

REPUBLIQUE ALGERINNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE – ALGER
المدرسة الوطنية للبيطرة- الجزائر

PROJET DE FIN D'ETUDES
EN VUE DE LOBTENTION
DU DIPLOME DE DOCTEUR VETERINAIRE

**DIAGNOSTIC DES BACTERIES
PATHOGENES PAR LES METHODES
GENETIQUES (Hybridation-PCR)-ETUDE
BIBLIOGRAPHIQUE**

Présenté par Melle. BENAKEZOUH Meriem

Soutenu le 23 juin 2007

Le jury :

Président : Mr GUEZLANE L
Promoteur : Mr BOUZIANE M
Examinatrice : Mme CHAHED A
Examinatrice : Mme BOUAKANE A

Professeur, Directeur de l'ENV.
Chargé de cours à l'ENV.
Chargée de cours à l'ENV.
Maître de conférences à l'ENV.

Année universitaire : 2006-2007

REMERCIEMENTS

Au terme de cette longue année de labeur, je ne saurais achever mon ouvrage sans présenter mes sincères remerciements à tous mes membres du jury :

- ❖ Mr. BOUZIANE, mon promoteur : vous m'avez fait découvrir et apprécier ce vaste domaine qu'est la microbiologie. Vous êtes à l'origine de ce travail, vous avez guidé mes recherches avec une disponibilité toujours entière. Je ne saurais assez vous exprimer ma reconnaissance et ma gratitude pour tout ce que vous avez fait pour moi.
- ❖ Mr. GUEZLANE, pour m'avoir fait l'honneur de présider mon jury.
- ❖ Mme. CHAHED : malgré un emploi du temps très chargé, vous n'avez pas hésité à me consacrer de précieux moments pour l'élaboration de mon travail. Il m'est agréable pour cela de vous exprimer mes sincères remerciements.
- ❖ Mme. BOUAKANE : vous avez répondu « présente » à mes appels. Vous avez su m'orienter et me donner des conseils judicieux, trouvez ici l'expression de mes vifs remerciements.

De nombreuses personnes ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail, en particulier :

Mlle. BENMAHDI : Je vous remercie pour l'aide précieuse que vous m'avez apportée, mais surtout pour votre bonne humeur et votre entrain qui m'ont permis de surmonter le stress et de retrouver le sourire.

Mr HAMDI : Merci pour nos nombreuses discussions qui m'ont éclairées sur mon sujet.

Mr. HARHOURA : Vous qui m'avez toujours témoigné de l'affection et de la gentillesse, je vous remercie et vous dédie ce travail.

DEDICACES

A mes parents,

Pour tout votre amour, votre soutien et votre stimulante fierté. Les mots sont faibles pour exprimer la force de mes sentiments et la reconnaissance que je vous porte. Je vous aime.

A ma grande sœur,

Ma meilleure amie, ma confidente.

A tous ceux que j'aime...

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	01
CHAPITRE I - RAPPELS.....	02
I. L'ADN BACTERIEN.....	02
I.1. Généralités.....	02
I.2. Structure.....	03
I.2.1. Les bases azotées.....	03
I.2.2. Le sucre.....	03
I.2.3. L'acide phosphorique.....	04
II. REPLICATION DE L'ADN BACTERIEN.....	05
II.1. Généralités.....	05
II.2. Les polymérase indispensables à la réplication.....	06
II.2.1. La polymérase I.....	06
II.2.1.1. Activité polymérase.....	06
II.2.1.2. Activités exonucléasiques.....	06
II.2.1.2.1. Activités exonucléasiques 3'—5'.....	06
II.2.1.2.2. Activités exonucléasiques 5'—3'.....	06
II.2.2. La polymérase III.....	06
II.2.3. Propriétés des polymérase.....	07
II.3. Caractéristiques de la réplication.....	07
II.3.1. La réplication est semi conservatrice.....	07
II.3.2. La réplication est séquentielle.....	08
II.3.3. La réplication à une origine et une terminaison.....	08
II.3.4. La réplication est bidirectionnelle.....	09
II.3.5. La réplication est simultanée sur les deux brins.....	09
II.3.6. La réplication est semi discontinue.....	09
II.4. Mécanismes de la réplication.....	10
II.4.1. Initiation de la réplication.....	10
II.4.2. Progression de la réplication.....	12
II.4.3. Hydrolyse et remplacement des amorces ARN.....	13
II.4.4. Terminaison de la réplication.....	13
III. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE L'ADN.....	14
III.1. La dénaturation.....	14
III.1.1. Calcul de la Tm.....	15
III.2. L'hybridation.....	16
IV. LES OUTILS ENZYMATIQUES UTILISES EN BIOLOGIE MOLECULAIRE.....	16
IV.1. Généralités.....	16
IV.2. Origine.....	16
IV.1.3. Séquences d'ADN reconnues par les enzymes de restriction.....	17
IV.1.4. Classe des enzymes de restriction.....	17
IV.1.5. Utilisation des enzymes de restriction.....	17

CHAPITRE II METHODES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE UTILISEES.....	18
I. L'HYBRIDATION MOLECULAIRE.....	18
I.1. Définition.....	18
I.2. Caractéristiques.....	18
I.3. Facteurs affectant l'hybridation moléculaire.....	20
I.4. Les sondes nucléotidiques.....	20
I.4.1. Définition.....	20
I.4.2. Caractéristiques générales.....	21
I.4.3. Marquage d'une sonde.....	21
I.5. Les puces à ADN.....	21
I.5.1. Généralités.....	21
I.5.2. Principe.....	21
II. L'AMPLIFICATION ENZYMATIQUE DES GENE (PCR).....	22
II.1. Historique.....	22
II.2. Principe.....	22
II.3. Présentation de la PCR.....	23
II.4. Ingrédients de la PCR.....	24
II.5. Etapes de la PCR.....	24
II.5.1. Dénaturation.....	25
II.5.2. Hybridation.....	26
II.5.3. Elongation.....	26
II.6. Produits de la PCR.....	27
II.7. Détection des produits d'amplification.....	30
II.8. Limites de la PCR.....	31
II.9. Variantes de la PCR.....	31
II.9.1. La reverse transcription PCR (RT-PCR).....	32
II.9.1.1. Principe.....	32
II.9.1.2. Difficultés techniques.....	32
II.9.2. La nested PCR ou PCR nichée.....	32
II.9.3. La PCR multiplexe.....	33
II.9.3.1. Principe.....	33
II.9.4. La PCR en temps réel.....	33
II.9.4.1. Principe.....	33
II.9.4.2. Technologies de détection.....	33
II.9.4.2.1. Le marquage non spécifique.....	34
II.9.4.2.1.1. Principe.....	34
II.9.4.2.1.2. Avantages.....	35
II.9.4.2.1.3. Limites.....	35
II.9.4.2.2. Le marquage spécifique.....	35
II.9.4.2.2.1. Sondes d'hydrolyse.....	35
II.9.4.2.2.1.1. Principe.....	36
II.9.4.2.2.1.2. Avantages.....	37
II.9.4.2.2.1.3. Limites.....	37
II.9.4.2.2.2. Sondes d'hybridation.....	37
II.9.4.2.2.2.1. Principe.....	37
II.9.4.2.2.2.2. Avantages.....	38
II.9.4.2.2.2.3. Limites.....	38

II.9.4.2.2.3. Balises moléculaires.....	38
II.9.4.2.2.3.1. Principe.....	39
II.9.4.2.2.3.2. Avantages.....	39
II.9.4.2.2.3.3. Limites.....	39
II.9.4.3. Analyse graphique des données.....	40
II.9.4.3.1. Notion du cycle seuil	40
II.9.4.4. Avantages de la PCR en temps réel.....	41
CHAPITRE III EXEMPLE DE BACTERIES PATHOGENES DIAGNOSTIQUEES PAR LES METHODES GENETIQUES.....	42
I. Organisation du laboratoire.....	43
II. Préparation des échantillons.....	44
II.1. Extraction du matériel génétique.....	44
III. DIAGNOSTIC DES SOUCHES D' <i>Escherichia coli</i> PRODUCTRICES DE SHIGATOXINES.....	44
III.1. Généralités.....	44
III.2. Détection des STEC.....	45
III.2.1.Principe.....	45
III.2.2. Interprétation des résultats.....	45
III.3. Recherche des facteurs de virulence.....	46
III.3.1. Le facteur d'attachement / effacement.....	46
III.3.2. L'entérohémolysine.....	46
IV. DIAGNOSTIC DE <i>Listeria monocytogenes</i>	47
IV.1. Généralités.....	47
IV.2. Processus d'infection cellulaire.....	47
IV.3. Facteurs de virulence.....	47
IV.3.1. L'internaline.....	48
IV.3.2. La lysteriolysine.....	48
IV.3.3. L'actine A.....	49
IV.3.4. La phospholipase C.....	49
IV.3.5. La P60.....	49
V. DIAGNOSTIC DE <i>Staphylococcus aureus</i>	50
V.1. Généralités.....	50
V.2. Les adhésines.....	50
V.3. Les toxines.....	50
V.3.1. Les enterotoxines.....	50
V.3.1.1. Caractérisation des gènes.....	51
V.3.1.2. La toxine du choc toxique.....	51
VI. DIAGNOSTIC DE <i>Clostridium perfringens</i>	51
VI.1. Généralités.....	51
VI.2. TIA à <i>C.perfringens</i> type A.....	52
VI.3. TIA à <i>C.perfringens</i> de type C.....	52
VI.4. Détection de <i>C.perfringens</i>	53

VI.4.1. Diagnostic des infections à <i>C.perfringens</i>	53
VI.4.2. Diagnostic en hygiène alimentaire.....	53
VII. DIAGNOSTIC DE <i>Chlamydia</i>	54
VII.1. Généralités.....	54
VII.2. Méthodes de détection.....	54
VII.2.1. Les gènes cibles.....	55
VII.2.1.1. Les gènes codant pour l'ARN ribosomal (ARNr).....	55
VII.2.1.2. Le gène ompA.....	56
VII.2.1.2.1. Détection	56
CONCLUSION.....	57

ABREVIATIONS

- A** : Adénine
- ADN** : Acide désoxyribonucléique
- ADNc** : Acide désoxyribonucléique complémentaire
- ARN** : Acide ribonucléique
- ARNr** : Acide ribonucléique ribosomal
- C** : Cytosine
- dATP** : désoxyribose adénosine triphosphate.
- dCTP** : désoxyribose cytidine triphosphate.
- dGTP** : désoxyribose guanosine triphosphate.
- dTTP** : désoxyribose thymidine triphosphate.
- E.coli** : *Escherichia coli*
- EHEC** : enterohémorragique *Escherichia coli*
- G** : Guanine
- LEE** : Locus d'effacement des entérocytes
- PCR** : Polymerase chain reaction
- RT-PCR** : La reverse transcription-PCR
- SHU** : Syndrome hémolytique et urémique
- Stx** : Shiga-like toxin
- SSB** : Single Stranded Binding
- STEC** : shigatoxin-producing *Escherichia coli*
- T** : Thymine
- TIA** : Toxi-infections alimentaires
- Tm** : Melting temperature
- VTEC** : verotoxin-producing *Escherichia coli*

Liste des figures

- Figure 1** : Photographie au microscope électronique de l'ADN de *Eschérichia coli*.
- Figure 2** : Schéma des bases azotées.
- Figure 3** : Schéma d'un nucléotide.
- Figure 4** : Schéma d'appariement des bases complémentaires.
- Figure 5** : Nature semi conservatrice de la réplication de l'ADN
- Figure 6** : Origine et terminaison de la réplication.
- Figure 7** : Progression bidirectionnelle de la réplication.
- Figure 8** : Schéma de la synthèse des fragments d'Okazaki.
- Figure 9** : Schéma du mode d'action de la topoisomérase I
- Figure 10** : Schéma du fonctionnement de la primase.
- Figure 11** : Schéma de la synthèse discontinue du brin retardé.
- Figure 12** : Photographie au microscope électronique d'un ADN en réplication
- Figure 13** : La température de fusion
- Figure 14** : Schéma de la notion d'hybridation.
- Figure 15** : Les effets de la température sur le phénomène d'hybridation.
- Figure 16** : Schéma de l'hybridation d'une sonde.
- Figure 17** : Schéma de l'amplification exponentielle de l'ADN.
- Figure 18** : Schéma d'un thermocycleur.
- Figure 19** : Variations des températures en fonction des étapes de l'amplification.
- Figure 20** : Schéma de la dénaturation de l'ADN.
- Figure 21** : Schéma de l'hybridation de l'ADN.
- Figure 22** : Schéma de l'élongation de l'ADN.
- Figure 23** : Augmentation du nombre de copies d'ADN et d'ADN cible en fonction du nombre de cycles.

Figure 24 : Augmentation du nombre de copies d'ADN et de copies « longues » en fonction du nombre de cycles.

Figure 25 : Schéma d'une électrophorèse en gel d'agarose.

Figure 26 : Le SYBR Green I.

Figure 27 : Les sondes d'hydrolyse.

Figure 28 : Les sondes d'hybridation.

Figure 29 : Les balises moléculaires.

Figure 30 : Modèle graphique de la PCR en temps réel.

Figure 31 : Localisation des gènes de virulence de *Listeria monocytogenes*.

Figure 32 : Organisation des gènes de l'ARNr chez les bactéries.

Figure 33 : Organisation du gène *ompA*.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Evolution du nombre de copies en fonction des cycles de PCR.

Tableau 2 : Exemple de bactéries diagnostiquées par les méthodes génétiques.

Tableau 3 : Organisation du laboratoire de biologie moléculaire.

Tableau 4 : Les toxinotypes majeurs de *C. perfringens*.

INTRODUCTION

Les méthodes d'identification des bactéries reposent sur la recherche des caractères phénotypiques tels que la forme, la taille, le comportement vis-à-vis des réactifs comme les colorants, la vitesse de multiplication et les propriétés biochimiques ; Dans certains cas elles doivent être poursuivies par la réalisation d'un sérotypage ou d'un lysotypage afin de déterminer leurs pouvoirs pathogènes car dans bien des cas, rien ne permet de distinguer entre une souche pathogène et une souche saprophyte ou commensale. Parfois, la culture des bactéries dans les milieux classiques, n'est pas possible ou est très lente. Ces méthodes de diagnostic nécessitent une durée de temps pouvant varier de trois jours à plus d'un mois selon les souches.

La rapidité du diagnostic bactériologique est fondamentale, elle permet de prendre des mesures immédiates et efficaces tant dans le domaine médical (traitement et prophylaxie) qu'en hygiène alimentaire (décision de commercialisation ou de destruction des denrées alimentaires).

La mise en évidence de gènes spécifiques des agents pathogènes, également présents dans les prélèvements, permet un gain de temps considérable pour les hygiénistes et les médecins.

Des méthodes moléculaires de diagnostic bactériologique ont été développées récemment et offrent des perspectives très vastes dans le domaine de la détection, de la caractérisation et de la quantification rapides et précises des pathogènes.

Dans ce travail bibliographique, nous avons d'abord rappelé les notions nécessaires à la compréhension de ces méthodes moléculaires puis nous avons décrit les principales techniques utilisées. Nous avons enfin, développé des exemples de pathogènes mis en évidence par ces méthodes, avec à chaque fois, la description des gènes considérés et des moyens pratiqués pour leurs détections.



CHAPITRE I

RAPPELS



I. L'ADN BACTERIEN

I.1. Généralités

L'acide désoxyribonucléique ou ADN constitue avant tout le support moléculaire de l'information génétique et de l'hérédité.

