



## La PCR en temps réel et le diagnostic vétérinaire

L'intérêt de la PCR en diagnostic vétérinaire n'est plus à démontrer aujourd'hui. Complémentaire de la sérologie et de la culture pour le diagnostic de nombreuses pathologies, elle peut aussi être le seul moyen de détecter une bactérie quand celle-ci n'est pas cultivable. Présente depuis deux ou trois ans aux catalogues des laboratoires vétérinaires, elle fait aujourd'hui l'objet de textes officiels.

Avec la nécessité de quantifier (notamment les OGM) et d'automatiser, la PCR est devenue quantitative et permet d'obtenir des résultats en temps réel. Utilisée en routine dans le secteur médical (test HIV-1) et pour la détection des OGM, elle trouve de nombreuses applications possibles dans le domaine vétérinaire. Petite revue de la « Q-PCR », ses applications, ses avantages mais aussi ses limites.

### EDITO

Même si la PCR vous semble une technique récente bien souvent nouvellement intégrée à la routine des laboratoires, elle continue d'évoluer pour donner un plus grand nombre d'information, ainsi qu'une simplification de son utilisation.

La PCR temps réel peut être considérée comme la troisième génération de PCR après les systèmes de révélation PCR colorimétriques utilisant un matériel semblable à la technique ELISA. C'est en combinant l'utilisation de nouveaux thermocycleurs réalisant des mesures optiques et des ADN de synthèse liés à des chromophores, que l'amplification de l'ADN peut être suivi au cours de la réaction. Outre les gains en rapidité et l'absence de manipulation pour la lecture, avec ces techniques, la quantification PCR devient une réalité.

Dans ce numéro, nous avons voulu faire un point pour vous sur les différentes PCR temps réel et vous montrer les enjeux, en attendant la prochaine évolution vers les puces à ADN.

Bonne lecture à tous.

Dr Bruno Chevallier,  
PDG d'Adiagène

### Contacts

infos@adiagene.fr

### Service technique

technique@adiagene.fr

### Notre distributeur

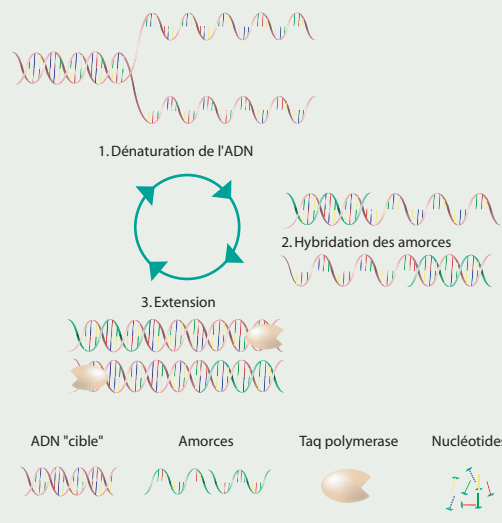
AES Laboratoire  
aes@aeslaboratoire.com  
Votre contact : Tony Rouillard  
tony.rouillard@aeslaboratoire.com

Tél. 02 99 73 11 55

Fax. 02 99 73 15 89

Adiagene - 38, rue de  
Paris - 22000 SAINT-BRIEUC -  
Tél. 02 96 68 40 20 - Fax. 02 96 68 37 93

### Rappel : La technique PCR



#### Fonctionnement de la PCR en temps réel

La plupart des PCR temps réel sont basées sur la mesure d'émission de fluorescence proportionnelle à la quantité de gènes amplifiés.

Plusieurs techniques existent : elles utilisent soit des molécules se liant à l'ADN, soit des sondes moléculaires spécifiques de la cible amplifiée.

#### Molécules se liant non spécifiquement à l'ADN

La molécule SyBR® Green est un agent intercalant émettant de la fluorescence quand il est lié à l'ADN. La spécificité de cette méthode est donc faible puisqu'il va se lier à n'importe quel ADN. Elle peut cependant être améliorée en utilisant une courbe de températures de dénaturation des produits de la PCR.

