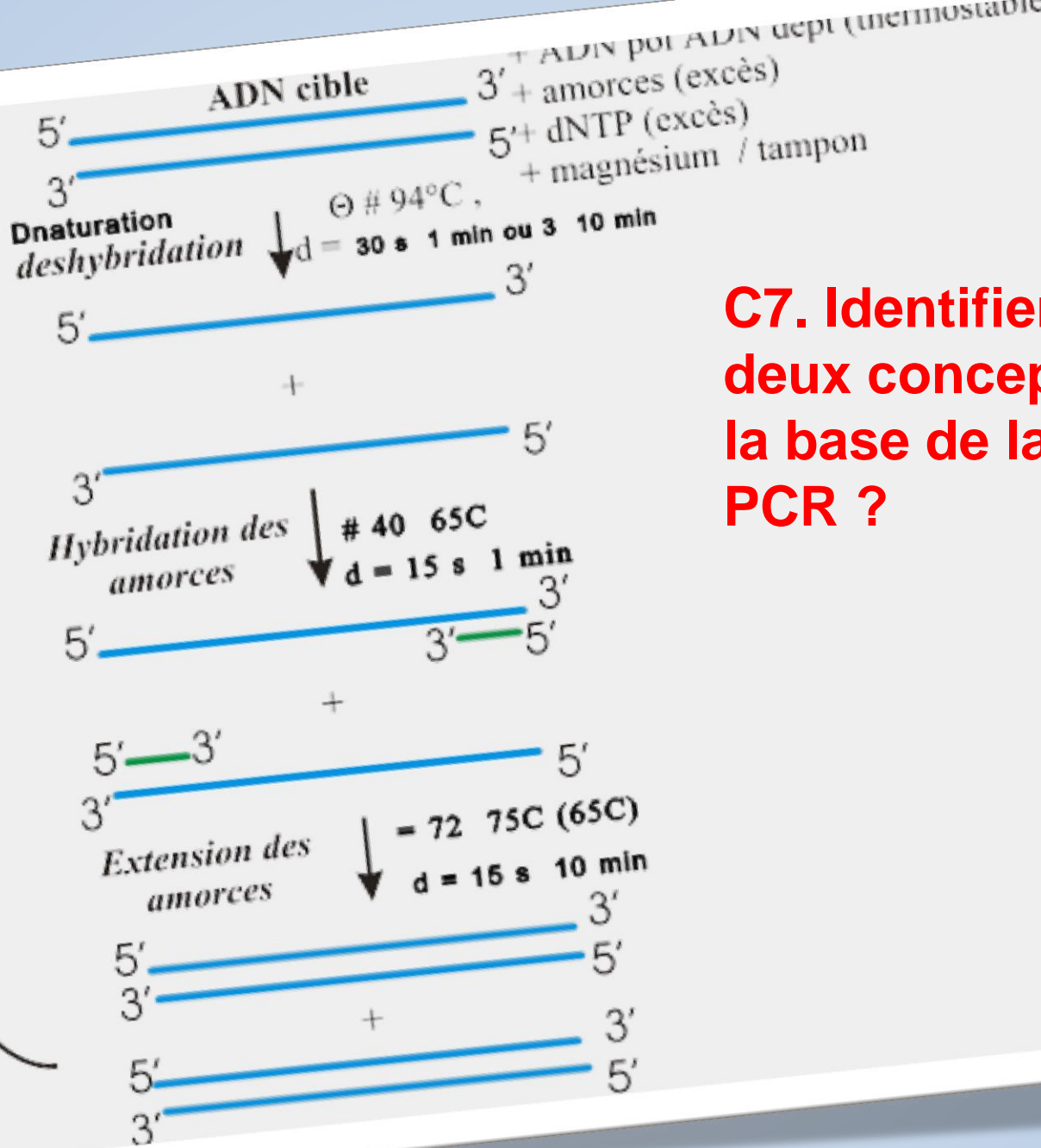
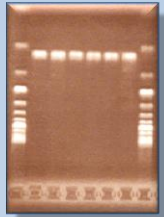
La PCR ?



version longue :

Technique d'amplification spécifique *in-vitro*
d'un fragment d'ADN ...

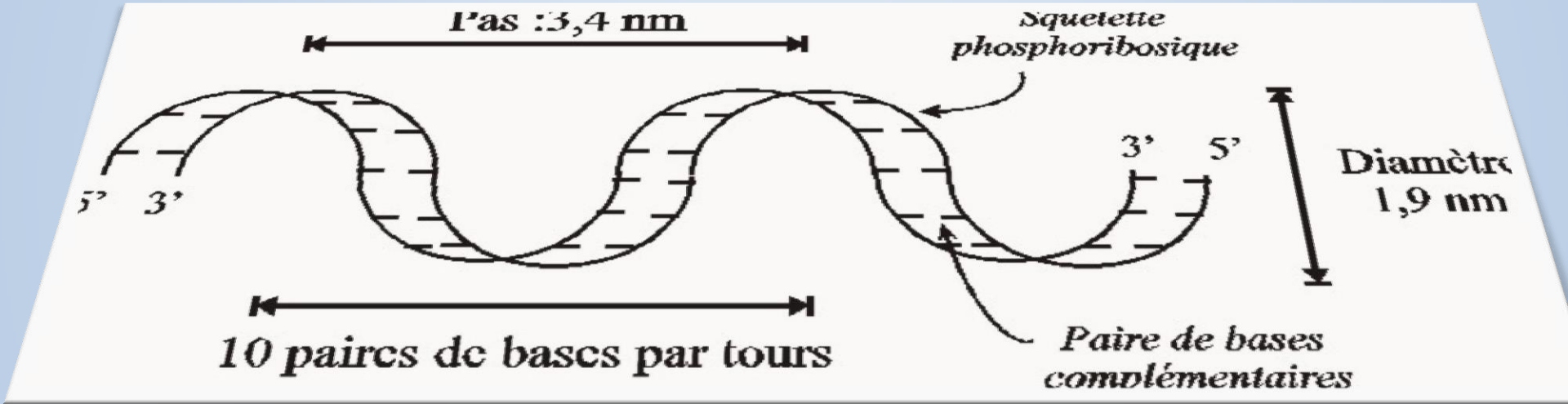
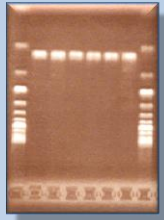
basée sur la répétition de deux
réactions d'extension d'une
amorce, catalysées par une
ADN polymérase ADN
dépendante généralement
thermostable



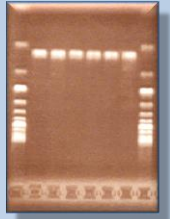
N fois avec
 $20 < N < 50$
 N # 30

C7. Identifier les deux concepts à la base de la PCR ?

1. Structure de l'ADN



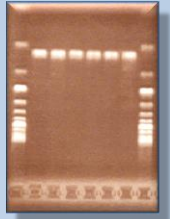
2. Courbe de fusion de l'ADN db



Comment évolue la structure de l'ADN db en fonction de la température ?

C8. Proposer une manipulation permettant d'obtenir une courbe de fusion d'une molécule d'ADN db ?