La cellule bactérienne, quoique ne possédant pas de noyau clairement délimité par une membrane renfermant le matériel de l'information génétique, présente une région dite nucléoïde (corps nucléaire, corps de chromatine ou région nucléaire) dans laquelle l'ADN, condensé, est replié sur lui-même. Cette zone nucléaire peut être sphérique ou allongée.

Le chromosome bactérien consiste en une longue molécule circulaire, à double filament, dans laquelle sont renfermées toutes les informations nécessaires à la formation de structures cellulaires et à l'accomplissement des fonctions vitales des bactéries (PRESCOTT.LM et al, 2003).



Figure 1 : Photographie au microscope électronique de l'ADN d'*Escherichia Coli* (BOURBONNAIS G, 2007).

I.2. Structure

Les molécules d'ADN sont les plus grosses molécules du monde vivant, elles se présentent sous la forme de deux brins séparés, enroulés l'un autour de l'autre en hélice, l'ADN est dit bicaténaire.

L'ADN est un polymère de bases désoxyribonucléiques, plus communément appelées nucléotides (HARTL DL et JONES EW, 2003).

Un nucléotide est formé (HURET JP., 2006) de:

I.2.1. une base azotée

C'est une molécule organique formée d'un ou de deux cycles où alternent des atomes de carbone et d'azote.

Les bases azotées des acides nucléiques appartiennent, selon le noyau aromatique qui en constitue le squelette à deux classes de molécules :

- ⇒ Le noyau pyrimidine ; c'est le plus simple, c'est un noyau aromatique constitué de quatre atomes, de carbone et deux d'azote.
- ⇒ Le noyau purine ; qui est lui constitué de deux noyaux hétérocycliques accolés, un de six atomes et l'autre de cinq atomes, ayant deux carbones en commun au milieu.

Les bases pyrimidiques, au nombre de deux également, sont la thymine et la cytosine.

Les bases puriques sont au nombre de deux : l'adénine et la guanine.

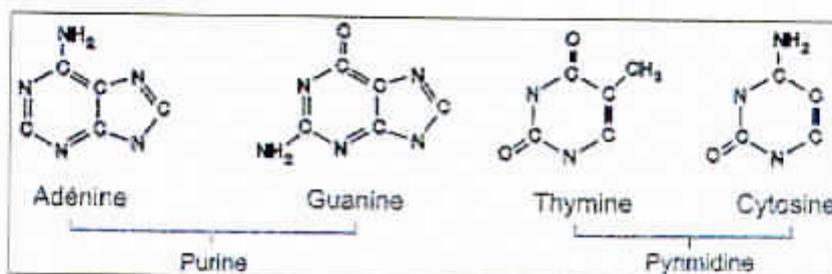


Figure 2 : Schéma des bases azotées

(BOURBONNAIS G, 2007).

I.2.2. Le sucre

C'est un pentose et pour la molécule d'ADN, il s'agit d'un désoxyribose.

1.2.3. L'acide phosphorique (H_3PO_4)

Cet acide donne le groupement phosphate.

La liaison d'une base avec un sucre donne naissance à une molécule dite nucléoside.

La liaison d'un nucléoside avec un phosphate donne naissance à un nucléotide.

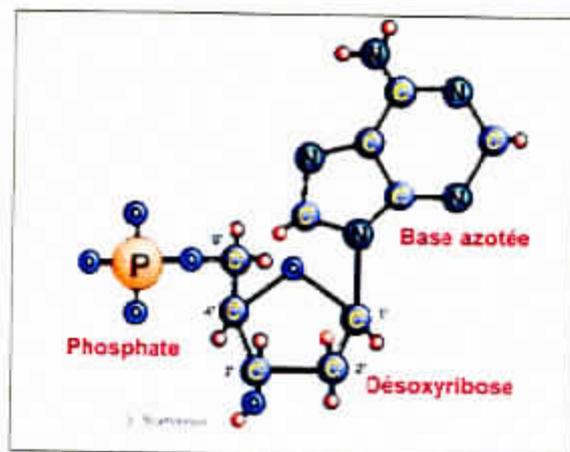


Figure 3 : Schéma d'un nucléotide
(BOURBONNAIS G, 2007)

Il existe donc quatre sortes de nucléotides (dATP, dTTP, dCTP et dGTP) pouvant se lier les uns aux autres par leur sucre et leur groupement phosphate.

La molécule d'ADN est formée de deux chaînes qui se font face et qui sont enroulées en double hélice dont les deux brins sont (BERNOT. A, 2001) :

- ⇒ Antiparallèles : l'un est constitué d'un enchaînement commençant à gauche et se poursuivant vers la droite, l'autre commençant à droite et se poursuivant vers la gauche.
- ⇒ Complémentaires : chaque brin est formé d'une chaîne de nucléotides reliés par des liaisons covalentes (solides) et les deux brins sont liés par des liaisons de type hydrogène (fragiles) qui unissent les bases azotées deux à deux : l'adénine (A) se lie toujours à la thymine (T) par deux liaisons hydrogènes et la guanine (G) se lie toujours à la cytosine (C) par trois liaisons hydrogènes et cela quel que soit l'être vivant considéré, de la bactérie à l'éléphant.

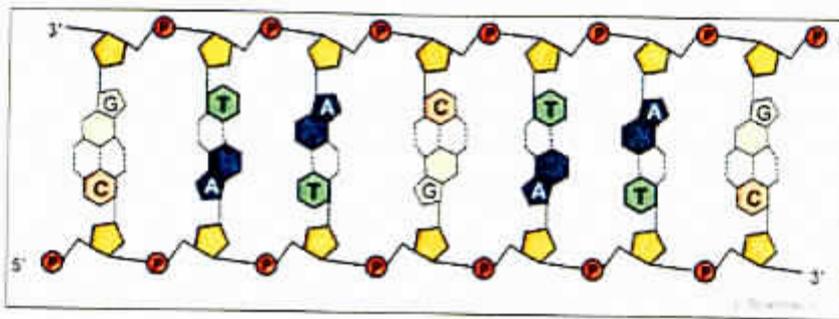


Figure 4 : schéma d'appariement des bases complémentaires
(BOURBONNAIS G, 2007).

Une conséquence de cette règle d'appariement des bases est que la séquence des bases d'un brin définit la séquence des bases de l'autre brin.

II. REPLICATION DE L'ADN BACTERIEN

II.1. Généralités

La réplication de l'ADN est un processus fondamental et complexe dont dépend toute vie. Elle se définit comme la synthèse de l'ADN, qui reproduit exactement le génome d'une cellule au cours du cycle cellulaire, afin de préparer la division de la cellule en deux cellules filles (GRIFFITHS AJF et al, 2001).

L'ADN bactérien constitue un réplicon, c'est-à-dire une unité de réplication, car la molécule est répliquée dans sa totalité (PRESCOTT.LM et al, 2003).

La réplication d'une molécule d'ADN n'est possible (FRANCINA. A, 2002-2003) qu'en présence des éléments suivants :

- les quatre nucléotides entrant dans la composition de l'ADN (dATP, dTTP, dCTP et dGTP) ;
- des ADN polymérases ainsi que d'autres enzymes (voir mécanisme de la réplication) ;
- certains ions (Mg^{2+} , ce cation est indispensable à la réplication de l'ADN).

II.2. Les polymérase indispensable à la réplication

Une ADN polymérase est un complexe enzymatique intervenant dans la réplication de l'ADN, mais aussi dans les processus de réparation et de recombinaison de l'ADN.

Il existe de nombreuses familles de polymérase qui diffèrent selon leurs séquences en acides aminés et leurs propriétés catalytiques (ANONYME, 2007a).

II.2.1. La polymérase I

C'est un polypeptide aux activités multiples.

II.2.1.1. Activité polymérase

La polymérisation s'effectue toujours dans le sens 5'--3' et participe au comblement des espaces entre les fragments d'Okazaki, lors de la réplication de l'ADN (voir synthèse du brin retardé).

II.2.1.2. Activités exonucléasiques

II.2.1.2.1. Activité exonucléasique 3'--5'

L'enzyme est capable de vérifier le dernier nucléotide mis en place. En présence d'un défaut d'appariement, elle enlève ce dernier nucléotide (propriété exonucléasique 3' 5') et insère le nucléotide correct (propriété polymérasique).

Ce mécanisme capital est appelé *fonction d'édition des ADN polymérase* et permet donc la correction d'erreurs au cours de la réplication.

II.2.1.2.2. Activité exonucléasique 5'--3'

C'est une fonction de réparation de l'ADN.

II.2.2. La polymérase III

C'est la principale polymérase bactérienne qui intervient dans l'élongation des brins d'ADN.

Elle permet la constitution de la chaîne polynucléotidique par ajout de nucléotides à l'extrémité 3'OH libre.

Elle a également une activité exonucléase 3'--5' (HARTL.DL et JONES. EW, 2003).

II.2.3. Propriétés des polymérases

Les ADN polymérases possèdent en commun les propriétés suivantes :

Elles ont besoin pour fonctionner d'un ADN modèle (matrice) qu'elles pourront recopier ainsi qu'une amorce de nature oligonucleotidique (ADN ou ARN); celle-ci, complémentaire du début de la matrice, sert au démarrage de l'activité de l'ADN polymérase.

Il a été démontré in vitro, que la polymérisation ne s'opère que dans le sens 5'3', sens de la progression de la réplication. Les ADN polymérases ne fonctionnent que dans ce sens et sont incapables de polymériser l'ADN dans un autre sens (CALVET.C, 2007).

II.3. Caractéristiques de la réplication

La réplication de l'ADN présente les caractéristiques suivantes :

II.3.1. La réplication est semi conservatrice

Cette notion, mise en évidence par Meselson et Stahl en 1958, signifie que chaque molécule d'ADN est formée d'un brin d'ADN parental et d'un brin néoformé.

A chaque réplication, les deux brins de l'ADN parental se séparent et chacun de ces deux brins sert de matrice pour la synthèse d'un brin complémentaire (GRIFFITHS.AJF et al. ,2001).

II.3.4. La réplication est bidirectionnelle

A partir du point d'origine (point d'initiation, œil de réplication) la réplication progresse dans les deux sens.

Le complexe de protéines qui se déplace le long de l'ADN pour catalyser la réplication est appelé replisome (GRIFFITHS.AJF et al. ,2001).



Figure 7 : Progression bidirectionnelle de la réplication
(ANONYME, 2007b).

II.3.5. La réplication est simultanée sur les deux brins

La réplication ne se fait pas d'abord sur un brin, puis sur l'autre ; la progression des enzymes s'effectue de façon concomitante sur les deux brins (ALBERTS.B et al, 2004).

II.3.6. La réplication est semi discontinue

La progression de la réplication se faisant uniquement dans le sens 5' 3', celle-ci ne sera pas identique sur les deux brins.

En effet, sur l'un des brins, la réplication s'effectue de manière continue : on parle de brin avancé, brin sens ou « leading stand ».

Sur l'autre brin, la réplication se fait de manière discontinue et aboutit à la synthèse de petits fragments d'une longueur variant de 1000 à 2000 nucléotides, appelés fragments d'Okazaki : on parle de brin retardé, brin anti sens ou « lagging stand » (HARTL.DL et JONES.EW, 2003).

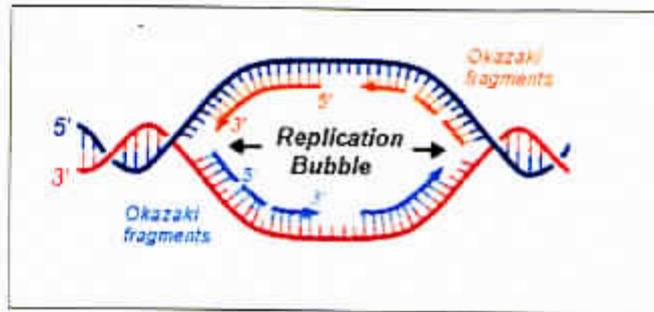


Figure 8 : schéma de la synthèse des fragments d'Okazaki
(BOURBONNAIS.G, 2007)

II.4. Mécanismes de la réplication

II.4.1. Initiation de la réplication

Pour que l'ADN puisse se répliquer, il faut que les deux brins soient séparés.

L'ouverture de l'ADN se fait grâce à une protéine de reconnaissance de la séquence d'origine ou protéine d'initiation de la réplication appelée *dna A*. Cette dernière se lie à l'*oriC*, avec hydrolyse de l'ATP, ce qui amorce le relâchement de la double hélice au site d'initiation.

Cette étape est indispensable à la transformation localisée de l'ADN double brin en ADN simple brin.

Ce processus se poursuit sous l'action d'autres protéines, dites *dnaB* ou hélicases, qui catalysent l'ouverture de la double hélice d'ADN ce qui définira la future fourche de réplication.

Ces enzymes utilisent l'énergie de l'ATP pour défaire de petites portions de l'hélice, juste devant la fourche de réplication.

Ce déroulement se fait très rapidement (la fourche peut effectuer des rotations de 75 à 100 révolutions par seconde) et peut produire des tensions et la formation de surenroulements. Des enzymes appelées topoisomérases (ADN gyrase chez *E.coli*) libèrent les tensions produites et facilitent le déroulement (PRESCOTT.LM et al, 2003).

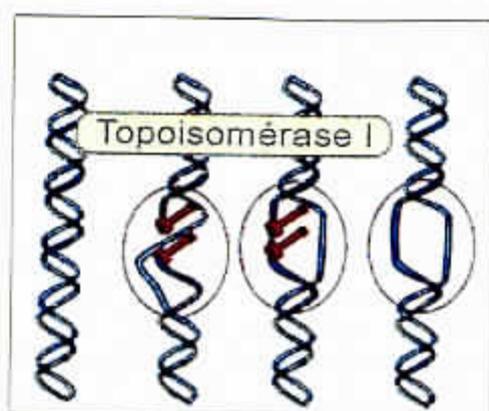


Figure 9 : Schéma du mode d'action de la topoisomérase I
(HERON.JF, 2001)

Séparés, les brins sont maintenus à l'état monocaténaire grâce à des protéines se liant à l'ADN simple brin, les SSB (Single Stranded Binding), qui empêchent les deux brins d'ADN de se réappairier dans l'hélice.

Une fois l'ADN dans de bonnes conditions topologiques, la réplication est possible.

Une ARN polymérase particulière, dite primase (ou protéine dnaG), se lie à des protéines accessoires pour former un complexe, appelé primosome, à l'origine de la synthèse d'une courte amorce d'ARN, complémentaire de l'ADN, généralement longue d'environ 10 nucléotides.

Il est à noter que, contrairement à l'ADN polymérase dont l'action polymérique n'est possible qu'en présence d'une amorce, l'ARN polymérase peut démarrer la synthèse sans amorce.

L'ADN polymérase III s'insère au niveau de la fourche de réplication et ne fait ensuite qu'allonger cette amorce d'ARN, par addition de nucléotides à son extrémité 3'OH libre, afin de synthétiser le brin complémentaire du brin parental (WATSON et al, 1989).