#### Utilisation de sondes

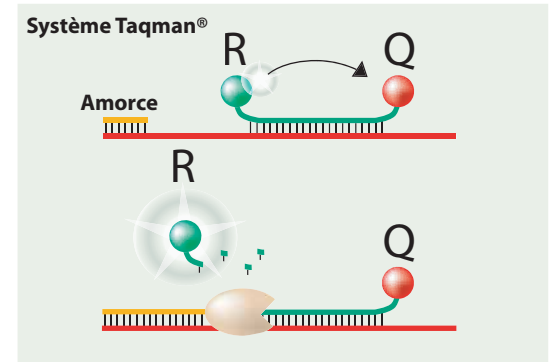
La fluorescence est obtenue par l'utilisation d'une sonde marquée. Le but est de faire apparaître la fluorescence de manière proportionnelle à la quantité d'ADN cible présent. Deux marqueurs sont nécessaires : un marqueur R (reporter) émetteur de fluorescence et un marqueur Q (quencher) qui absorbe cette fluorescence lorsque R et Q sont proches.

Lorsque Q et R sont séparés soit par hydrolyse de la sonde, soit lors de l'hybridation des amorces, soit lors de la synthèse du brin complémentaire, la fluorescence de R n'est plus absorbée. La mesure de la fluorescence est donc proportionnelle au nombre d'ADN produits par la PCR, lui-même proportionnel au nombre d'ADN-cibles présents au départ. L'utilisation de sondes spécifiques de l'ADN cible recherché permet d'obtenir

une très grande sensibilité.

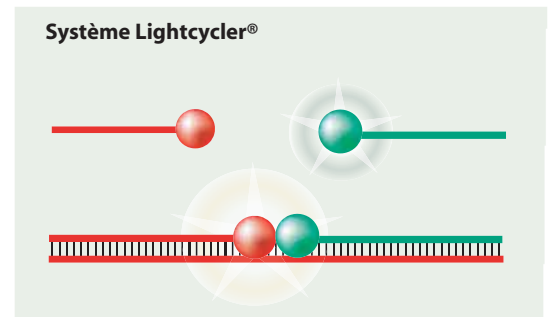
#### Sondes d'hydrolyse type Taqman®

Les sondes de type Taqman®, parmi les plus utilisées, s'hybrident comme les amorces sur les ADN cibles. Lors de son passage, la Taq polymérase décompose la sonde et libère le fluorophore en solution.



#### Sondes d'hybridation : Lightcycler®, Scorpions® et balises moléculaires

Le système "Lightcycler"® développé par Roche consiste en un couple de sondes : l'une marquée à la fluorescéine, l'autre marquée par un autre fluorophore. En solution, seule la fluorescéine fluoresce. Les deux sondes vont s'hybrider "tête bêche" sur les produits de la PCR et la fluorescence émise par la fluorescéine va exciter l'autre fluorophore.



#### Le système Molecular beacons ou balises moléculaires

Ce système utilise des sondes possédant des marqueurs R et Q aux extrémités comme le système TaqMan®. Mais ayant une structure qui la replie sur elle-même (voir schéma recto), cette sonde ADN n'émet de la fluorescence qu'en présence de nombreuses copies amplifiées de l'ADN cible qui vont provoquer la déformation de sa structure.

## Actus

### ● A vos claviers :

#### Appel à publications :

Adianews se veut un outil de promotion de la PCR en analyses vétérinaires.

Si vous avez installé la PCR dans votre laboratoire, que vous avez réalisé une étude ou des résultats intéressants, envoyez les à :

Solenn VAILLANT-BOUGIS

Adiagène

38, rue de Paris

22000 SAINT BRIEUC

ou

solenn.vaillant@adiagene.fr,

nous les publierons dans une prochaine édition d'Adianews.

### ● Deux nouveaux distributeurs pour la gamme Adiavet® :

#### Angleterre

##### Investcare-Vet

134 Hale Lane, Edgware

Middlesex HA89RZ

Contact : M. Jonathan Taylor

Tel : + 44 20 8906 3558

Fax : + 44 20 8931 6224

Email : mail@investcare-vet.com

Web : www.investcare-vet.com

#### Italie

##### Celbio

Via Figino 20/22

20016 Pero (MI)

Contact : Mme Diana

Colombin

Tel : +39 (0)2 381951

Fax : +39 (0)2 33913713

E-mail : info.bio@celbio.it

Web : http://www.celbio.it

### ● Vous souhaitez installer la PCR dans votre laboratoire d'analyses vétérinaires?

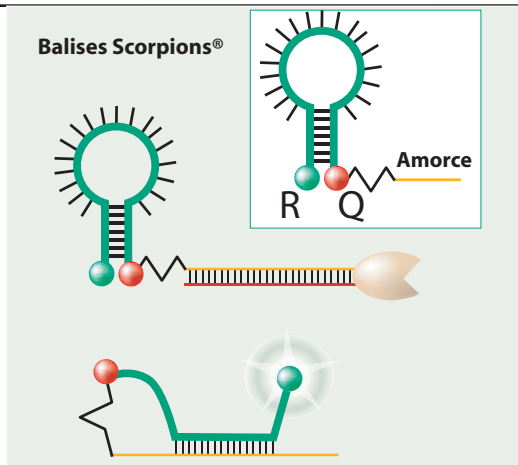
**Tony Rouillard**, ingénieur d'application chez notre distributeur AES Laboratoire, vous conseille sur place et vous aide à démarrer votre activité PCR.

tony.rouillard@aeslaboratoire.com

### ● Adianews, nouvelle génération

Merci de prendre une ou deux minutes pour nous donner votre avis sur notre lettre d'information.