2. Courbe de fusion de l'ADN db



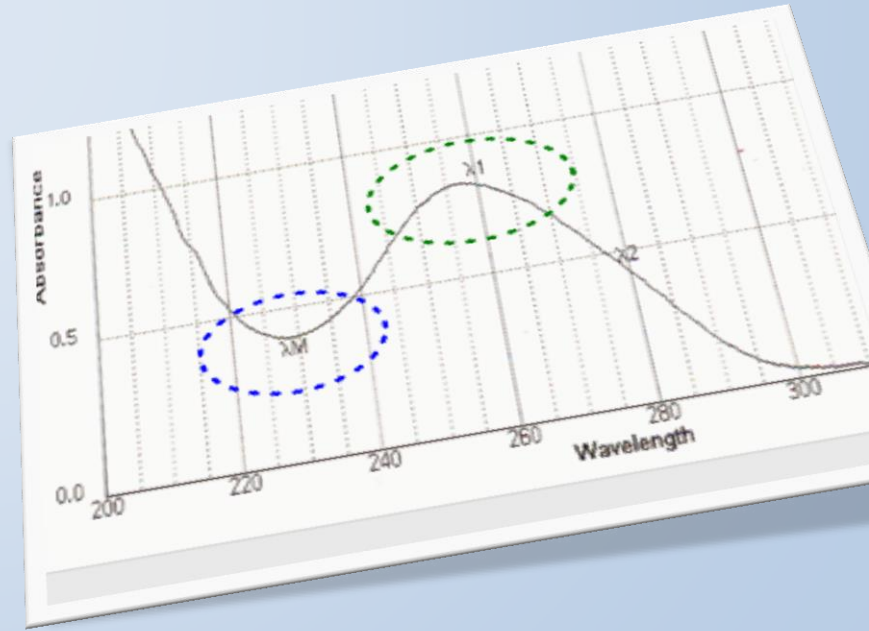
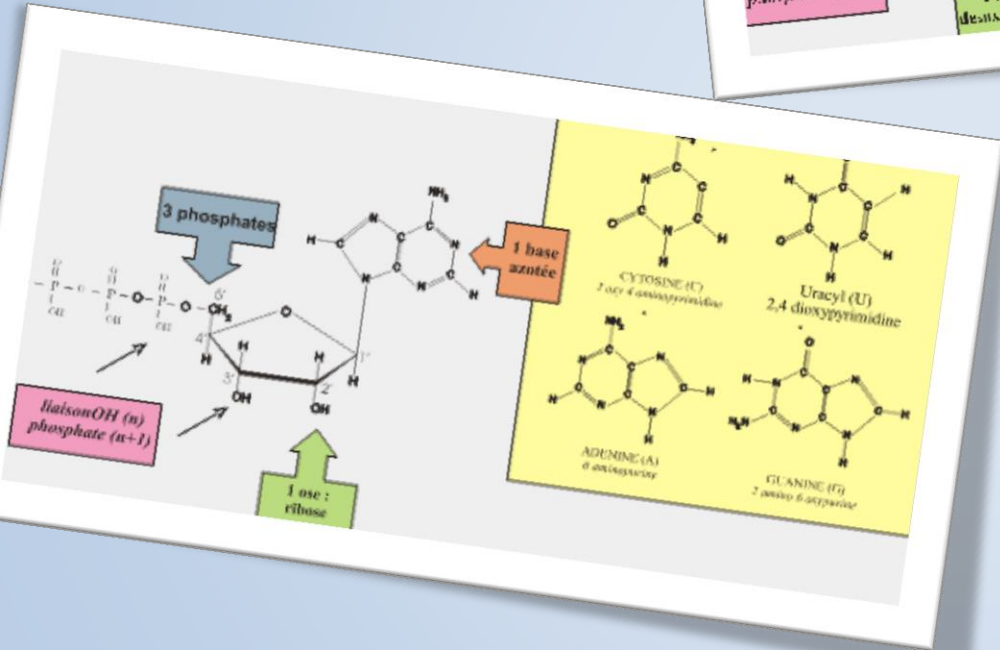
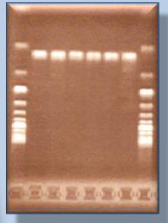
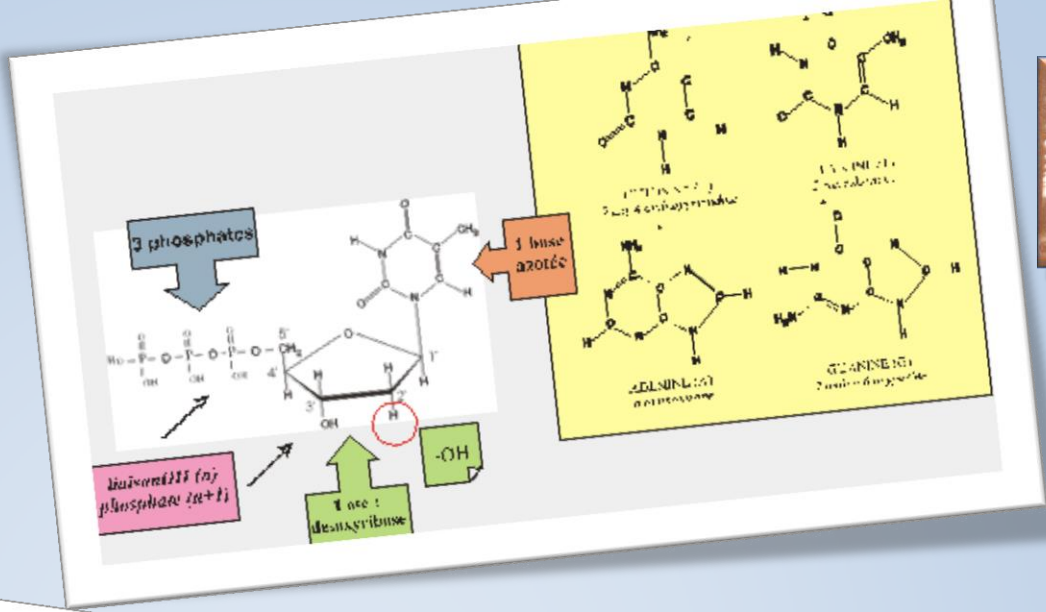
Comment évolue la structure de l'ADN db en fonction de la température ?

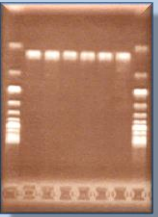
C9. Proposer une manipulation permettant d'obtenir une courbe de fusion d'une molécule d'ADN db ?



C8. Indiquer une propriété de l'ADN permettant de suivre la formation d'une courbe de fusion ?

Spectrophotométrie UV





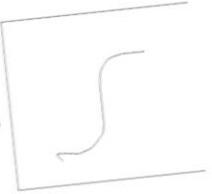
Solution d'ADN
iluée (= solution D)



Réalisation
Courbe de fusion

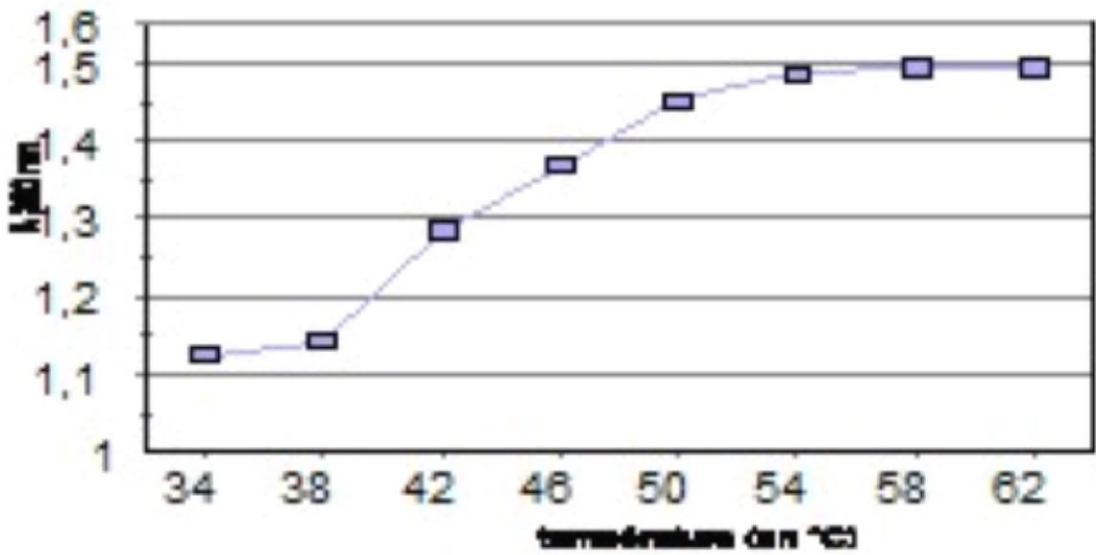
01 02 03 04 05
UV1 UV2 UV3 UV4 UV5
méthode discontinue