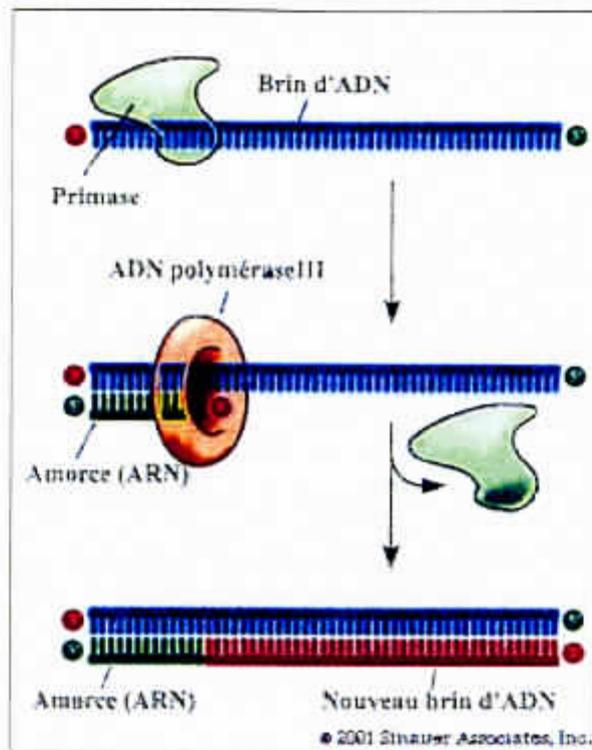


Figure 10 : Schéma du fonctionnement de la primase (BOURBONNAIS.G, 2007).

II.4.2. Progression de la réplication

La polymérisation ne s'opère que dans le sens 5'--3'.

Comme les deux brins de l'ADN sont antiparallèles, le brin avancé (principal), s'allonge de façon continue dans le sens 5'--3'. L'autre brin, le brin retardé (secondaire), se forme de façon discontinue par de petits fragments d'ADN, appelés fragments d'Okazaki, dont la synthèse est à chaque fois amorcée dans le sens 5'--3', une fois que la progression de la fourche de réplication est suffisante pour le permettre, cette contrainte expliquant le retard.

Le brin avancé n'est amorcé qu'une seule fois, au début de la réplication, alors que le brin retardé est amorcé au début de chaque fragment d'Okazaki (LODISH.H et al, 2000).

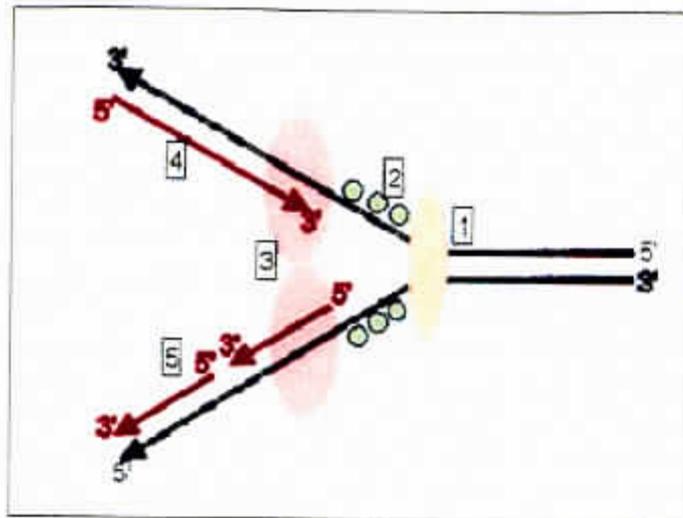


Figure 11 : Schéma de la synthèse discontinu du brin retardé (HERON.JF, 2001).

Légende :

1 : hélicase, 2 : SSB ; 3 : ADN polymérase III ; 4 : brin avancé ; 5 : fragments d'Okazaki.

II.4.3. Hydrolyse et remplacement des amorces ARN

Dès que la plus grande partie du brin retardé a été répliquée par la formation des fragments d'Okazaki, l'ADN polymérase I retire les amorces d'ARN, grâce à sa fonction exonucléasique 5'--3' et synthétise de l'ADN complémentaire pour remplir la brèche formée par l'élimination de l'ARN.

Finalement, les fragments se lient les uns aux autres, grâce à l'ADN-ligase, enzyme qui forme un lien phosphodiester entre deux fragments (HARTL.DL et JONES.EW, 2003).

II.4.4. Terminaison de la réplication

Le processus de la réplication s'achève lorsque le complexe de la polymérase atteint un site de terminaison.

Une protéine spécifique dite Tus peut se lier au site ter, entraînant ainsi l'arrêt de l'activité de l'hélicase (LODISH.H et al, 2000).



Figure 12 : Photographie au microscope électronique d'un ADN en réplication (LODISH.H et al, 1995).

III. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE L'ADN

Les propriétés de cette molécule sont la conséquence de sa structure en double hélice de deux brins de séquences complémentaires.

III.1. La dénaturation

Elle correspond à la séparation complète des deux brins d'ADN qui résulte de la rupture des liaisons hydrogènes les unissant, conséquence de la sensibilité de la molécule à la température et aux pH extrêmes.

La séparation des deux brins est appelée fusion ; on parle alors de température de fusion ou T_m (melting temperature), qui correspond à la température à laquelle la moitié de l'ADN est sous forme monobrin et l'autre moitié sous forme double brin.

Cette température peut varier en fonction de nombreux paramètres tels que le nombre de liaisons hydrogènes, la composition du milieu ou encore la présence de mis appariements (LODISH.H et al, 2000).

La dénaturation de l'ADN s'accompagne de modifications physico-chimiques telles l'augmentation de l'absorption dans l'ultra violet, la diminution de la viscosité et l'augmentation de la densité optique.

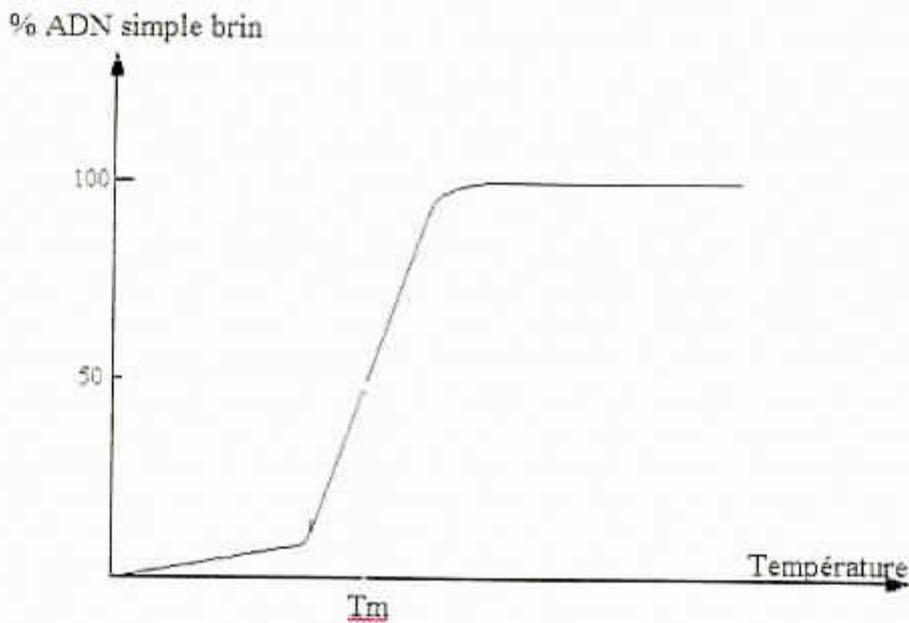


Figure 13 : La température de fusion (GRIFFITHS,AJF et al, 2002)

III.1.1. Calcul de la T_m

Il est possible de calculer directement la température de fusion d'un ADN double brin, en mesurant l'augmentation de l'absorbance de la solution en fonction de la température.

Toutefois, on se contente la plupart du temps d'une estimation à partir de la composition de l'oligonucléotide. (MORNET.E, 2007)

Si la séquence a une longueur inférieure ou égale à 20 nucléotides :

$$T_m = (A+T) 2 + (C+G) 4. \quad \text{Formule 1}$$

Si la séquence a une longueur supérieure à 20 nucléotides :

$$T_m = [(A+T) 2 + (C+G) 4] (1 + [(N-20)/20]). \quad \text{Formule 2}$$

Avec :

N : nombre de nucléotides.

T_m : exprimée en °C.

En raison de la stricte complémentarité des bases, la dénaturation est un phénomène réversible et c'est la seconde propriété de l'ADN.

III.2. L'hybridation

Les deux brins d'ADN dénaturé, peuvent, dans des conditions appropriées de température, rétablir des liaisons hydrogènes entre leurs bases et reprendre la configuration en double hélice d'origine.

Ce phénomène ne dépend que de la complémentarité de deux séquences nucléotidiques et non de l'origine de chaque brin (LODISH.H et al, 2000).

IV. LES OUTILS ENZYMATIQUES UTILISES EN BIOLOGIE MOLECULAIRE

De nombreux outils enzymatiques sont utilisés en biologie moléculaire ; cette partie ne portera que sur les enzymes qui coupent l'ADN ou enzymes de restrictions. Les autres complexes enzymatiques seront développés dans le chapitre suivant (voir réplication de l'ADN).

IV.1. Généralités

Les enzymes de restriction sont des outils utilisés au laboratoire pour cliver l'ADN. La coupure se fait, en un site particulier par l'enzyme, qui reconnaît une séquence d'ADN qui lui est spécifique.

Les enzymes de restriction appartiennent à la classe des endonucléases, c'est-à-dire des enzymes capables de cliver des liaisons phosphodiester entre deux nucléotides à l'intérieur d'un acide nucléique (HARTL.DL et JONES.EW, 2003).

IV.2. Origine

Les enzymes de restriction sont extraites des micro-organismes, le plus souvent des bactéries. Les bactéries peuvent être parasitées par des virus à ADN, elles fabriquent donc des enzymes de restriction qui sont capables de cliver les ADN étrangers.

Pour éviter une auto destruction de leur ADN, elles se protègent contre leurs propres enzymes de restriction en modifiant les sites de restriction correspondants (GRIFFITHS.AJF et al. ,2001).

IV.3. Séquences d'ADN reconnues par les enzymes de restriction

Les séquences de nucléotides reconnues par les enzymes sont habituellement des séquences dites palindromiques.

Une séquence palindromique est une séquence ou la succession des nucléotides lue dans le sens 5'--3' pour le premier brin est identique à la séquence lue dans le sens 5'--3' pour le second brin. Ces séquences sont le plus souvent constituées de quatre à six paires de bases (GRIFFITHS.AJF et al. ,2001).

IV.4. Classes des enzymes de restriction

Selon la relation spatiale entre la séquence reconnue et le lieu de coupure, il est possible de distinguer (FRANCINA.A, 2003) trois types d'enzymes de restriction :

- ⇒ les enzymes de type II présentent un site de reconnaissance et un site de coupure identique ou proche de celui-ci. Ce sont les plus utilisés au laboratoire.
- ⇒ Les enzymes de type I reconnaissent des séquences sur l'ADN sans aucune symétrie et coupent non pas au niveau de la séquence de reconnaissance mais 1000 à 5000 paires de bases plus loin.
- ⇒ Les enzymes de type III présentent aussi un site de reconnaissance mais coupent une vingtaine de nucléotides plus loin.

IV.1.5. Utilisations des enzymes de restriction

Les utilisations (FRANCINA.A, 2003) sont nombreuses en biologie moléculaire :

- la formation d'un ADN recombinant (ADNr) ;
- la fabrication des sondes nucléiques (voir hybridation moléculaire) ;
- la coupure de l'ADN en multiples fragments avant séparation par électrophorèse ;
- la préparation d'un fragment d'ADN destiné à être inséré dans un vecteur comme un plasmide.



CHAPITRE II

METHODES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE UTILISEES



I. L'HYBRIDATION MOLECULAIRE

I.1. Définition

L'hybridation moléculaire désigne l'association qui peut avoir lieu entre deux acides nucléiques simples brins de séquences complémentaires et qui conduit à la formation d'un double brin ou duplex.

Cette association s'effectue par l'établissement de liaisons hydrogènes spécifiques : deux liaisons hydrogènes entre l'adénine (A) et la thymine (T) (ou l'uracile (U) pour l'ARN) et trois liaisons entre la cytosine (C) et la guanine (G) (FREIFELDER.D, 1990).

I.2. Caractéristiques

L'hybridation moléculaire est (ALBERTS.D et al, 2005) :

- ⇒ spécifique : sous certaines conditions expérimentales de température, de PH et de forces ioniques (stringence), une séquence d'ADN monobrin ne peut s'apparier qu'à la séquence qui lui est complémentaire ;
- ⇒ réversible : l'hybridation de deux brins d'une molécule d'ADN peut être réalisée ou au contraire supprimée, en jouant sur les conditions expérimentales (essentiellement la température).

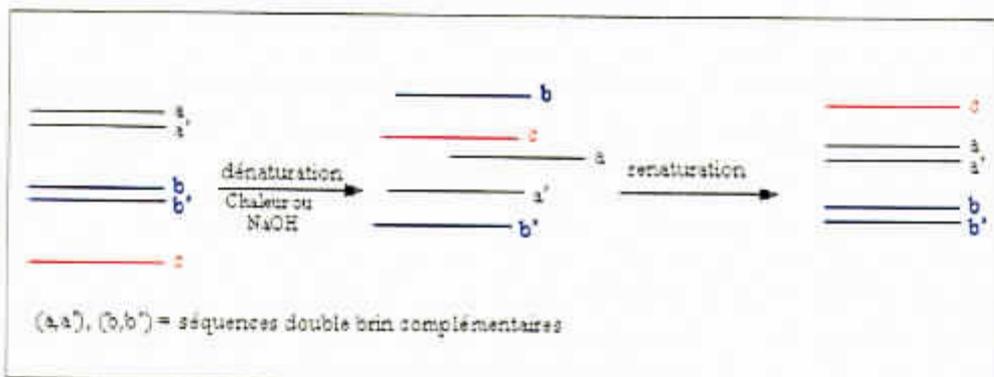


Figure 14 : Schéma de la notion d'hybridation
(ANONYME, 2005)

I. L'HYBRIDATION MOLECULAIRE

I.1. Définition

L'hybridation moléculaire désigne l'association qui peut avoir lieu entre deux acides nucléiques simples brins de séquences complémentaires et qui conduit à la formation d'un double brin ou duplex.

Cette association s'effectue par l'établissement de liaisons hydrogènes spécifiques : deux liaisons hydrogènes entre l'adénine (A) et la thymine (T) (ou l'uracile (U) pour l'ARN) et trois liaisons entre la cytosine (C) et la guanine (G) (FREIFELDER.D, 1990).

I.2. Caractéristiques

L'hybridation moléculaire est (ALBERTS.D et al, 2005) :

- ⇒ spécifique : sous certaines conditions expérimentales de température, de PH et de forces ioniques (stringence), une séquence d'ADN monobrin ne peut s'apparier qu'à la séquence qui lui est complémentaire ;
- ⇒ réversible : l'hybridation de deux brins d'une molécule d'ADN peut être réalisée ou au contraire supprimée, en jouant sur les conditions expérimentales (essentiellement la température).