### Balises Scorpions®



**Les balises scorpions** portent ce nom car elles se recourbent sur elles-mêmes. Une des amorces PCR et la sonde fluorescente sont liées (cf schéma). Repliée aussi sur elle-même, la fluorescence de la sonde ne sera libérée que par un changement de structure obtenue avec la synthèse PCR.

Toutes ces méthodes (la liste présentée aujourd'hui n'est pas exhaustive) ont leurs spécificités. Le choix de l'une d'entre elles se fera en fonction du test à développer :

- spécificité et sensibilité nécessaires du test
- variabilité de la cible (par exemple : virus très changeants)
- recherche de plusieurs bactéries ou virus simultanément : PCR multiplex,
- matrice de départ (nourriture, fèces ou matrice plus simple)...

### Un bon outil...

Aujourd'hui, un des principaux intérêts de la Q-PCR pour le diagnostic vétérinaire est l'automatisation en

plaques de 96 puits, car elle regroupe l'amplification et la révélation. Cette dernière se fait en enceinte fermée, diminuant donc le risque de contamination par de l'ADN amplifié d'échantillons positifs. La mesure en temps réel permet d'obtenir les résultats très rapidement, améliorant encore la rapidité de rendu de résultat de la PCR. Enfin, cette PCR permet une quantification grâce à des gammes de quantités connues d'ADN et autorise la recherche de plusieurs cibles dans la même analyse.

### ...mais coûteux

Il ne faut pourtant pas oublier que le matériel adapté à la technologie PCR temps réel représente un investissement important, qui ne sera amorti qu'avec un volume d'analyses suffisant.

### Adiagène, fabricant innovant

La vocation d'Adiagène est d'adapter les technologies issues des évolutions techniques au diagnostic vétérinaire. Après la réussite de sa gamme de tests PCR qualitatifs, Adiagène développe actuellement une nouvelle gamme de tests PCR temps réel. Le premier d'entre eux sera le test Adiavet® Paratub version PCR temps réel (système Taqman®).

Dans le cadre de cette recherche continue sur les nouvelles technologies, Adiagène s'intéresse aussi aux puces à ADN pour la détection des produits de la PCR qualitative, un moyen intéressant de s'affranchir des révélations par électrophorèse. Depuis novembre 2001, une puce à ADN lisible à l'oeil nu est disponible pour la détection des mycoplasmes aviaires. Cette lecture sur puces pourra également être automatisable en plaque de 96 puits.

Nous vous donnons rendez-vous pour une présentation de ce matériel à Lille les 15 et 16 octobre au Carrefour européen des Biotechnologies.

■ Solenn Vaillant-Bougis  
Adiagène

## Salons - Congrès

Retrouvez nous au **SPACE à Rennes** du 10 au 13 septembre. Venez poser vos questions sur la PCR en diagnostic vétérinaire, nous vous attendons sur le stand du Zoopôle de Ploufragan. Hall 9. Stand C65.



Nous serons au **Carrefour européen des Biotechnologies** les 15 et 16 octobre à **Lille**, en partenariat avec AES Laboratoire et notre partenaire taiwanais pour les puces ADN.

Nous présentons un travail sur la détection des leptospires réalisé avec l'Ecole vétérinaire de Nantes les 5 et 6 septembre au **Congrès de Bactériologie vétérinaire à Ploufragan (22)**.

### Publications et présentations orales :

Nous étions présents au 7<sup>e</sup> colloque international de paratuberculose où le Dr Bruno Chevallier a réalisé une présentation orale intitulée : Development of a PCR test to detect Mycobacterium paratuberculosis in bovine feces.

Publication dans World Poultry (Vol. 18, n 7, 38-39) d'un article de notre confrère Pierre-Yves Moalic de la société Labofarm sur l'utilisation en routine du kit Adiavet®MYCO AV permettant la détection de mycoplasmes aviaires.