Obtention
Courbe de fusion

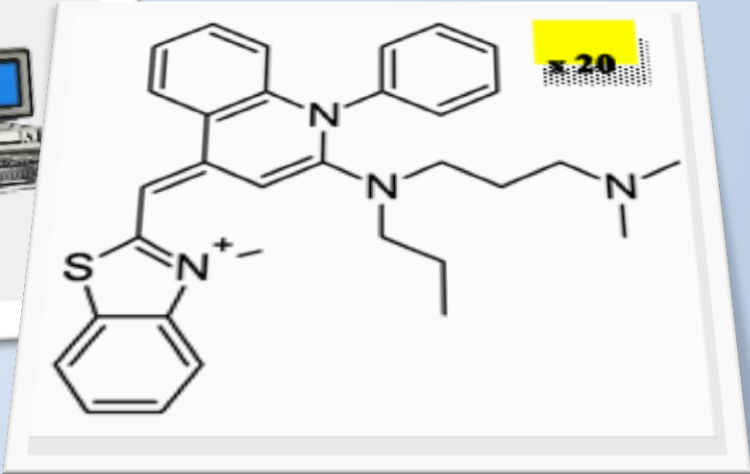
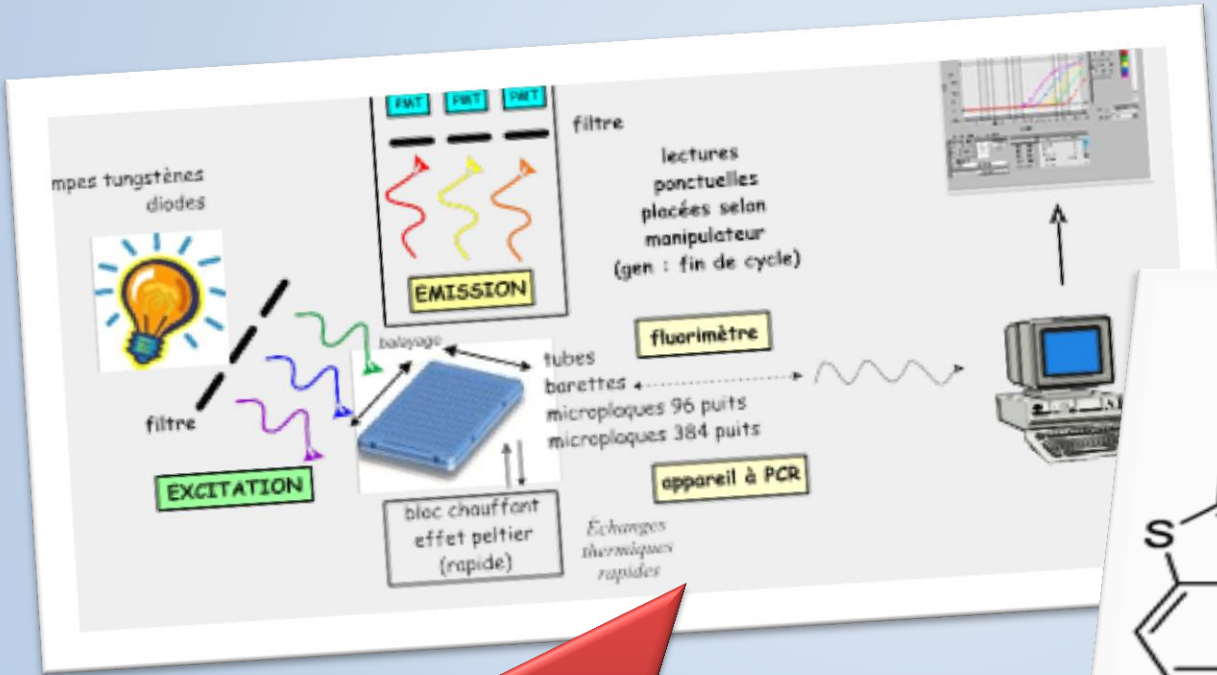
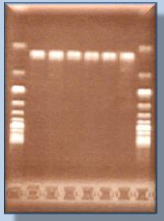
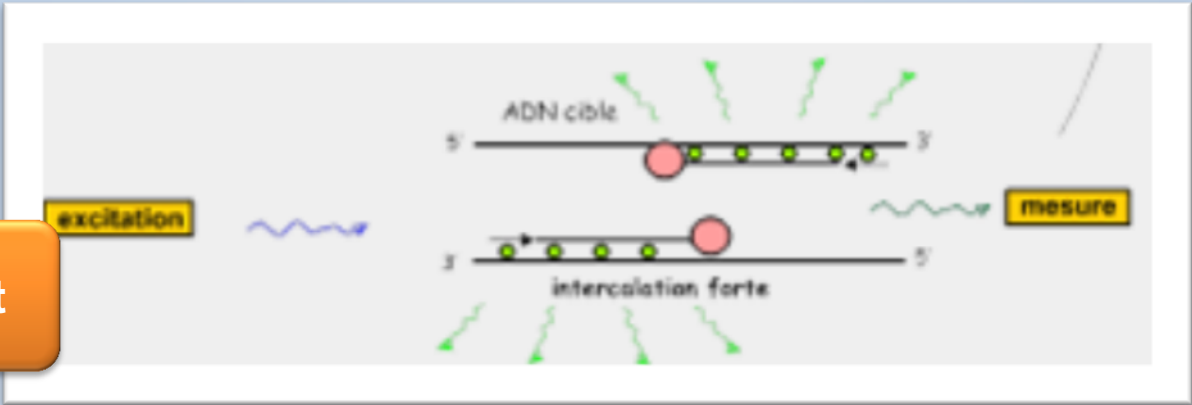


- STBR green

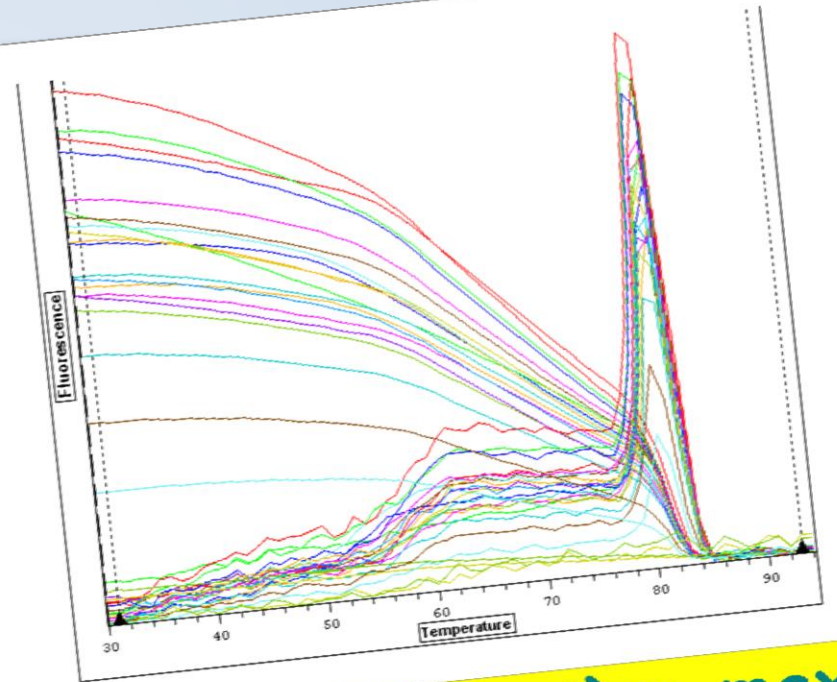
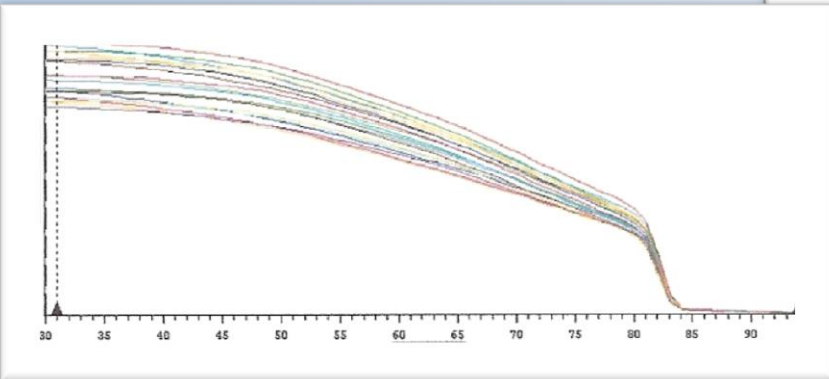
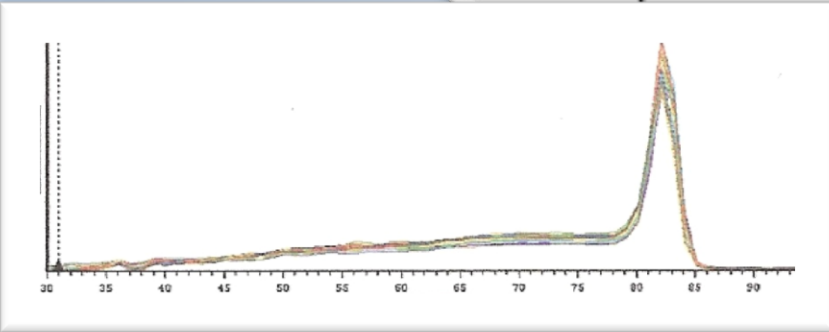
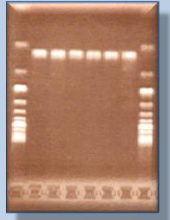
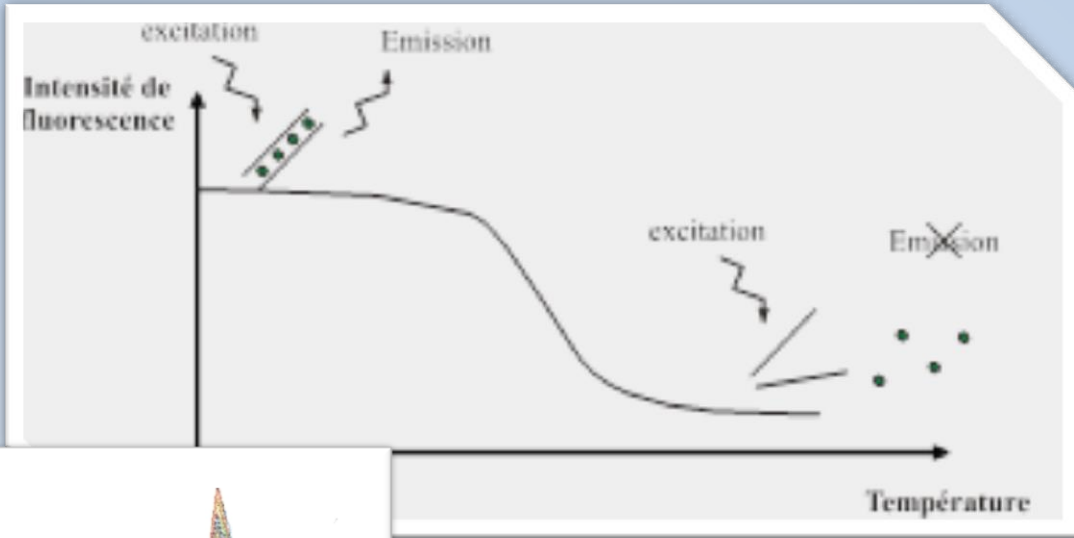
courbe de fusion