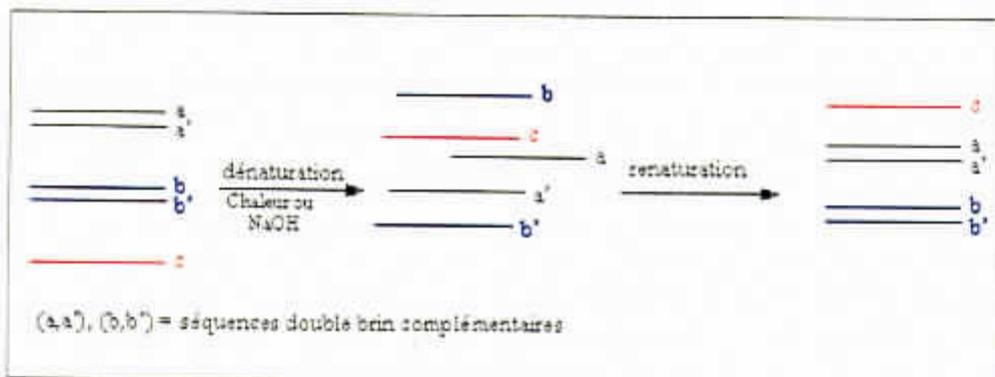


Figure 14 : Schéma de la notion d'hybridation
(ANONYME, 2005)

Le paramètre déterminant dans la spécificité et la réversibilité de l'hybridation moléculaire est la température de fusion. Expérimentalement il a été démontré que (MORNET.E, 2007) :

- Si la température du milieu réactionnel est supérieure à T_m , l'hybridation ne se produit pas et les deux brins restent à l'état monocaténaire.
- Si la température du milieu réactionnel est égale à la T_m (en pratique légèrement inférieure) il y aura hybridation spécifique.
- Si la température du milieu réactionnel est très inférieure à la T_m , il y aura hybridation sur la séquence complémentaire mais aussi hybridation non spécifique.

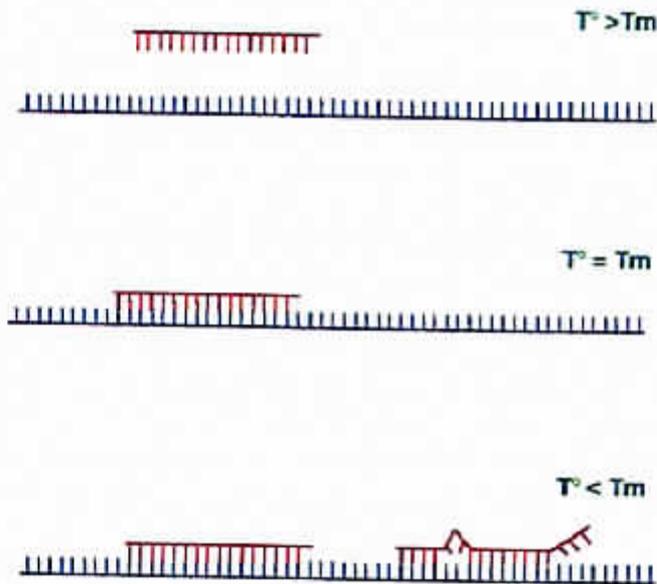


Figure 15 : Effets de la température sur le phénomène d'hybridation (MORNET.E, 2007).

I.3. Facteurs affectant l'hybridation moléculaire

La formation et la stabilité des duplex dépendent de nombreux facteurs tels que le temps de la réaction, la concentration en acides nucléiques et leur composition en bases, la longueur des fragments, la température du milieu réactionnel ainsi que sa vitesse de refroidissement et la nature du milieu (FRANCINA.A, 2003).

L'hybridation est une propriété de l'ADN très exploitée dans de nombreuses applications en biologie .Elle représente un outil puissant dans la reconnaissance de séquences précises, appelées cibles, à l'aide de petits fragments nucléotidiques de séquence connue appelés sondes.

I.4. Les sondes nucléotidiques

I.4.1. Définition

Une sonde nucléotidique est un segment de nucléotides connu qui permet de rechercher de manière spécifique un fragment d'acide nucléique que l'on désire étudier.

Cette réaction sonde - fragment correspond à une réaction d'hybridation moléculaire (LARPENT.JP, 1997).

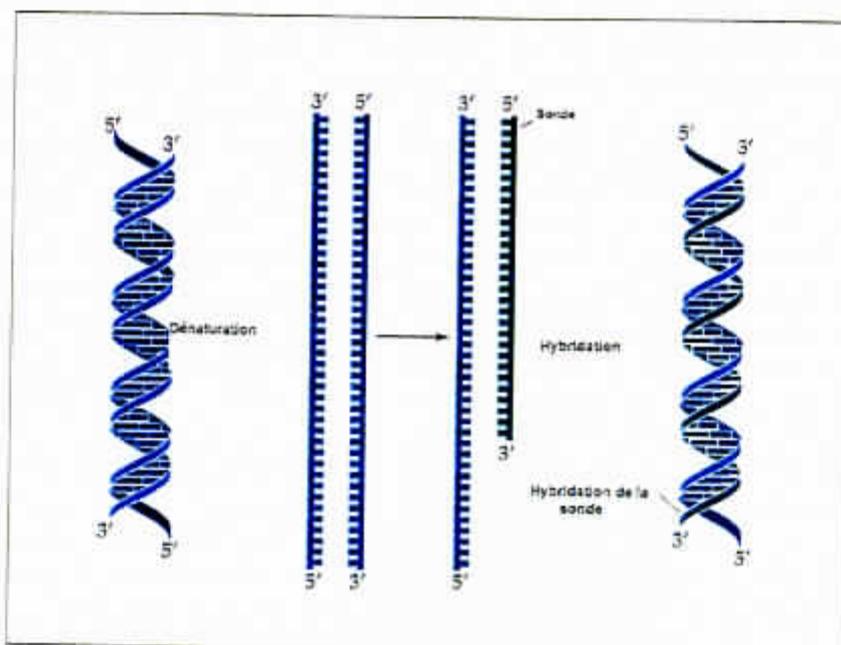


Figure 16 : Schéma de l'hybridation d'une sonde

(FREEMAN.WH, 2004).

I.4.2. Caractéristiques générales

Une sonde peut être une séquence d'ADN, ou d'ARN mais obligatoirement monobrin.

Sa taille est très variable : de 20 à 30 nucléotides ou à l'opposé de plusieurs centaines de nucléotides. La sonde est complémentaire et antiparallèle du fragment recherché.

Dans le mélange complexe où s'effectue l'hybridation moléculaire, la sonde doit être facilement repérable, cela est rendu possible grâce aux techniques de marquage.

Le mode de révélation de l'hybride variera en fonction de la nature du marquage (PRESCOTT.LM et al, 2003).

I.4.3. Marquage d'une sonde

Le marquage des sondes est réalisé soit avec des agents radioactifs (radio isotopes) tels que le phosphore ^{32}P , le soufre ^{35}S ou l'hydrogène ^3H et on parlera de marquage chaud ou sondes radioactives, soit avec des agents non radioactifs tels que le marquage enzymatique, la fluorescence ou la chimioluminescence et on parlera de marquage froid ou sondes froides (LARPENT.JP, 1997).

I.5. Les puces à ADN

I.5.1. Généralités

Les puces à ADN constituent un exemple typique de l'utilisation de l'hybridation moléculaire. Il y a hybridation entre une rangée de sondes oligonucléotidiques positionnées en des endroits précis sur une surface plane, en général très petite (moins de 1cm^2), et un échantillon contenant les acides nucléiques à analyser (LACOURREGÉ.G, 2006).

L'intérêt de l'utilisation des puces dans le domaine du génotypage et du diagnostic repose essentiellement sur la possibilité d'analyser en même temps un grand nombre de séquences et de détecter, en une seule étape, de nombreux microorganismes, ainsi que leurs facteurs de virulence par exemple (ANONYME, 2006a).

I.5.2. Principe

Des oligonucléotides monobrins de séquences connues (sondes) sont immobilisés sur un support comme le verre, le silicium ou encore des polymères (polypropylène ou nylon).

Les lieux de dépôt de l'ADN sur le support solide sont appelés spot.

Les acides nucléiques que l'on souhaite analyser et qui constituent la cible sont marqués, puis mis en présence des sondes et incubés à une température permettant l'appariement des bases, si celles-ci sont complémentaires.

Après une étape de lavage, permettant d'éliminer les cibles non hybridées, une analyse de la surface de la puce permet le repérage des hybridations effectives grâce aux marqueurs étiquetant la cible. L'intensité du signal émis est proportionnelle à la concentration de la cible, à condition qu'il y ait un excès de sondes par rapport à la cible.

Il résulte de cette analyse une empreinte d'hybridation qui, par un traitement informatique adéquat, permettra d'accéder à des informations complètes (DEVILARD.E, 2002).

II. L'AMPLIFICATION ENZYMATIQUE DES GENES (PCR)

Amplifier de l'ADN *in vitro*, en tirant parti de son mode normal de synthèse, est aujourd'hui le principe du fonctionnement de la PCR (Polymerase Chain Reaction) ou réaction de polymérisation en chaîne.

II.1. Historique

Cette méthode de biologie moléculaire a été mise au point en 1985, par Kary Mullis, qui obtint pour ses travaux le prix Nobel de chimie en 1993. Aujourd'hui, ce procédé révolutionnaire couplé à l'utilisation d'une ADN polymérase thermorésistante, permet d'obtenir sans clonage, à partir d'un échantillon complexe et peu abondant, d'importantes quantités identiques d'un fragment d'ADN. L'ordre de grandeur à retenir est celui du million de copies en quelques heures. C'est généralement suffisant pour une utilisation ultérieure (BORDE.I, 2006).

II.2. Principe

Il s'agit de réaliser une succession de réactions de répllication d'une matrice double brin d'ADN. Chaque réaction met en œuvre deux amorces oligonucléotidiques dont les extrémités 3' pointent

l'une vers l'autre. Les amorces, ou « primers » en anglais, définissent alors en la bornant, la séquence à amplifier.

L'astuce consiste à utiliser les produits de chaque étape de synthèse comme matrices pour les étapes suivantes, au lieu de les séparer, afin de ne réutiliser que la matrice originale. L'amplification obtenue sera exponentielle (LEFEVRE.PC et al, 2003) au lieu d'être linéaire.

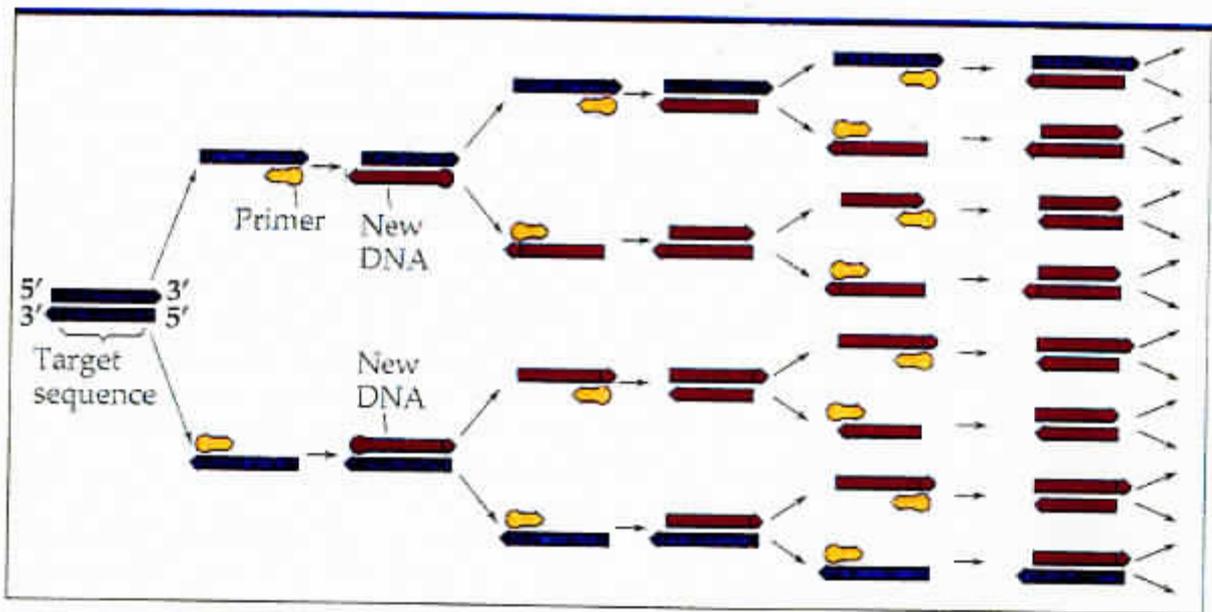


Figure 17 : Schéma de l'amplification exponentielle de l'ADN
(SUAU-PERNET.A et MAGNE.F, 20007)

Le nombre de copies est doublé à chaque cycle et à la fin de la réaction il est égale à 2^n (avec n = nombre de cycles).

II.3. Présentation de la PCR

Une PCR classique se déroule dans un petit tube, lui-même placé dans un appareil programmable appelé thermocycleur. Ce dernier se contente de placer le tube aux températures voulues pendant les durées programmées et de recommencer en effectuant des cycles.

Un cycle reproduit trois températures différentes pendant des durées différentes. La durée d'un cycle est de l'ordre de quelques minutes.



Figure 18 : Schéma d'un thermocycleur
(ANONYME, 2006d)

II.4. Ingrédients de la PCR (MORNET.E, 2007)

Avant la réaction, tous les matériaux nécessaires à la PCR sont introduits dans le même tube ; il s'agit de :

- l'ADN à amplifier ;
- les amorces spécifiques du segment d'ADN à étudier ;
- une ADN polymérase thermostable, la plus connue étant la Taq polymérase qui est extraite d'une bactérie *Thermus aquaticus* vivant dans des milieux à températures élevées, comme les sources hydrothermales des fonds marins ;
- un mélange des nucléotides constitutifs de l'ADN ;
- des tampons, il s'agit du $MgCl_2$ et une solution donnant au milieu réactionnel un PH et une concentration saline optimale pour le fonctionnement de l'enzyme.

Tous sont rajoutés en large excès par rapport à l'ADN.

II.5. Les étapes de la PCR

Chaque cycle de PCR est constitué de trois phases différentes à des températures différentes.

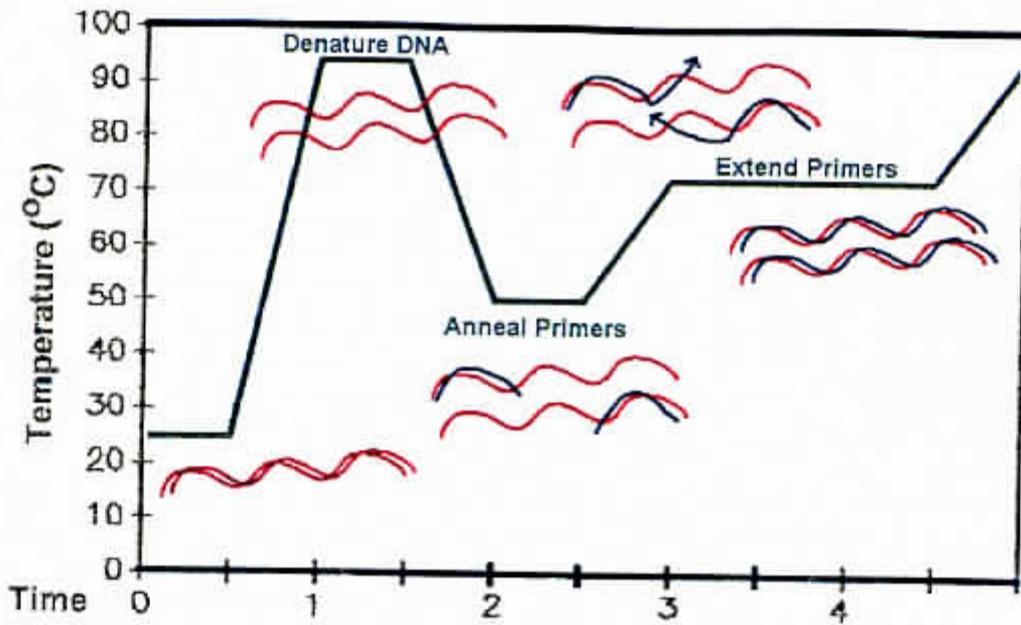


Figure 19 : Variations des températures en fonction des étapes d'amplification (SUAU-PERNET.A et MAGNE.F, 2007).

II.5.1. La dénaturation

Première étape d'un cycle de PCR, la dénaturation est réalisée à environ 94°C. A cette température, les liaisons faibles qui assuraient la cohésion de la double hélice d'ADN sont rompues pour donner deux simples brins d'ADN (PRESCOTT et al, 2003), (STIEGLER.V, 2003).

Il y a lieu de préciser que le fait de rabaisser la température à son niveau initial permet à l'ADN de retrouver sa structure bicaténaire.

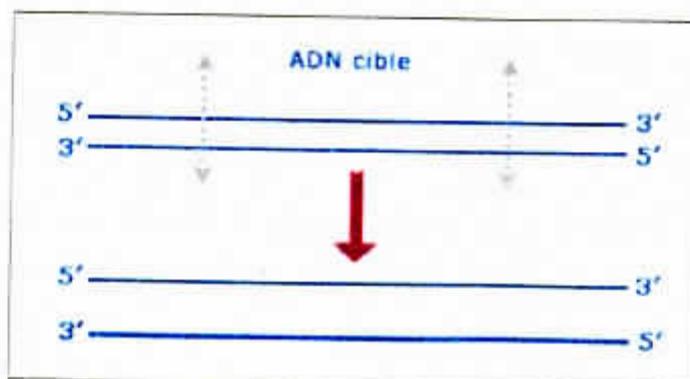


Figure 20 : Schéma de la dénaturation de l'ADN (ANONYME, 2006b)

II.5.2. L'hybridation ou anelage

L'hybridation des amorces sur l'ADN repose sur le principe de l'appariement des bases complémentaires.

Le choix de la température d'hybridation résulte d'un compromis entre plusieurs paramètres. Elle est fonction de la longueur et de la séquence des amorces et varie le plus souvent entre 40-65°C. Cette température d'hybridation est, de toutes les façons, inférieure à la température de dénaturation (PRESCOTT.LM et al, 2003), (STIEGLER.V, 2003). C'est elle qui va déterminer la stabilité des hybrides une fois que l'appariement amorces/matrice est réalisé.

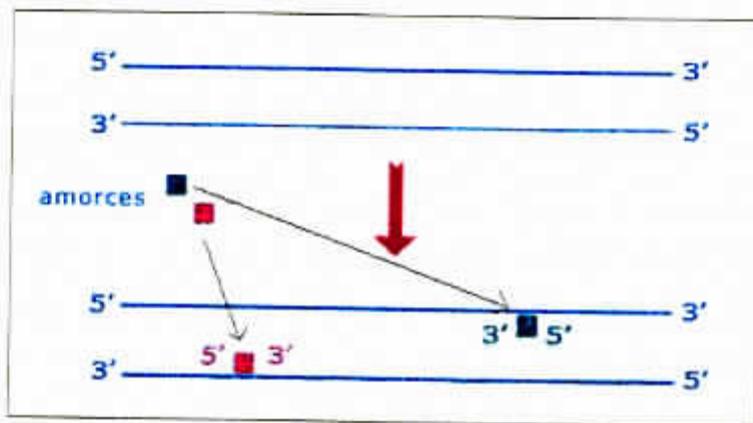


Figure 21 : Schéma de l'hybridation de l'ADN
(ANONYME, 2006b)

II.5.3. L'élongation ou extension des amorces

L'étape d'élongation est réalisée à une température de 72°C, qui correspond à la température d'activité de l'ADN polymérase thermorésistante utilisée.

Les amorces hybridées à l'ADN servent de point de départ à la polymérisation du brin d'ADN complémentaire de l'ADN matrice (PRESCOTT et al, 2003).

La polymérisation se fait par ajout successif des désoxyribonucléotides, présents dans le mélange en large excès. Chaque base ajoutée est complémentaire de la base correspondante du brin matrice (STIEGLER.V, 2003).

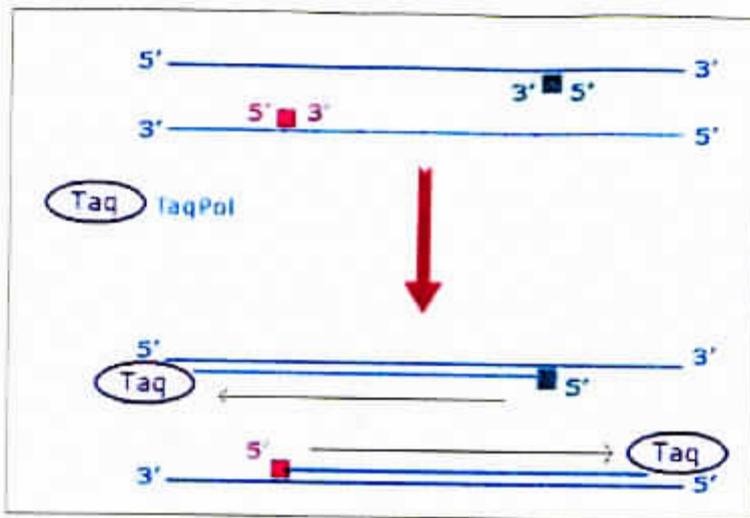


Figure 22 : Schéma de l'élongation de l'ADN
(ANONYME, 2006b)

II.6. Produits de la PCR

La polymérisation ne s'arrête pas lorsque la copie est de longueur souhaitée. L'extension des amorces, à partir de l'ADN initialement présent dans le tube, produit des brins d'ADN d'une longueur indéterminée, souvent appelés « brins longs ».

Il apparaît aussi que les brins polymérisés sur le modèle des brins synthétisés au cycle précédent ont une longueur qui est égale à la distance entre les deux amorces sur le brin d'ADN original ; il s'agit donc des brins de longueur souhaitée, ou brins cibles, encore appelés « brins courts ».

Les brins longs s'accumulent de façon linéaire car ils sont générés à partir de l'extension des amorces sur l'ADN initial, leur quantité finale sera directement proportionnelle au nombre de cycles réalisés. Par contre, les brins courts s'accumulent de façon exponentielle car chaque brin nouvellement formé sert de matrice lors du cycle suivant, leur quantité sera largement majoritaire à la fin du cycle (BORDE.I, 2006).

Tableau 1 : Evolution du nombre de copies en fonction des cycles de PCR (MASSELOT, 2007).

Nombre de cycles de PCR	1	2	3	4	5	6	7
Molécules d'ADN copiées	2	4	8	16	32	64	128
Brins courts	0	0	2	8	22	52	114
Brins longs	2	4	6	8	10	12	14

Au cours de la réaction PCR, le nombre de copies augmente d'un facteur de :

- 2^n pour l'ADN total.
- $2n$ pour les brins longs.
- $2^n - 2n$, soit $2(2^{n-1} - n)$ pour les brins courts.

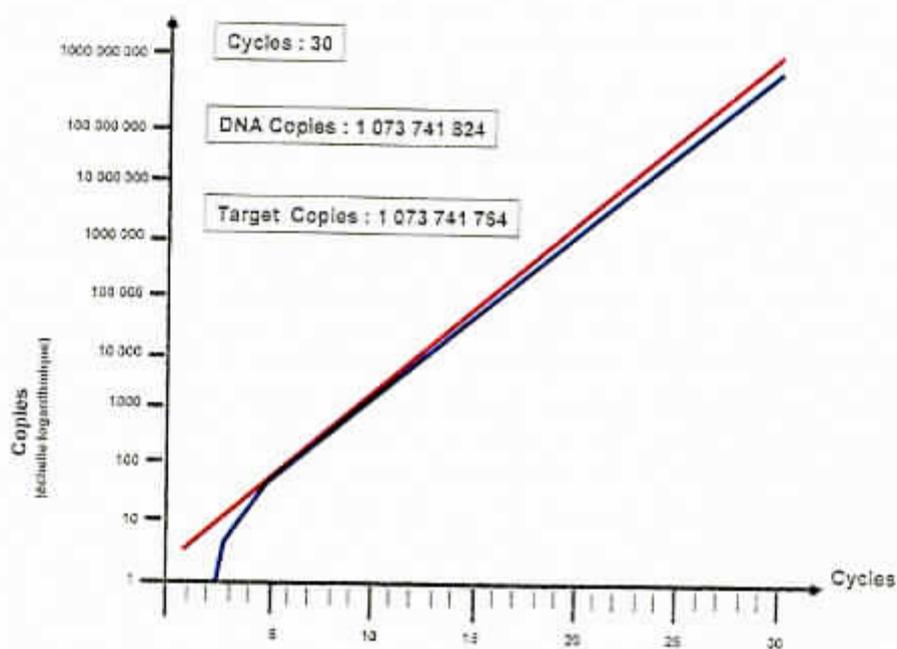


Figure 23 : Augmentation du nombre de copies d'ADN et d'ADN cible en fonction du nombre de cycles (MASSELOT, 2007).

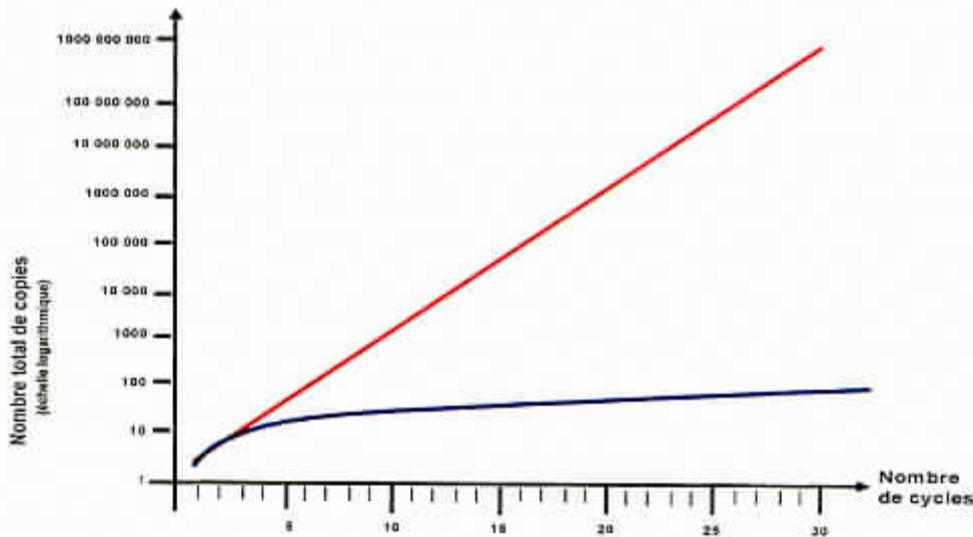


Figure 24 : Augmentation du nombre de copies d'ADN et de copies « longues » en fonction du nombre de cycles (BORDE.I, 2006).

Le taux final de l'ADN amplifié est corrélé au taux initial d'ADN cible après lecture par spectrophotométrie de masse et application de la formule suivante :

$$QF=QI (1+\delta)^{(n)}, \quad \text{Formule 3}$$

Où :

QF est la quantité finale de l'ADN amplifié ;

QI est la quantité initiale de l'ADN avant amplification ;

δ est l'efficacité de la PCR (varie entre 0 et 1) ;

n : Nombre de cycles.

Afin de s'assurer de la qualité et des performances du test et de détecter certaines anomalies risquant d'invalider le résultat, des contrôles dans les séries d'analyse par PCR sont nécessaires.

La présence de deux témoins permet (ANONYME, 2006c), (BROGNIEZ-COLIN.C, 2005), de vérifier la validité de la réaction :

- le témoin positif présente une séquence cible connue ; c'est un contrôle interne de la manipulation qui permet de savoir si l'amplification a bien eu lieu ;

- le témoin négatif contient tous les éléments nécessaires au bon déroulement de la réaction mais ne contient pas d'ADN cible, il n'y aura donc pas d'amplification. Il permet de mettre en évidence une éventuelle contamination des réactifs au cours de la manipulation.

II.7. Détection des produits d'amplification

Les amplicons peuvent être visualisés sur des gels (agarose ou polyacrylamide), après électrophorèse. La visualisation des acides nucléiques se fait après addition de bromure d'éthidium, qui s'intercale entre les bases et émet une fluorescence orangée sous lumière ultraviolette. En parallèle des fragments étudiés, on fait migrer un marqueur de poids moléculaire (ladder) contenant des fragments de taille connue, ce qui permet de vérifier la longueur du brin amplifié.

La migration des acides nucléiques se fait de manière inversement proportionnelle à la taille du fragment.

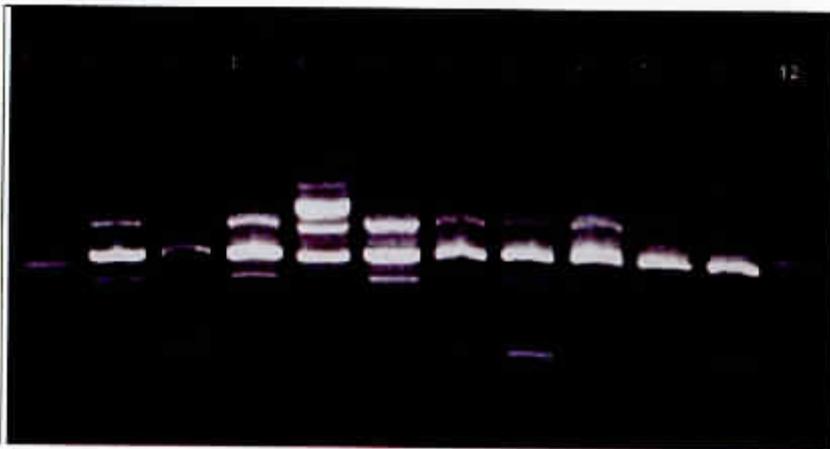


Figure 25 : Schéma d'une électrophorèse en gel d'agarose
(GAUTHIER .D, 2006)

La détection des produits d'une amplification peut également se faire par analyse des fragments obtenus, après digestion de l'amplicon par les enzymes de restriction, par des méthodes de chromatographie ou encore par hybridation moléculaire sur microplaques (PCR- ELISA), en tubes ou avec une sonde spécifique (LEFEVRE.PC et al, 2003).

II.8. Limites de la PCR

Bien que la PCR soit une méthode aux nombreux avantages, elle possède toutefois des limites (LEFEVRE.PC et al, 2003), (CHINA.A et al, 2002), (BROGNIEZ-COLIN.C, 2005).

- La taille du fragment à amplifier ne peut pas dépasser quelques kilobases (3 kb). Au-delà, il se produit des phénomènes qui empêchent la réaction de se dérouler normalement tels qu'une interruption prématurée due à la formation de structures secondaires, ou encore le réappariement des fragments néosynthétisés entre eux.
- Lorsque le nombre initial de copies est faible, il est préférable d'effectuer deux PCR successives, plutôt que de multiplier le nombre de cycles, car au-delà d'un certain nombre le taux d'amplification baisse progressivement. Ceci est dû à la diminution de la concentration des nucléotides et à l'augmentation de la concentration du produit PCR.
- La Taq polymérase ne possède pas d'activité exonucléasique 3'→5'. Son taux d'erreur est d'environ $2 \cdot 10^{-4}$ (contre 10^{-9} lors de la réplication in vivo) ; de ce fait, si une erreur se produit au cours de l'élongation, le système ne dispose d'aucun moyen de correction.
- Certains échantillons, notamment les aliments, peuvent contenir des éléments inhibiteurs de l'ADN polymérase, ce qui augmente le risque de résultats faux négatifs.
- La contamination des échantillons est un risque majeur et permanent de la PCR ; même mineure, elle peut avoir des conséquences très sérieuses, du fait des résultats faussement positifs obtenus.
- La qualité des thermocycleurs est un facteur limitant de la PCR. Leurs performances sont très différentes, surtout en terme de différence entre la température à atteindre et la température réellement atteinte dans le tube, la vitesse de passage d'une température à une autre ainsi que l'uniformité de température dans l'ensemble du tube.