intercalant



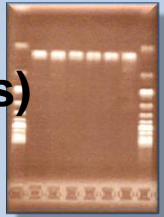
Signal mesurable à # 50 pg



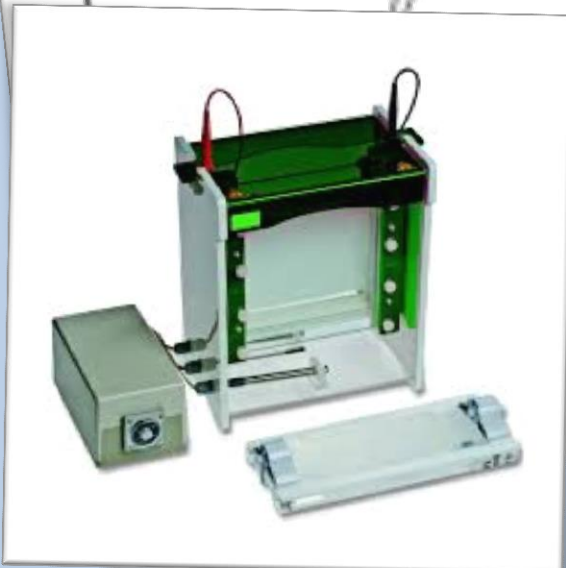
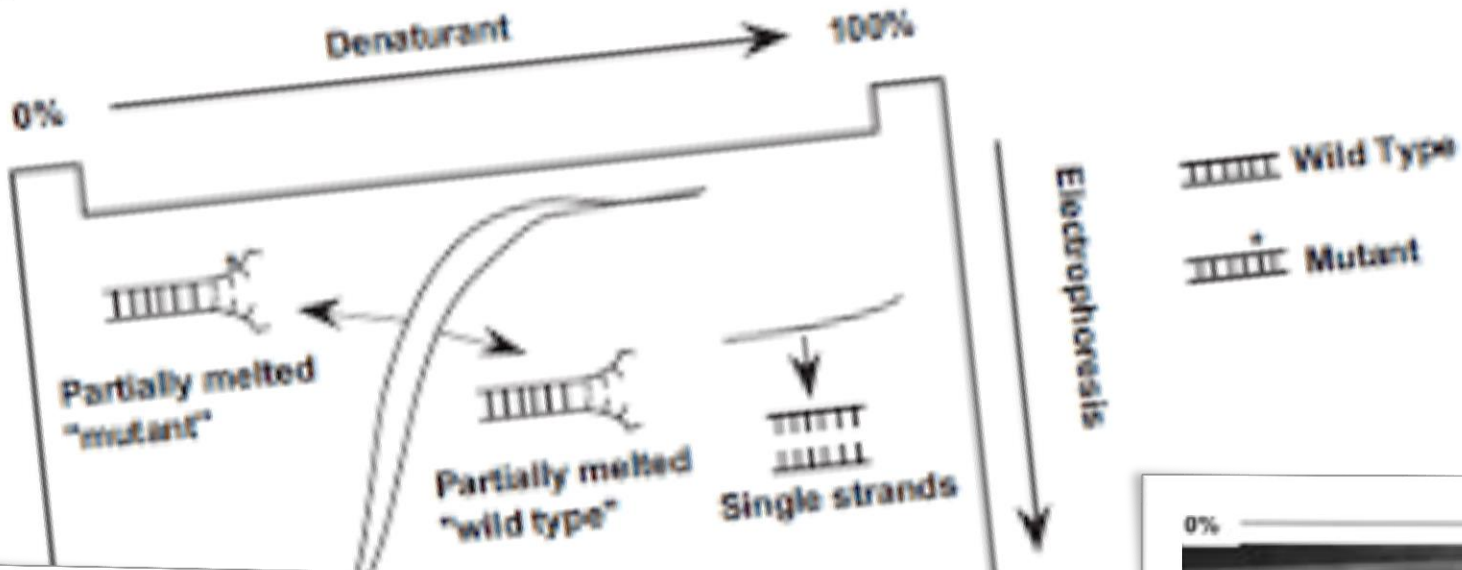
T_m = dérivée première maxima

électrophorèse

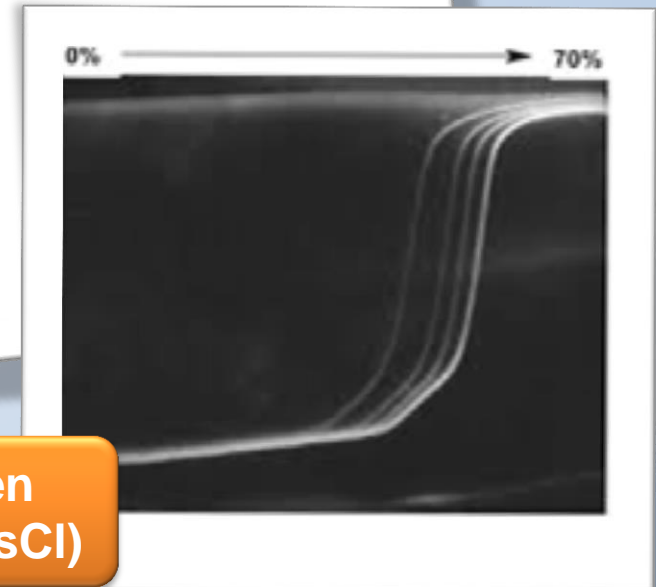
TEMPERATURE
(DDGE : Denaturing DNA Gel Electrophoresis)



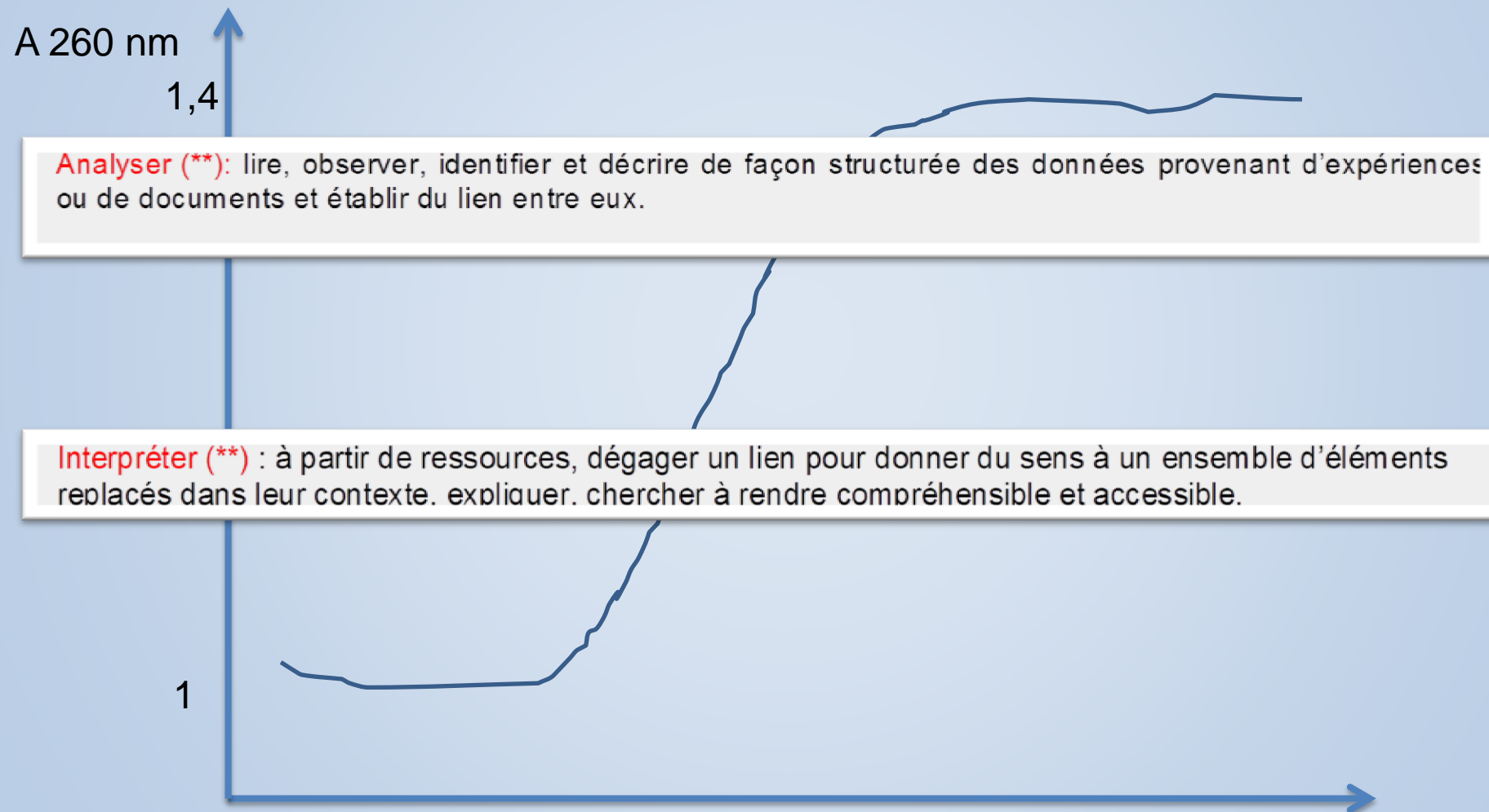
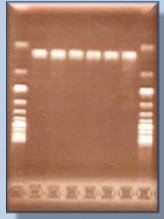
L'É
MINISTÈRE DE
L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR
ET DE LA RECHERCHE