II.9. Les variantes de la PCR

A côté de la PCR dite classique, décrite ci-dessus, il existe de nombreuses variantes :

II.9.1. La reverse transcription-PCR (RT-PCR)

La PCR est une technique qui amplifie des fragments d'ADN. Par conséquent l'étude de l'ARN par PCR nécessite le passage par une étape intermédiaire, qui transforme l'ARN en son ADN complémentaire (ADNc). On peut alors réaliser une PCR classique (ANONYME, 2006c).

L'ensemble transcription inverse- amplification forme la RT-PCR.

II.9.1.1. Principe

L'ARN que l'on souhaite étudier fait l'objet d'une transcription inverse, grâce à l'action d'une enzyme appelée transcriptase reverse. Cette dernière est une ADN polymérase ARN dépendante, capable de transformer l'ARN en ADN complémentaire.

Le produit final est un ADN, dont l'un des brins est complémentaire de l'ARN d'intérêt et l'autre a la même séquence que cet ARN (FRANCINA.A, 2003).

II.9.1.2. Difficultés techniques

La contamination de l'échantillon par de l'ADN génomique, au cours de l'extraction de l'ARN, est l'une des principales difficultés de la technique car celui-ci peut rentrer en compétition avec l'ADNc lors de l'étape d'hybridation des amorces, d'où l'intérêt de traiter l'ARN avec des ADNases avant la transcription inverse.

L'ARN peut également être dégradé par des ARNases ; il sera donc de mauvaise qualité et la transcription inverse ne sera pas optimale, d'où la nécessité d'ajouter systématiquement dans la réaction des inhibiteurs des ARNases (ANONYME, 2006c).

II.9.2. Nested PCR (PCR nichée)

C'est une méthode qui consiste à réaliser deux amplifications successives, en utilisant pour chacune des amorces différentes. L'amplicon obtenu après une première PCR est amplifié à l'aide d'un second couple d'amorces, qui s'hybride à une partie interne de la séquence amplifiée.

La sensibilité de la méthode est considérablement augmentée, puisque deux PCR successives sont réalisées. Il en est de même pour sa spécificité du fait de l'utilisation de deux couples d'amorces. (BROGNIEZ-COLIN.C, 2005).

La réalisation de la seconde PCR nécessite l'ouverture du tube, afin d'ajouter le second couple d'amorces, la contamination est de ce fait possible.

II.9.3. La PCR multiplexe

Le principe repose sur l'amplification simultanée de plusieurs séquences cibles, au moins deux, à l'intérieur d'un même tube. Chaque amplification doit être indépendante des autres et le résultat doit être identique à celui obtenu isolément dans un tube avec un seul couple d'amorces.

Chaque produit d'amplification doit avoir une taille peu différente de celle des autres pour obtenir à peu près la même efficacité de PCR, mais la différence doit être suffisante pour pouvoir les distinguer.

Cette méthode présente l'avantage de pouvoir détecter plusieurs cibles en même temps et dans un même tube, mais sa mise au point est beaucoup plus complexe que celle d'une PCR classique (ANONYME, 2006c).

II.9.4. La PCR en temps réel

Elle est également dénommée PCR quantitative en temps réel.

II.9.4.1. Principe

Il est fondé sur la détection et la quantification en temps réel d'un signal fluorescent, qui est émis de façon proportionnelle à la quantité de produits amplifiés par PCR, cycle après cycle.

L'appareil utilisé n'est autre qu'un thermocycleur classique, auquel vient s'ajouter un système de lecture qui mesure la fluorescence. L'amplification et la détection des produits sont donc simultanées (ANONYME, 2006c).

II.9.4.2. Technologies de détection

Le système PCR en temps réel repose sur la détection et la quantification d'un émetteur fluorescent pendant le processus d'amplification.

Il existe deux principes généraux pour la détection quantitative des amplicons :

II.9.4.2.1. Le marquage non spécifique

Il repose sur l'utilisation d'agents chimiques capables de se fixer sur l'ADN bicatenaire en s'intercalant entre les deux brins de l'hélice. La molécule la plus fréquemment utilisée est la SYBR GREEN I (CHINA.A et al, 2002). Pour être utilisée dans une réaction PCR en temps réel, elle doit répondre à deux exigences :

- ⇒ augmenter en fluorescence lorsqu'elle est liée à un ADN double brin ;
- ⇒ ne pas inhiber la réaction de PCR.

II.9.4.2.1.1. Principe

Au début de la réaction, le colorant libre en solution exhibe peu de fluorescence. Puis, au cours de l'extension des amorces, il s'intercale entre les deux brins néosynthétisés et émet une fluorescence. La quantité du signal fluorescent est augmentée proportionnellement au nombre de produits formés, et décroît complètement à l'étape de fusion du cycle suivant.

L'acquisition de la fluorescence est réalisée une fois par cycle, juste après la fin de l'extension par l'enzyme (RENOUF.V, 2006).

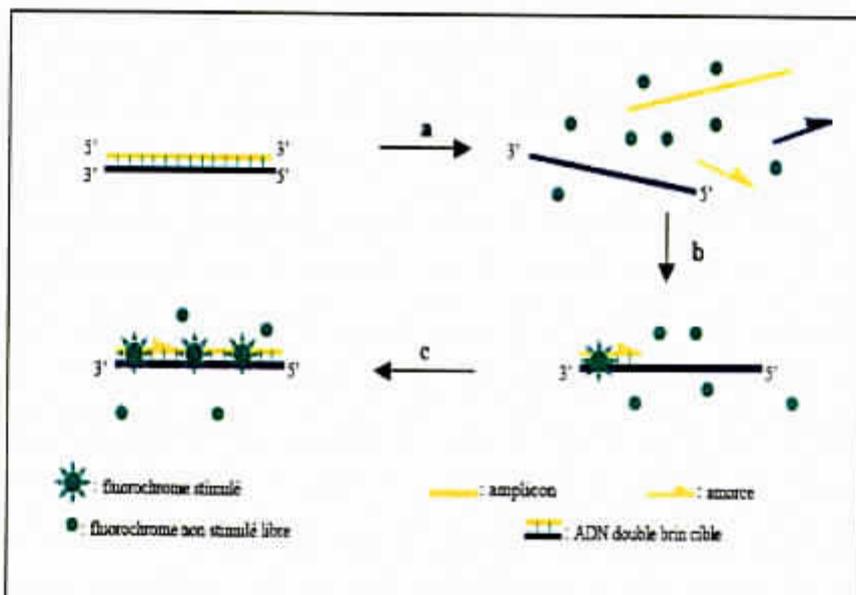


Figure 26 : Le SYBR Green I
(POITRAS et HOUDE, 2002)

II.9.4.2.1.2. Avantages

- Coût faible.
- Moindre toxicité par rapport au bromure d'éthidium.
- Facile d'utilisation.
- N'est pas affecté par les mutations.

II.9.4.2.1.3. Limites (BAGORY.M, 2006), (ANONYME, 2006c)

- Absence de spécificité du fait de la liaison du colorant aux molécules doubles brins quelles qu'elles soient.
- La dépendance de la fluorescence de la masse moléculaire de l'ADN, fait que pour la même réaction PCR, les produits amplifiés longs fixent davantage de molécules fluorescentes que les fragments courts.
- Etant donné que l'ADN double brin total émet des signaux, il devient impossible au cours de la réaction de s'assurer de la spécificité des amplicons ou de différencier deux fragments de même taille lors de multiplexage.
- Les mauvais appariements génèrent souvent des bandes d'ADN superflues, observables sur gel d'électrophorèse pouvant conduire à des faux positifs ou à une surestimation de la quantification.

Le problème de la spécificité de détection par fluorescence des amplicons a été résolu par l'utilisation de sondes spécifiques des séquences avec un marquage fluorescent conçu à l'intérieur de la paire d'amorces PCR. Le processus d'hybridation des sondes n'interfère généralement pas avec l'accumulation exponentielle du produit de la PCR.

II.9.4.2.2. Le marquage spécifique

Il existe présentement trois principales technologies :

II.9.4.2.2.1. Sondes d'hydrolyse

Egalement appelées sondes de dégradation ou encore sondes TaqMan.

II.9.4.2.2.1.1. Principe

La technologie TaqMan exploite l'activité exonucléase 5'-3' de la Taq polymérase pour cliver une sonde d'hydrolyse au cours d'une PCR.

La sonde est généralement un oligonucléotide contenant deux colorants fluorescents ; l'un émetteur (rapporteur ou reporter), à l'extrémité 5' et l'autre suppresseur (extincteur ou quencher) à l'extrémité 3'. En présence d'une cible, la sonde s'hybride spécifiquement entre les sites d'hybridation des deux amorces.

Lorsque la sonde est intacte, la proximité du reporter par rapport au quencher entraîne la suppression de la fluorescence du reporter, par absorption de celle-ci par le quencher et l'énergie se dissipe alors sous forme de chaleur, plutôt que d'émettre de la fluorescence.

Pendant la phase d'élongation, l'activité exonucléase 5'-3' de l'enzyme dégrade la sonde entre le reporter et le quencher -mais seulement si la sonde est hybridée à la cible- et entraîne un accroissement de la fluorescence, au fur et à mesure de l'amplification (SIATKA.C, 2006).

L'accumulation du produit PCR est détectée en contrôlant l'augmentation de la fluorescence du colorant reporter. Les sondes de dégradation libèrent des fluorochromes à chaque cycle, ajoutant un nouveau colorant au colorant libéré précédemment et par conséquent, le signal fluorescent augmente considérablement à chaque cycle (WEIGHARDT.F, 2005).

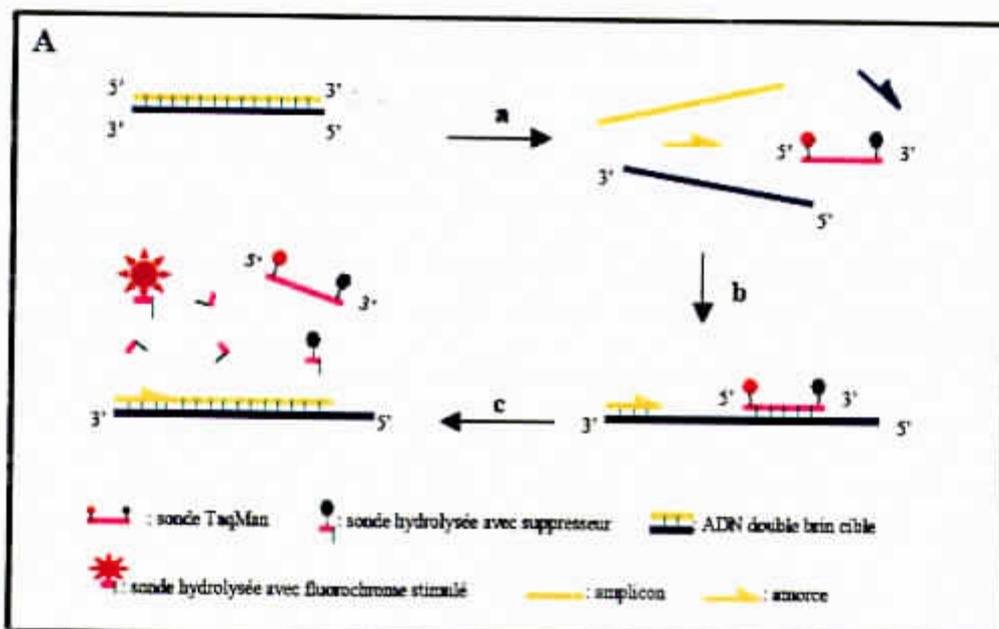


Figure 27 : Les sondes d'hydrolyse
(POITRAS.E et HOUDE.A, 2002).

II.9.4.2.2.1.2. Avantages

- La spécificité d'hybridation entre la sonde et sa séquence cible réduit significativement l'émission de fluorescence non spécifique, due à des mauvais appariements.
- La capacité de multiplexage est améliorée par la possibilité de l'utilisation de fluorochromes émetteurs distincts liés à des sondes différentes dans une même réaction de PCR (ANONYME, 2006).

II.9.4.2.2.1.3. Limites

- La technologie TaqMan, pour la détection de mutations spécifiques, présente l'inconvénient d'être moins efficace et moins flexible que d'autres technologies en temps réel.
- L'hydrolyse irréversible des sondes.

II.9.4.2.2.2. Sondes d'hybridation

Elles sont également appelées sondes FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) ou hybridization probes ou encore hybprobes.

II.9.4.2.2.2.1. Principe

Il est basé sur l'emploi de deux sondes linéaires, capables de se fixer de manière spécifique sur le produit PCR simple brin néosynthétisé. Les deux sondes sont marquées par des fluorochromes ; la première est marquée à son extrémité 3' par un fluorophore donneur, et l'autre qui est marquée à son extrémité 5' par un fluorophore receveur, est phosphorylée à son extrémité 3' afin d'éviter son extension par la polymérase au cours de l'élongation (BAGORY, 2006).

La distance qui sépare les deux sondes doit être réduite (entre 1 et 5 bases) afin d'augmenter les phénomènes de transfert entre donneur et accepteur.

En solution, les deux sondes sont libres et séparées l'une de l'autre. Etant donnée que le transfert d'énergie par le principe FRET dépend de la distance entre les deux fluorochromes, aucun signal ne sera détecté. Au moment de l'hybridation, les deux sondes se fixent à leurs séquences cibles respectives, dans un arrangement en tête à queue.

La proximité des deux marqueurs permet le transfert énergétique à l'accepteur et provoque son émission fluorescente. L'accroissement de celle-ci est proportionnel à la quantité d'ADN synthétisé durant la réaction PCR (CHINA.A et al, 2002).

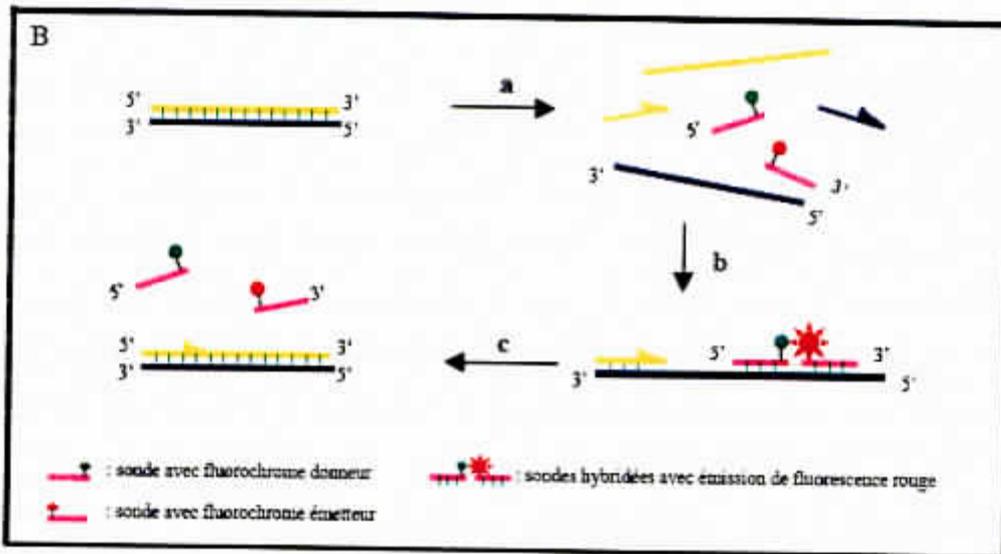


Figure 28 : Les sondes d'hybridation
(POITRAS.E et HOUDE.A, 2002).

II.9.4.2.2.2. Avantages

- Spécificité du signal qui est améliorée du fait de l'utilisation de deux sondes adjacentes.
- Détection des mutations.

II.9.4.2.2.3. Limite

- Prix élevé des sondes.

II.9.4.2.2.3. Les balises moléculaires ou molecular beacons.

La balise moléculaire est une sonde d'hybridation d'ADN en forme d'épingle à cheveux. La portion de la sonde qui compose la boucle est complémentaire de la séquence cible d'ADN. Le tronc de la balise est formé de deux bras de séquences complémentaires, dont les extrémités sont liées à un reporter et à un quencher.

II.9.4.2.2.3.1. Principe

Les sondes libres adoptent en solution une structure en épingle à cheveux et le tronc maintient les bras ensemble, pour une suppression efficace de l'émission de la fluorescence.

Lorsque la sonde rencontre une séquence qui lui est complémentaire, elle adopte une conformation transitoire qui force les deux bras à se séparer. La sonde s'hybride et l'émetteur, éloigné du quencher, émet un signal qui est détecté (KANTANA ZADA.B et al, 2006).

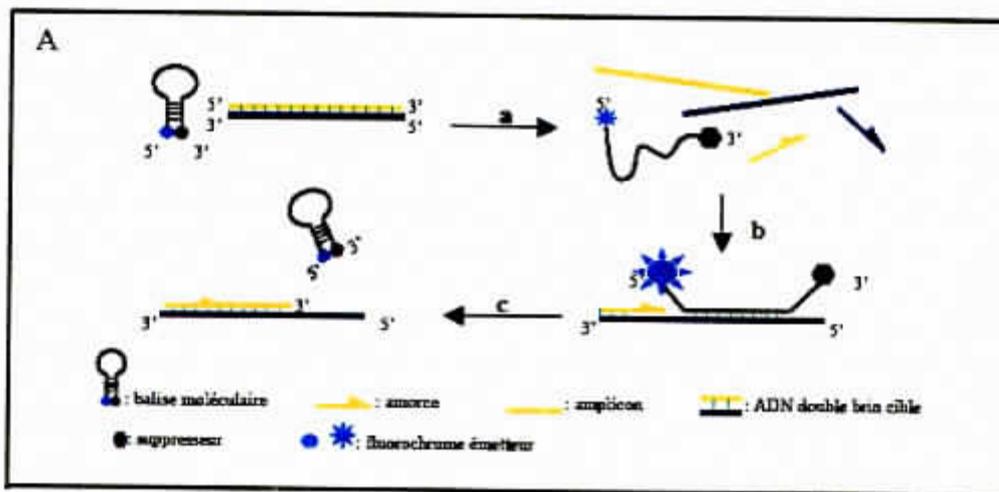


Figure 29 : Les balises moléculaires
(POITRAS.E et HOUDE.A, 2002)

II.9.4.2.2.3.2. Avantages

- Les sondes ne sont pas dénaturées au cours de la réplication et peuvent se réhybrider après chaque cycle de PCR.
- La structure de la sonde en épingle à cheveux lui confère une sensibilité accrue, qui détecte des variations de séquences de l'ordre d'un nucléotide (ANONYME, 2006c).

II.9.4.2.2.3.3. Limites

- Prix est très élevé.
- Difficultés de conception du tronc.

II.9.4.3. Analyse graphique des données

Au cours d'une PCR en temps réel, les données de fluorescence recueillies permettent de tracer un graphique représentant la quantité du signal émis par rapport au nombre de cycles.

La force de la PCR en temps réel réside dans le fait que la quantification survient, non pas à la phase terminale de la réaction (phase en plateau), mais à l'étape où la croissance exponentielle de la quantité d'ADN amplifié atteint un point significativement plus élevé que le signal résiduel, c'est le cycle seuil Ct (Threshold) (WEIGHARDT.F, 2005).

II.9.4.3.1. Notion du cycle seuil

Ce concept est à la base d'une quantification précise et reproductible pour les techniques fluorescentes en PCR. Le cycle seuil est défini comme étant le cycle PCR où le signal d'émission de fluorescence est statistiquement et significativement plus élevé que le bruit de fond. Pour cela, on définit un seuil (Threshold) correspondant à un niveau de fluorescence suffisamment bas pour que les courbes d'amplification soient en phase exponentielle, mais aussi suffisamment élevé pour être au dessus du bruit de fond (CHINA.A et al, 2002).

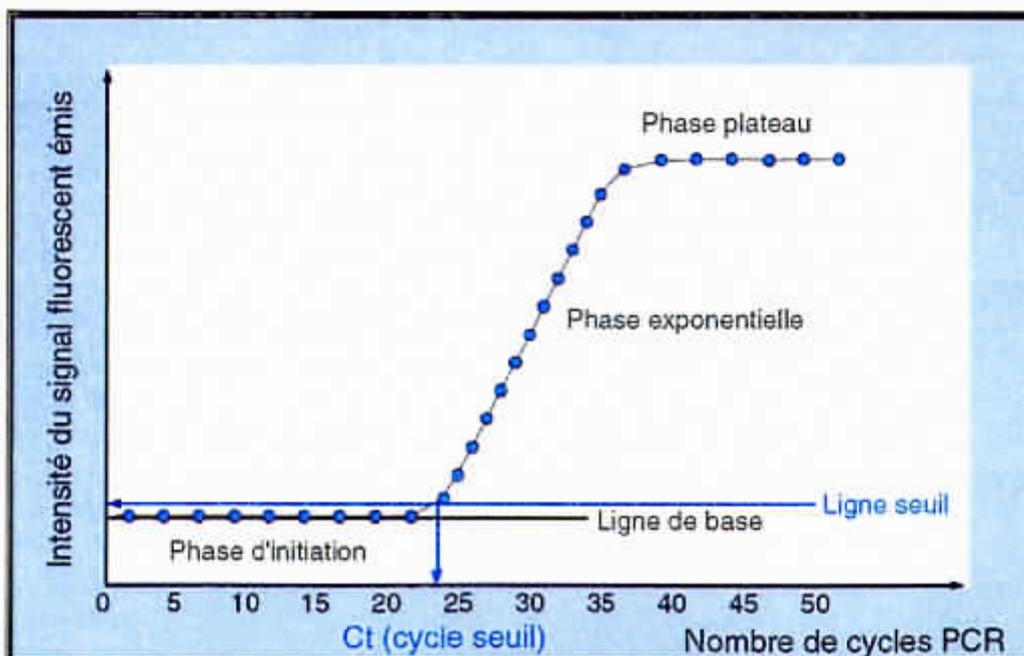


Figure 30 : Modèle graphique de la PCR en temps réel

(BAGORY.M, 2006)

Trois phases sont à distinguer :

- une phase initiale linéaire en dessous de laquelle on ne perçoit que le bruit de fond ;
- une phase exponentielle d'amplification de l'ADN ;
- une phase en plateau où la réaction atteint un maximum.

Les valeurs de fluorescence sont enregistrées au cours de chaque cycle et représentent la quantité d'amplicons produits. Plus il y a de matrices à amplifier au début de la réaction, moins élevé sera le nombre de cycles requis pour atteindre le Ct. La valeur du Ct peut être traduite en résultat quantitatif en la comparant avec les valeurs du Ct générées avec des matrices de quantification connue (standard).

Le cycle seuil survient toujours au cours de la phase exponentielle de l'amplification, par conséquent la quantification n'est pas affectée par l'épuisement d'un des réactifs, ce qui explique la grande reproductibilité du système (POITRAS.E et HOUDE.A, 2002).

II.9.4.4. Avantages de la PCR en temps réel

- Cette technique est dotée d'une très grande sensibilité et spécificité. Elle permet une analyse qualitative et quantitative en temps réel ; ce qui supprime les manipulations post-PCR et réduit les risques de contamination.
- Plusieurs échantillons peuvent être analysés à chaque PCR, de ce fait le gain de temps est considérable, de plus la vitesse d'amplification par cette méthode est plus importante.
- Cette technologie évite l'utilisation de l'électrophorèse pour la lecture des résultats, et autorise donc l'automatisation du processus PCR, le rendant ainsi accessible pour des applications en milieu industriel (ANONYME, 2006c).



CHAPITRE III

**EXEMPLES DE BACTERIES PATHOGENES DIAGNOSTIQUEES
PAR LES
METHODES GENETIQUES**



Les méthodes de biologie moléculaires permettent la détection, l'identification et, pour certaines d'entre elles, la quantification des microorganismes à partir d'un prélèvement humain, animal ou alimentaire. Ces méthodes sont nombreuses et peuvent être appliquées à tous les microorganismes.

Tableau 2 : Exemples de bactéries diagnostiquées par les méthodes génétiques (SACHSE.K et FREY.J, 2006).

La région cible du gène	L'agent pathogène
L'ARNr 16s	<i>Campylobacter spp.</i> <i>Mycobacterium spp.</i> <i>Leptospira spp.</i>
L'espace inter génique 16-23s	<i>Campylobacter jejuni/coli</i> <i>Clostridium difficile</i> <i>Staphylococcus spp.</i> <i>Listeria. Monocytogenes</i>
Bcsp31	<i>Brucella spp.</i>
Hsp65	<i>Mycobacterium avium complex</i>
IS6110	<i>Mycobacterium tuberculosis complex</i>
invA, ompC	<i>Salmonella serovars</i>

Afin d'éviter les répétitions, nous nous limiterons dans le chapitre qui suit, au diagnostic de quelques bactéries parmi les plus pathogènes à savoir : *Eschérichia coli* ; *Listeria monocytogenes* ; *Clostridium perfringens* ; *Staphylococcus aureus* ; *Chlamydia*.

Le diagnostic de la présence ou de l'absence d'une bactérie se fait par la recherche des facteurs de virulence de celle-ci. La notion de virulence regroupe les capacités de la bactérie à infecter et à provoquer une maladie dans une espèce donnée. Ces facteurs sont très divers : l'existence d'un ou de plusieurs facteurs conditionne le pouvoir pathogène du germe, il y a la reconnaissance de l'hôte-fixation aux tissus ou aux cellules (adhésion à l'épithélium), la multiplication, l'invasion et la destruction tissulaire (enzymes et toxines), le masquage (capsules glucidiques), ainsi que la destruction et la désorganisation du système immunitaire (GREZEL.D, 2007).

Remarque : De nombreux gènes interviennent dans la pathogénicité des bactéries. Mais seuls certains sont utilisés pour le diagnostic et nous nous restreindrons dans ce travail à leur étude.

I. ORGANISATION DU LABORATOIRE

Des mesures spécifiques d'organisation liées aux risques de contaminations doivent être prises et imposent un certain nombre de contraintes au niveau de la structure générale du laboratoire comme au niveau de l'organisation du travail (DURANT.G ; FREZET.S ; 2003).

Le laboratoire est compartimenté en différents secteurs se calquant sur les différentes étapes d'une réaction PCR. Les secteurs individualisés sont les suivants :

- le traitement du prélèvement avec extraction du matériel génétique ;
- la préparation du mélange réactionnel (ou mastermix) ;
- l'addition des acides nucléiques cibles ;
- l'amplification ;
- la détection des amplicons.

Le laboratoire comprend donc cinq pièces séparées par des sas et un circuit de ventilation indépendant pouvant être soumis aux rayons ultra-violets. Cependant ce schéma est difficile à mettre en pratique dans un laboratoire de bactériologie.

L'avènement de systèmes anticontaminations, souvent intégrés dans les kits ainsi qu'une grande rigueur dans l'exécution du travail permet d'envisager des structures simplifiées.

Le travail est séparé en trois zones distinctes réparties en deux pièces :

Tableau 3 : Organisation du laboratoire de biologie moléculaire
(BOGARD.M ; LAMORIL.J, 1999)

Pièce pré-amplification		Pièce post-amplification	
Secteur I Préparation des réactifs (sans ADN /ARN)	} zone 1	Secteur IV PCR	} zone 3
Secteur II Préparation des échantillons (ADN/ARN)		Secteur V Analyse des produits amplifiés	
Secteur III Addition de la cible aux réactifs	} zone 2		

II. PREPARATION DES ECHANTILLONS.

Quelque soit la méthode utilisée, les étapes préliminaires de préparation de l'échantillon et de l'extraction du matériel génétique sont toujours présentes mais peuvent varier avec la nature du prélèvement. Divers échantillons biologiques (selles) ou alimentaires (viande et lait crus) peuvent être utilisés.

La libération des acides nucléiques des bactéries à détecter est une étape indispensable et préalable. Il faudra aussi empêcher la dégradation des acides nucléiques libres, éliminer les inhibiteurs des réactions d'amplification et d'hybridation, utiliser un tampon approprié aux réactions à effectuer et adapter le volume de l'échantillon et le concentrer éventuellement, selon la sensibilité de la technique. Un enrichissement préalable, dans un milieu nutritif adéquat, est parfois nécessaire (SACHSE.K et FREY.J, 2006).

II.1. Extraction des acides nucléiques

De nombreuses méthodes telles que le choc thermique, la lyse alcaline, la protéinase K, phénol – chloroforme...etc permettent l'extraction de l'acide nucléique. Il faudra cependant tenir compte de la nature de ce dernier (ADN ou ARN), lors du choix de la méthode, afin d'éviter les réactions non spécifiques (MBEGUIE-A-MBEGUIE.D, 2000).

Actuellement, il existe des automates qui permettent l'extraction des acides nucléiques, mais leur coût élevé rend leur utilisation assez rare.

III. DIAGNOSTIC DES SOUCHES D'*Escherichia coli* PRODUCTRICES DE SHIGATOXINES.

III.1. Généralités

La plupart des souches d'*Escherichia coli* (*E.coli*) sont des bactéries de la microflore commensale du tube digestif de l'homme et de nombreux mammifères. Certaines d'entre elles peuvent être à l'origine d'infections variées, allant de la diarrhée à des manifestations plus graves, telles qu'une colite hémorragique, un syndrome hémolytique et urémique (SHU) ou un purpura thrombocytopénique.

La majorité des épidémies a une origine alimentaire (viande de bœuf crue ou mal cuite, lait cru, sandwich froid), mais elles peuvent aussi être associées à une contamination inter humaine (VERNOZY-ROZAND.C, 2007).

Ces souches produisent des toxines appelées vérotoxines ou toxines 'shiga-like' (Stx), du fait de leur similarité avec les toxines produites par *Shigella dysenteriae* type1.

Les souches de *E.coli* productrices de vérotoxines (ou VTEC pour verotoxin-producing *E.coli*) ou shigatoxines (ou STEC pour shigatoxin-producing *E.coli*), peuvent synthétiser une ou deux vérotoxines immunologiquement distinctes nommées Stx1 et Stx2 (codées respectivement par les gènes *stx1* et *stx2*) et éventuellement d'autres facteurs de virulence portés par des îlots génomiques spécifiques (BERNARD.J et REYNAUD.A, 2003).