Ultracentrifugation en
gradient de densité (CsCl)



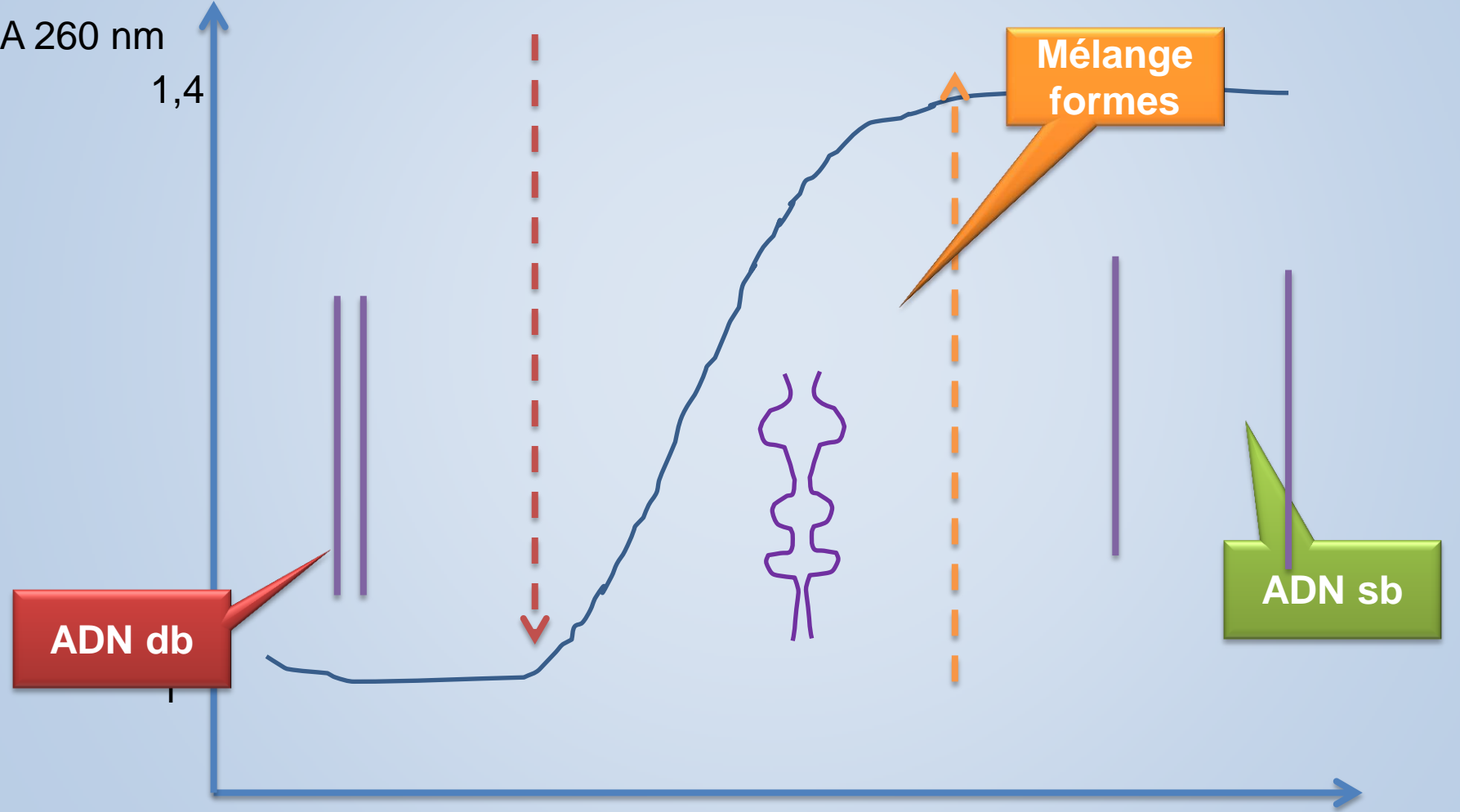
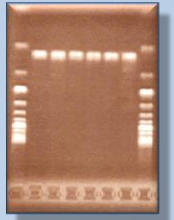
C10. Analyser et interpréter la courbe de fusion de l'ADN db ?



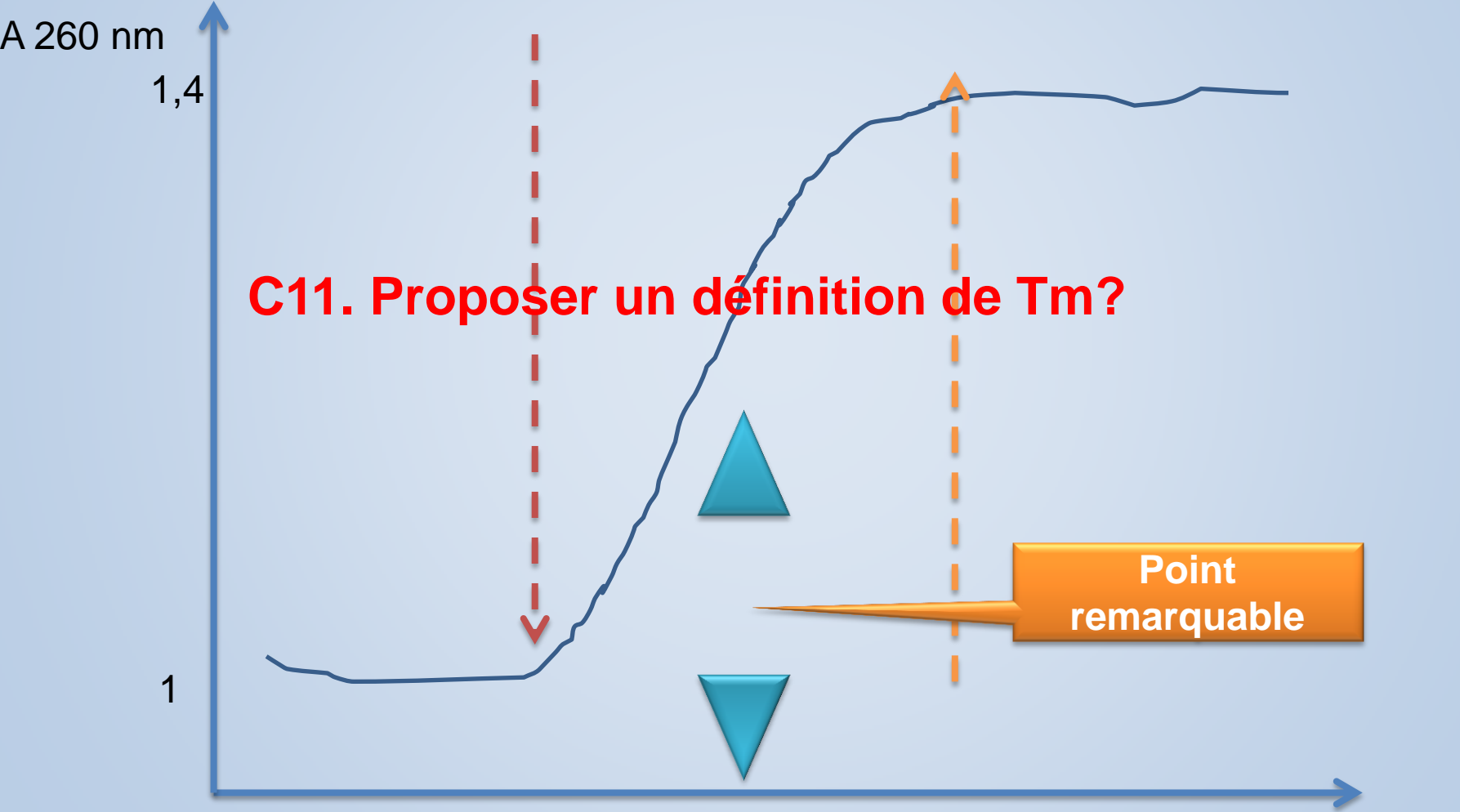
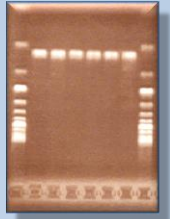
Analyser ():** lire, observer, identifier et décrire de façon structurée des données provenant d'expériences ou de documents et établir du lien entre eux.

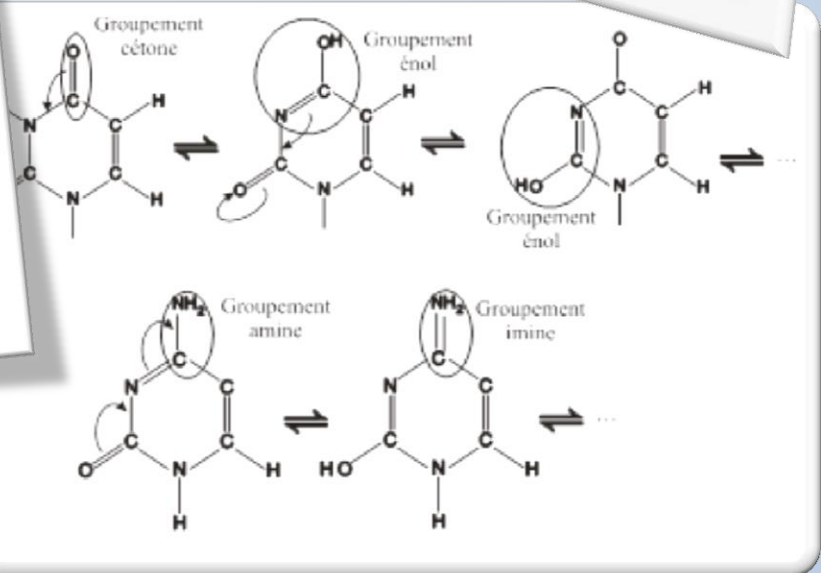
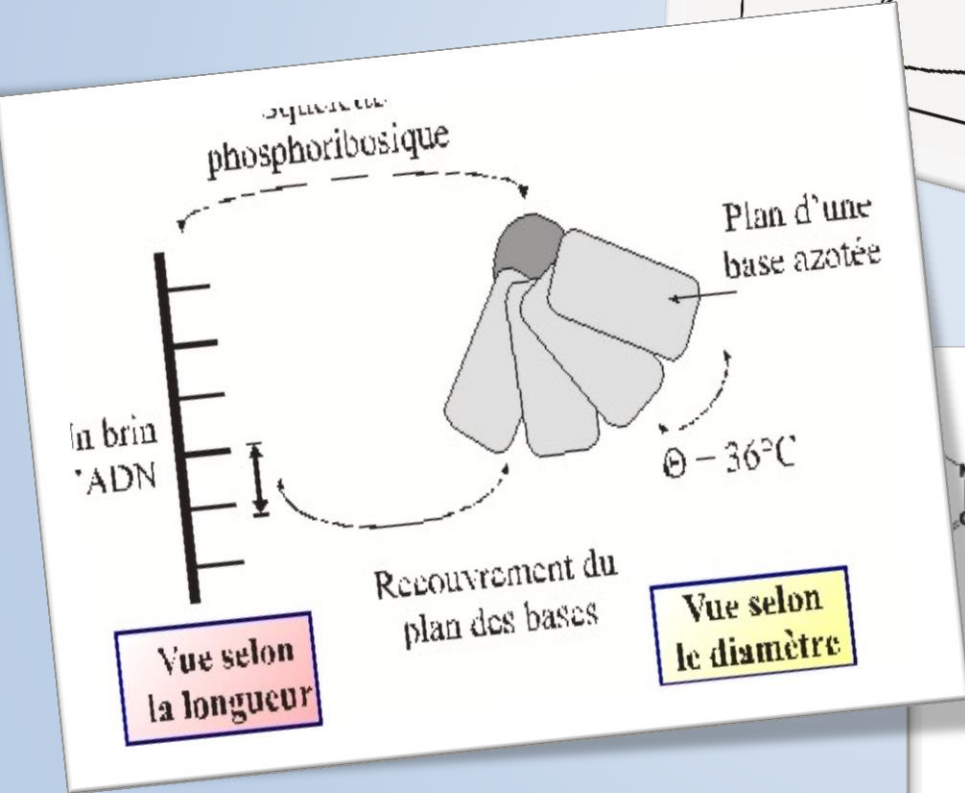
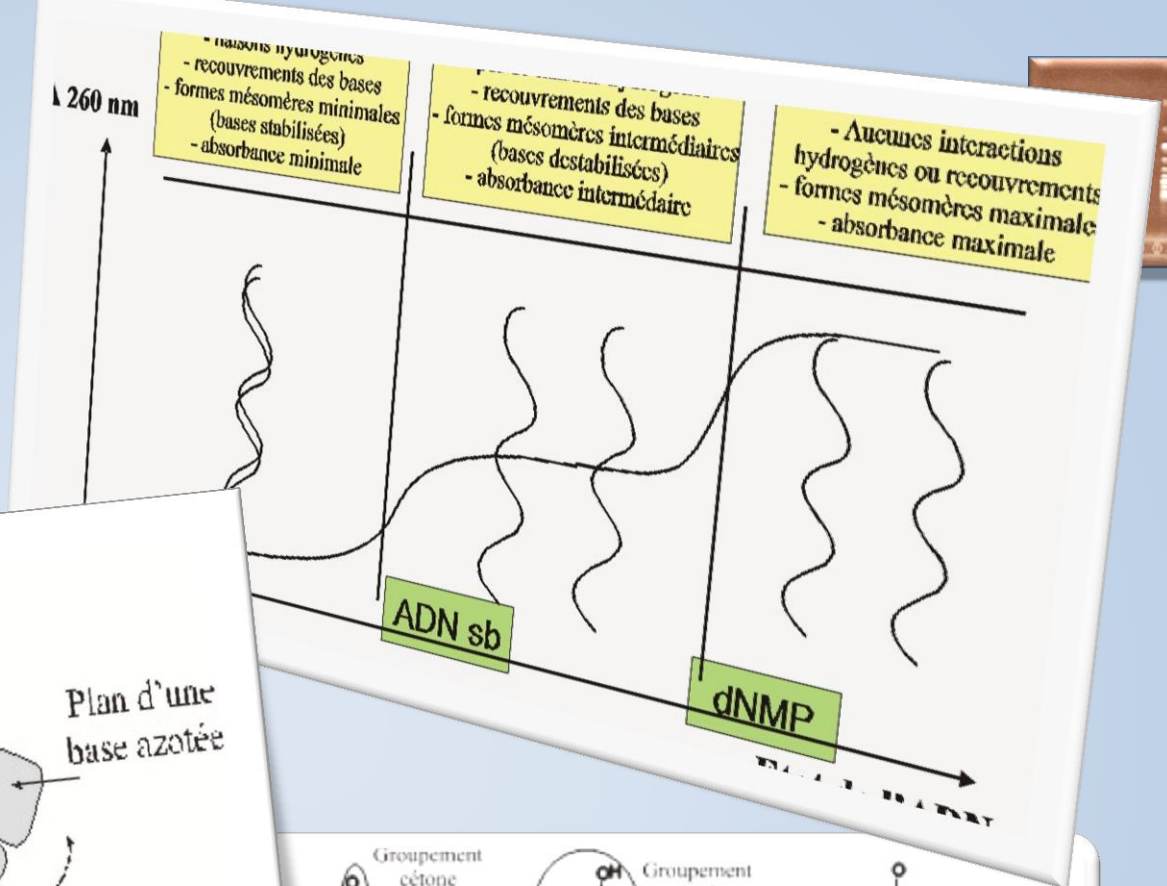
Interpréter ():** à partir de ressources, dégager un lien pour donner du sens à un ensemble d'éléments replacés dans leur contexte. expliquer. chercher à rendre compréhensible et accessible.

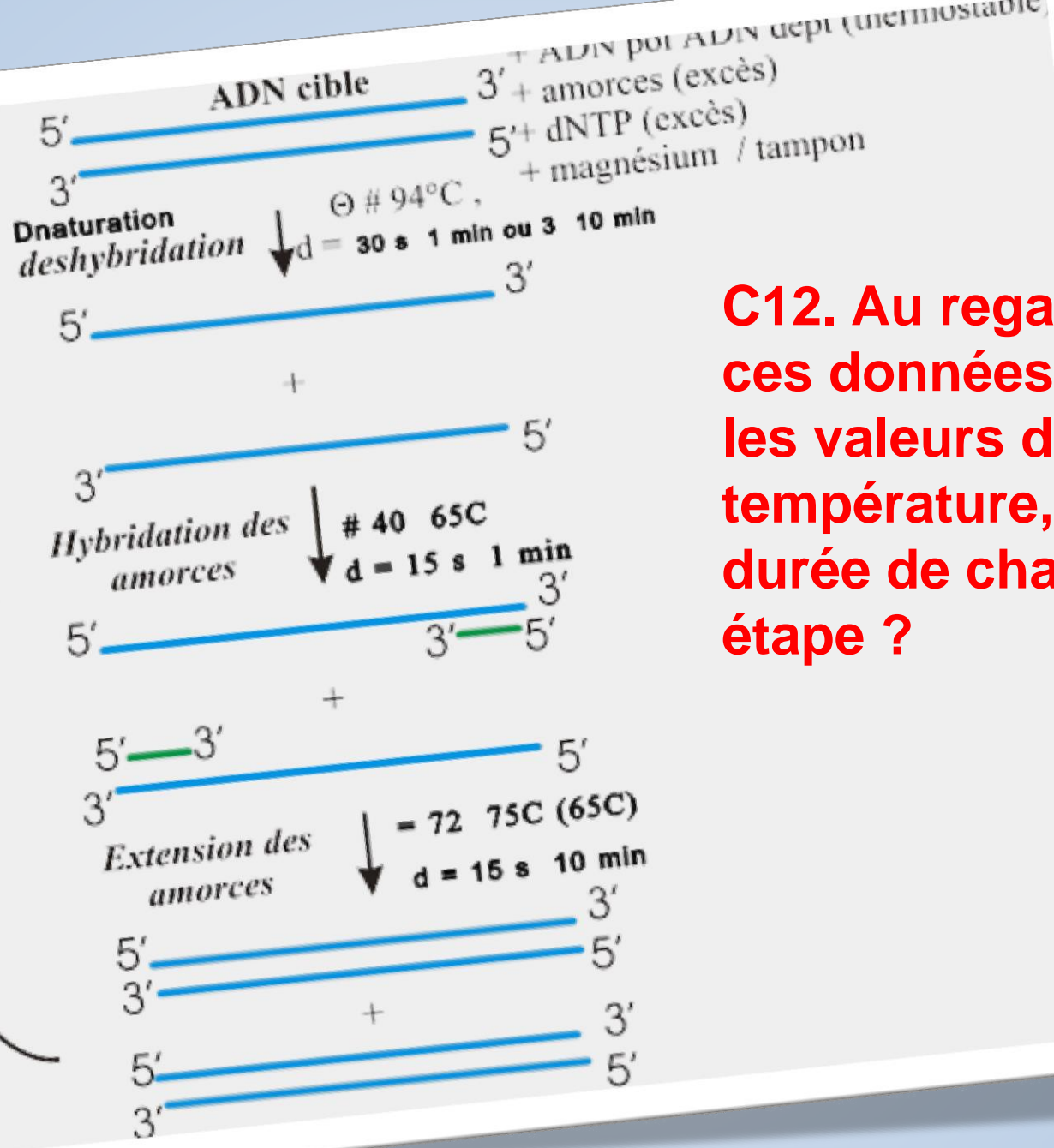
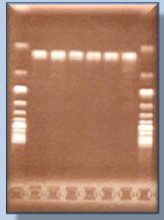
C10. Analyser et interpréter la courbe de fusion de l'ADN db ?



C10. Analyser et interpréter la courbe de fusion de l'ADN db ?

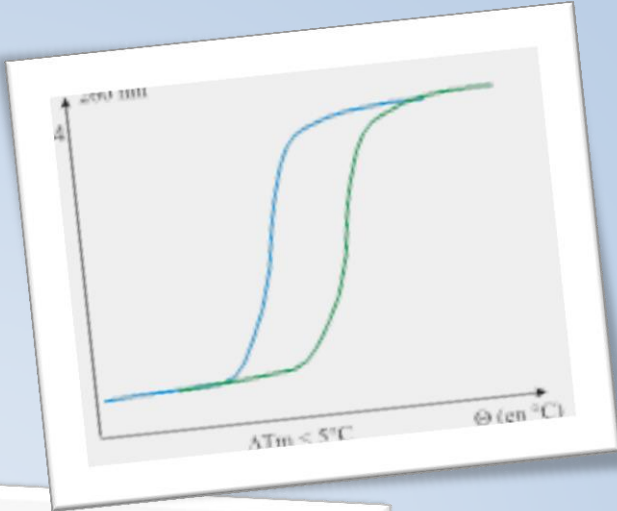
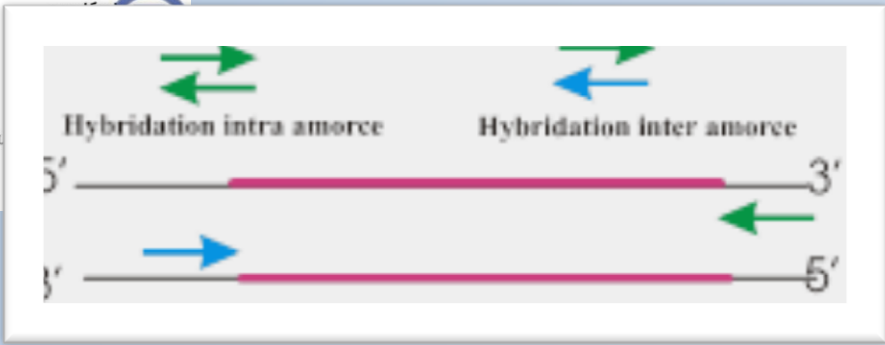
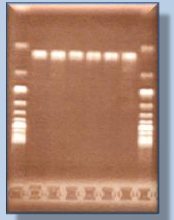




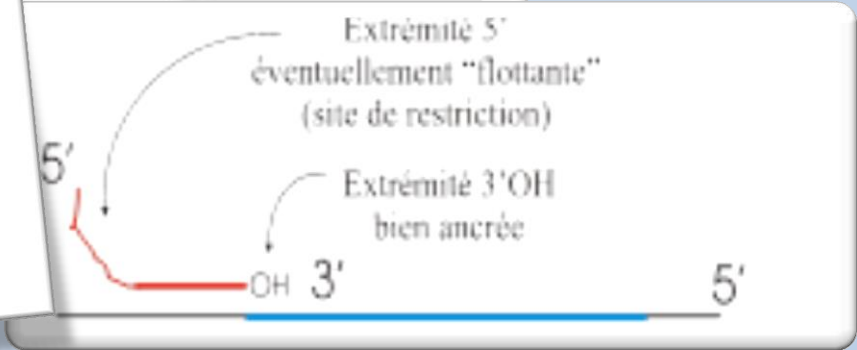
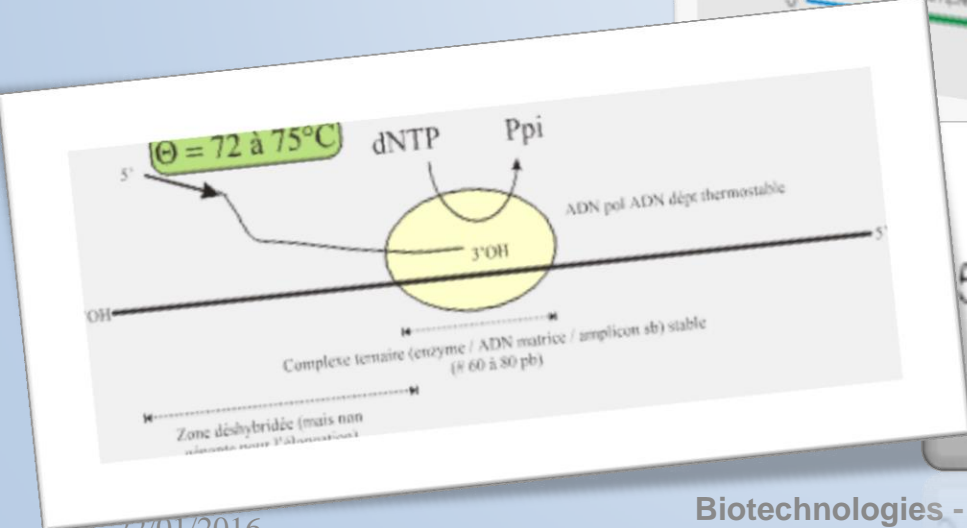
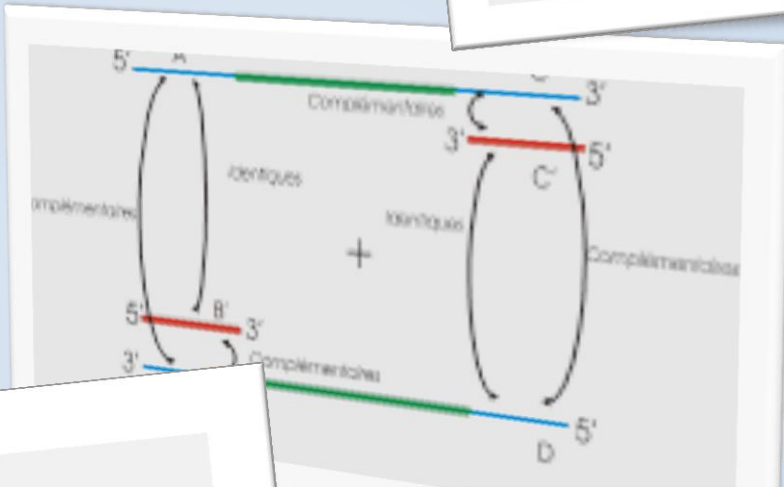


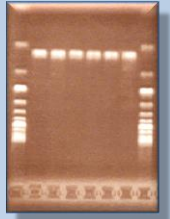
N fois avec
 $20 < N < 50$
 N # 30

C12. Au regard de ces données, justifier les valeurs de température, de durée de chaque étape ?

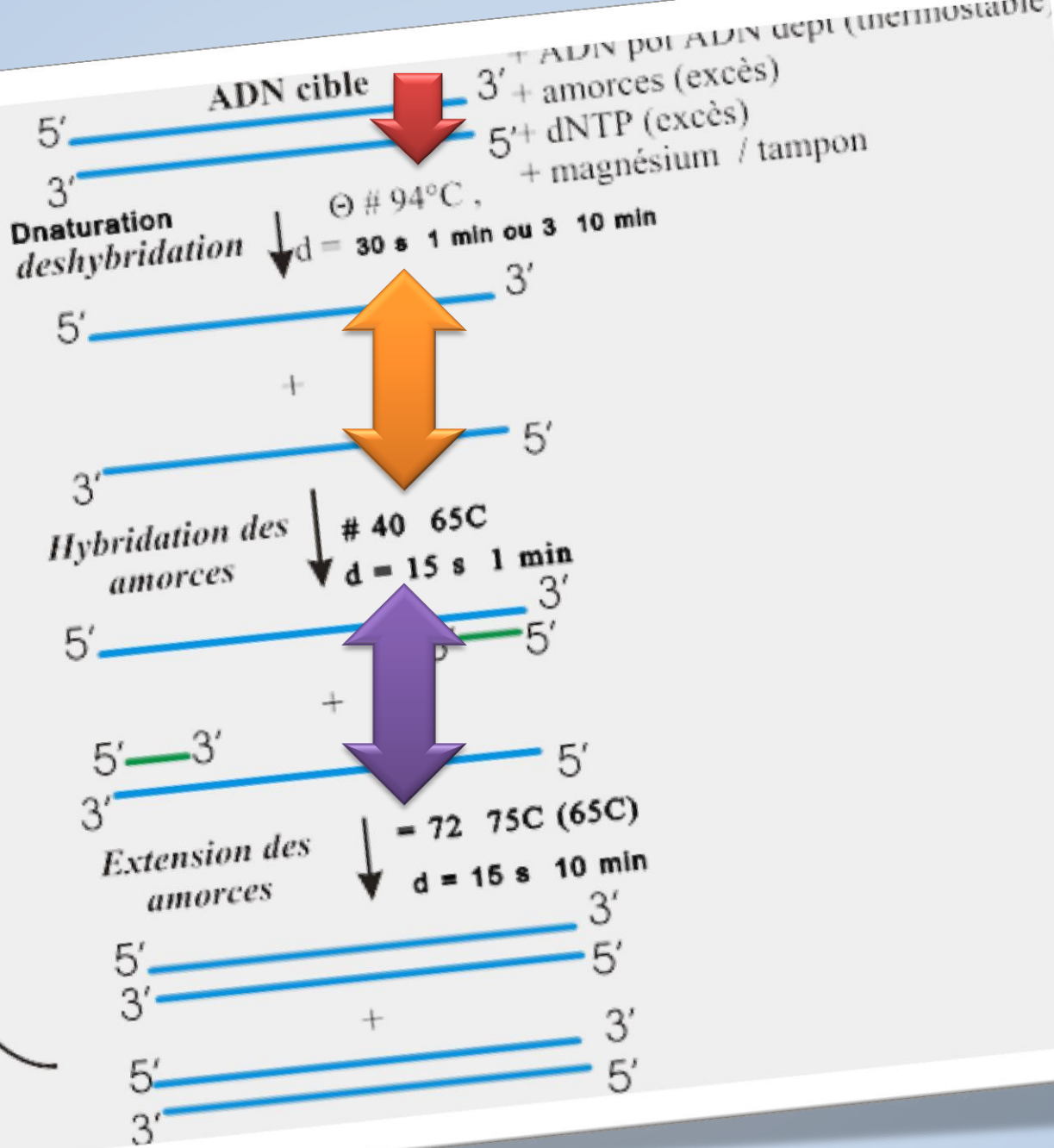
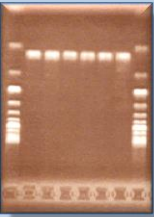


$T_m = 69,3 + 0,41 \times (\text{GC}\%)$

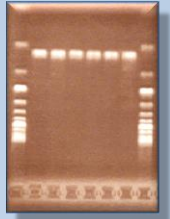




**C13. Identifier les incohérences de
cette technique ???**



N fois avec
 $20 < N < 50$
N # 30

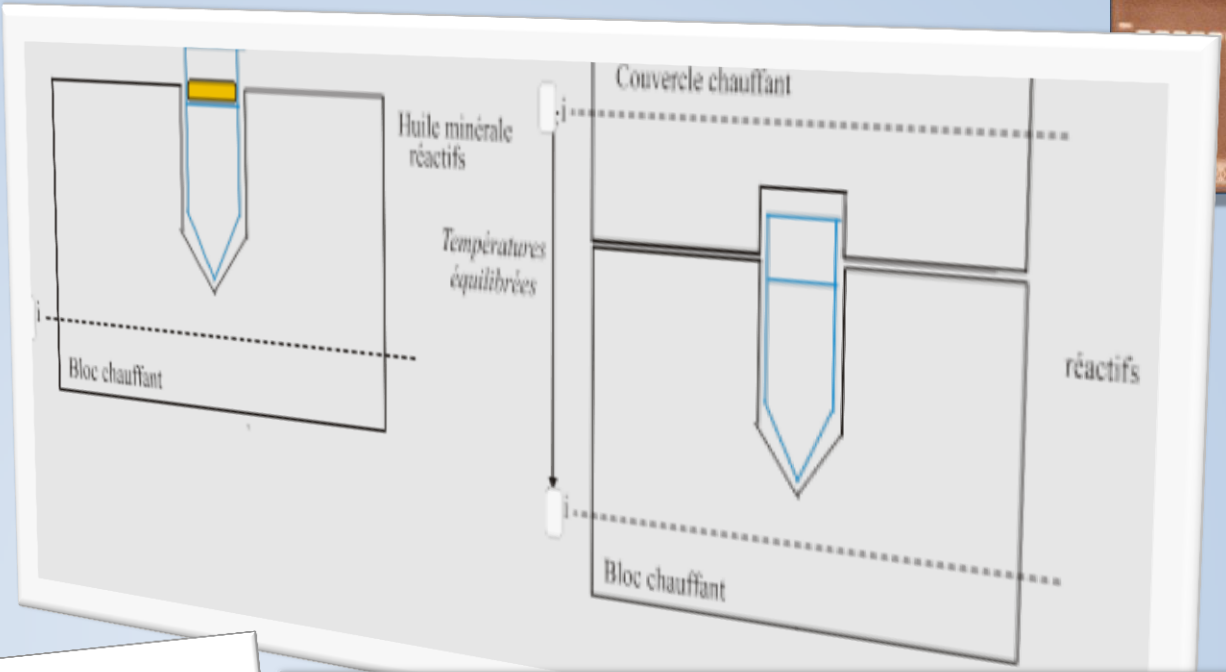


**C13. Identifier les incohérences de
cette technique ???**

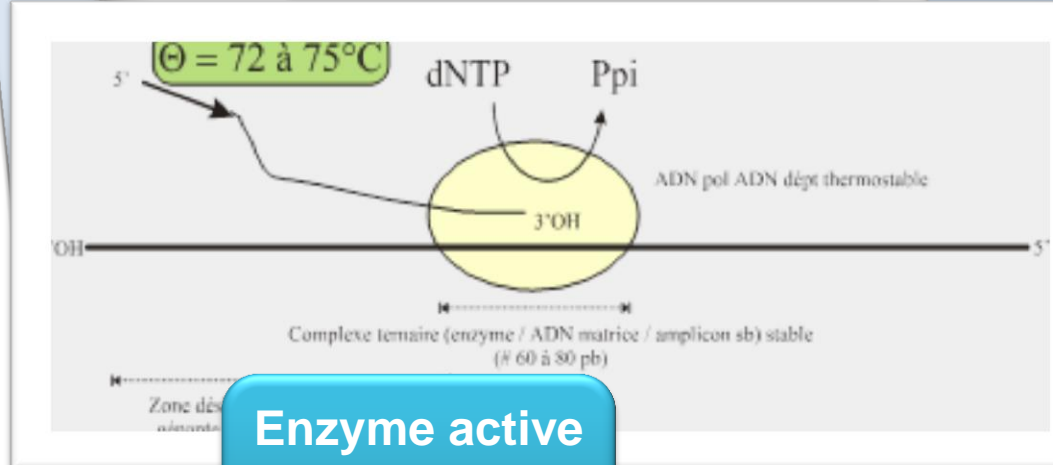
**C14. Identifier ou proposer les
réponses???**

évaporation

compétition

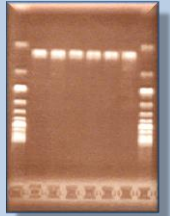


limite



Enzyme active en dessous du T optimal

Tâches de reformulation :



**Comment diminuer la durée d'une
PCR d'au moins de moitié (# 1 h)
dans le cadre d'un diagnostic
médical d'urgence ?**

Tâches de reformulation