III.2. Détection des STEC

Les STEC ont comme seule caractéristique commune la capacité de produire des shigatoxines codées par les gènes *stx*. Par conséquent, les techniques d'analyses mises au point consistent en la détection de ces gènes. (BERARDIN.M, 2005).

III.2.1. Principe

L'acide nucléique, extrait du prélèvement à analyser, est soumis à une réaction PCR qui amplifie la séquence cible à l'aide d'amorces spécifiques la bornant.

- ⇒ Si la bactérie ciblée est absente, il n'y aura aucun signal car l'amplification ne se produit pas.
- ⇒ Si la bactérie est présente, il y aura émission d'un signal qui sera détecté.

III.2.2. Interprétation des résultats

Deux possibilités (ROSSEL.R et al, 2001) se présentent :

- ⇒ Le résultat est négatif, l'échantillon ne contient pas le ou les gènes *stx* qui codent pour la synthèse des shigatoxines ; le prélèvement est donc dépourvu de STEC.

⇒ Le résultat est positif, l'échantillon renferme bien le ou les gènes *stx* et contient au minimum une souche de STEC.

Tous les STEC ne sont pas pathogènes, les souches isolées lors de pathologies humaines sont dites entérohémorragiques, de ce fait, un échantillon positif en PCR *stx* doit faire l'objet d'une confirmation par la recherche systématique d'autres facteurs de virulence.

Remarque : Lors de PCR stx , il y a un risque de faux positif avec *Shigella dysenteria*.

III.3. Recherche des facteurs de virulence

III.3.1. Le facteur d'attachement/effacement

La colonisation du tube digestif s'accompagne du développement de lésions spécifiques des entérocytes, dites attachement/effacement (A/E). Le gène responsable est porté par un locus chromosomique, dénommé locus d'effacement des entérocytes (LEE). Il s'agit du gène *eae* qui code pour une protéine dite intimine, responsable de l'adhésion aux cellules épithéliales (VERNOZY-ROZAND.C et SERVANE.R, 2003), (MARIANI-KURKDJIAN.P, 2000).

III.3.2. L'entérohémolysine

La production d'hémolysine est un caractère fréquemment retrouvé chez les souches d'*E.coli* associées à des infections intestinales et extra intestinales, mais son rôle précis dans l'infection chez l'homme est encore inconnu. Le gène en cause est le gène *ehxA* codant pour la protéine H-hlyA : entérohémolysine.

Ce gène est rarement utilisé pour la détection des STEC, sa présence est en général utilisée pour caractériser les souches isolées (VERNOZY-ROZAND.C, MONTET.MP, 2001).

La mise en évidence des gènes de virulence peut se faire, soit par hybridation à l'aide de sondes nucléiques spécifiques, soit après amplification génétique. Compte tenu de la présence en très faible quantité des STEC dans les selles (10 bactéries seraient potentiellement suffisantes pour déclencher les symptômes), la PCR des gènes *stx* représente une méthode très sensible.

Tous ces gènes qui codent pour les facteurs de virulence peuvent être détectés soit isolément, soit de façon simultanée par PCR multiplexe ou grâce à la technologie des puces à ADN (SACHSE K et FREY J, 2006).

IV. DIAGNOSTIC DE *Listeria monocytogenes*

IV.1. Généralités

Les *Listeria* sont des germes intracellulaires, facultatifs, ubiquitaires, présents dans le milieu extérieur au niveau du sol et de la végétation, ainsi que chez des porteurs sains.

Ces germes peuvent être à l'origine d'une infection alimentaire sévère, la listériose, qui se manifeste chez les sujets fragiles et immunodéprimés par des septicémies, des avortements ou des méningo-encéphalites le plus souvent (SUTRA .L et al, 1998).

Dans le genre *Listeria*, seule *Listeria monocytogenes* est pathogène pour l'homme alors qu'elle est pathogène pour de nombreuses espèces animales.

IV.2. Processus d'infection cellulaire

La pathogénie de *Listeria monocytogenes* implique sa pénétration dans la cellule, une multiplication intracellulaire, un déplacement de la bactérie dans le cytoplasme et une invasion des cellules adjacentes, sans libération par les cellules infectées (EUZEBY.JP, 2000).

Les protéines nécessaires à ces diverses fonctions sont sous la dépendance de gènes, dont l'expression est régulée par le gène *prfA* codant pour une protéine apte à se lier à des portions d'ADN. A basses températures, l'expression de *prfA* est réprimée, alors qu'elle est maximale à une température de 37°C (RENZONIA et al, 2002) (LARPENT.JP, 2004).

IV.3. Facteurs de virulence

L'infection d'une cellule par *L. monocytogenes* peut être décomposée en plusieurs phases, avec pour chacune d'elles la mise en jeu d'un ou de plusieurs facteurs de virulence majeurs. Ces derniers sont répartis en un îlot chromosomique de pathogénicité (BERCHE.P, 2002).

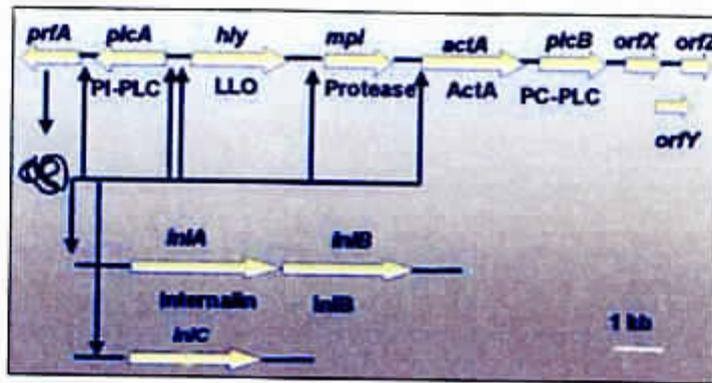


Figure 31 : Localisation des gènes de virulence de *L.monocytogenes*
(BERCHE.P, 2002)

IV.3.1. L'internaline

Après adhésion à la membrane plasmique, *L.monocytogenes* est capable de pénétrer dans des cellules phagocytaires, ou de ne pas le faire, en induisant sa propre phagocytose. Cette internalisation est liée à la production d'une protéine de surface, l'internaline, codée par le gène *inA* (SUTRA.L et al, 1998).

Il existe une seconde protéine, codée par le gène *inB*, qui joue un rôle mineur dans la pénétration de la bactérie dans les cellules épithéliales de l'intestin, mais qui est essentielle dans l'invasion des hépatocytes (EUZEBY.JP, 2000).

IV.3.2. La listeriolyse

Après internalisation, *L.monocytogenes* est emprisonnée dans une vacuole intra cytoplasmique, dont elle doit s'échapper afin de rejoindre le cytoplasme au sein duquel elle se multiplie activement. La destruction de la vacuole est principalement due à la listeriolyse O (LLO), codée par le gène *hly* (ou *hlyA*). Cette LLO est une hémolyse et son rôle dans la virulence de la bactérie est établi puisque en son absence, les souches deviennent avirulentes (EUZEBY.JP, 2000).

Il existe des homologies génétiques entre le gène *hly* de *L.monocytogenes* et d'autres espèces de *Listeria* (*L.ivanovii*, *L.seeligeri*). Cependant, la région située en aval du gène *hly* est spécifique de l'espèce *L.monocytogenes* et aucune homologie avec d'autres espèces n'a été décelée.

Il s'agit du gène *mlp* qui code pour les métalloprotéases et dont le rôle dans l'expression de la virulence reste à définir (LARPENT.JP, 2004).

IV.3.3. L'Actine A

Une fois dans le cytoplasme, la bactérie est capable de se déplacer. Cette mobilité intracellulaire est liée à la production d'une protéine de surface ActA, qui est codée par le gène *actA* et qui permet à la bactérie de rejoindre la membrane plasmique et de former une invagination qui sera phagocytée par la cellule voisine.

IV.3.4. La phospholipase C

Une fois la bactérie dans la cellule voisine, la lyse de la vacuole à double membrane est assurée par une phospholipase C (PC-PLC) codée par le gène *plcB* (SUTRA.L et al, 1998).

IV.3.5. La P60

C'est une protéine majeure extracellulaire, qui est associée à l'invasion des cellules. Cette protéine est codée par le gène *iap* qui existe chez presque toutes les espèces du genre *Listeria* ; cependant une partie de ce gène est spécifique de *L.monocytogenes* et peut donc être utilisé pour la détection spécifique de celle-ci (LARPENT.JP, 2004).

La détection spécifique de *Listeria monocytogenes* se fait le plus souvent par la recherche des gènes *prfA*, *hly*, *inlA*, *iap*, soit par hybridation sur support solide (puce) soit par PCR classique ou multiplexe pour la détection simultanée de ces gènes.

Dans la majorité des cas, notamment dans les denrées alimentaires, les *Listeria* sont en faible nombre et une flore associée est souvent abondante. Il faudra alors recourir à une étape d'enrichissement sélectif (SACHSE K et FREY J, 2006).

V. DIAGNOSTIC DE *Staphylococcus aureus*

V.1. Généralités

Dans le genre *Staphylococcus*, l'espèce *aureus* est un pathogène important, à l'origine de plusieurs types d'infections chez l'homme et les animaux.

Sa pathogénie est liée à la synthèse de nombreux facteurs de virulence, dont les principaux sont les adhésines et les toxines. (VERDIER.I et al, 2002).

V.2. Les adhésines

Ce sont des protéines de surface qui ont la capacité de se fixer sur des molécules de l'hôte permettant ainsi sa colonisation. De nombreuses adhésines ont été identifiées.

Les mieux caractérisées sont : la protéine A, la protéine de liaison au collagène (Cna), la protéine de liaison au fibrinogène (ClfA, ClfB), la protéine de liaison à la fibronectine (FnBP) (BISOGNANO.C, 2000).

V.3. Les toxines

Le pouvoir pathogène de *S.aureus* tient également à la production d'un grand nombre de substances diffusibles.

V.3.1. Les entérotoxines

Les toxi-infections alimentaires (TIA) dues aux entérotoxines de *S.aureus* sont en réalité des intoxications dues à l'ingestion d'aliments où la bactérie s'est multipliée et a produit une ou plusieurs toxines. Les vecteurs les plus communs pour ces intoxications comprennent la viande, la volaille et les produits laitiers tels que le fromage et la crème anglaise.

Il existe de nombreuses entérotoxines, considérées comme différentes à cause de leurs différences d'antigénicité. Neuf types antigéniques majeurs ont été rapportés : A, B, C (C1, C2, C3), D, E, G, H, I, J. Ces toxines sont codées par des gènes, respectivement *entA*, *entB*, *entC*, *entD*, *entE*, *entG*, *entH*, *entI*, *entJ* localisés sur le chromosome, un plasmide ou un bactériophage (SUTRA.L et al, 1998).

V.3.1.1. Caractérisation des gènes

La technique PCR est la plus souvent utilisée pour la recherche des gènes codant les entérotoxines de *S.aureus*.

Les séquences nucléotidiques des entérotoxines étant connues, des sondes d'ADN, spécifiques pour chacun de ces gènes peuvent être utilisées (LAMPRELL.H, 2003) (SUTRA.L et al, 1998).

V.3.2. La toxine du choc toxique

C'est la toxine TSST-1 (Toxic Shock Syndrom Toxin) codée par le gène *tstI*.

Staphylococcus aureus produit d'autres toxines, d'importance mineure qui sont plus rarement recherchées, telles que les exfoliatines ou épidermolysines (il en existe deux types EA, EB responsables de staphylococcies cutanées bulleuses) et les leucocidine de Panto- Valentine (LPV) qui sont à l'origine d'infections cutanées récidivantes (PRESCOTT.LM et al, 2003).

VI. DIAGNOSTIC DE *Clostridium perfringens*

VI.1. Généralités

C.perfringens est une bactérie sporulée ubiquiste, retrouvée au niveau du sol et des voies digestives de l'homme et des animaux. L'une de ses caractéristiques est la résistance de ses spores à la chaleur et aux enzymes intestinales. Après ingestion d'aliments contenant des spores, celles-ci germent au niveau de l'intestin et libèrent des entérotoxines, suite à la sporulation entraînent des troubles digestifs.

C.perfringens est l'espèce bactérienne qui produit le plus grand nombre de toxines et d'enzymes. Il y a des toxines dites majeures, et d'autres mineures à activité plus faible (SAWIRES.YS et SONGER.JG, 2005).

Cinq types toxino-gènes, classés d'après les toxines majeures produites et désignés par les lettres A, B, C, D et E sont décrits.

Tableau 04 : Toxinotypes majeurs de *C. perfringens*
(SUTRA.L et al, 1998).

Toxinotypes	Alpha	Bêta	Epsilon	Iota
A	++	-	-	-
B	+	++	+	-
C	+	++	-	-
D	+	-	++	-
E	+	-	-	++

++ : Principale toxine produite.

+ : Toxines secondaires produites, en général en plus faible quantité.

- : Toxine non produite.

Cette bactérie est responsable de deux formes très différentes de toxi-infections alimentaires (TIA) chez l'homme ; l'une légère, produite par le type A entérotoxigène et l'autre sévère, connue sous le nom d'entérocolite hémorragique nécrosante causée par le type C.

Chez les ruminants domestiques, ce sont surtout les types B, C, D, E qui sont responsables d'entérotoxémies et seuls quelques cas ont été attribués au type A (SUTRA.L et al, 1998).

VI.2. TIA à *C.perfringens* de type A

À la suite d'ingestion d'un aliment contaminé, les bactéries se retrouvent dans des conditions favorables à la sporulation et produisent l'entérotoxine CPE, codée par le gène *cpe* en grande quantité. Il s'en suit une fuite d'eau et d'électrolytes à l'origine d'une diarrhée.

Ce type produit également une autre toxine, appelée toxine alpha (α) ou phospholipase C (PLC) codée par le gène *plc* qui est situé sur le chromosome (FISCHER.DJ et al, 2006).

VI.3. TIA à *C.perfringens* type C

Après ingestion d'un aliment contenant le type C de *C.perfringens*, la bactérie se multiplie rapidement dans l'intestin et sécrète la toxine bêta (β) codée par le gène *cphI* (localisé sur un plasmide), qui est responsable des phénomènes de nécrose et d'hémorragies.

Deux autres toxines semblent intervenir en même temps : il s'agit de la toxine thêta (θ) ou perfringolysine, codée par le gène *pfoA* et la toxine (δ), qui seraient responsables d'une accumulation liquidienne importante (CHINA.A et al, 2003).

VI.4. Détection de *C.perfringens*

VI.4.1. Diagnostic des infections à *C.perfringens*

La recherche de l'entérotoxine par PCR peut se faire directement à partir de prélèvements de selles, grâce à des amorces spécifiques du gène *cpe* dont la présence signe une TIA, puisqu'elle est absente dans les selles des sujets sains.

Chez les ruminants domestiques, le toxinotype B est responsable de la dysentérie des agneaux alors que le toxinotype C est responsable de l'entérite hémorragique des veaux et agneaux. Ces deux types possèdent des gènes codant pour les toxines alpha et bêta.

Le diagnostic différentiel se fera donc par la recherche du gène *etx*, qui code pour la toxine epsilon qui n'est retrouvée que chez le sérotype B (SUTRA.L et al, 1998).

VI.4.2. Diagnostic en hygiène alimentaire

La recherche de *C.perfringens* dans les aliments peut se faire à partir de suspensions alimentaires en eau peptonnée. Pour l'identification des souches de type A, entérotoxigènes ou non, qui sont retrouvées chez l'homme, une PCR multiplexe permettant d'amplifier simultanément deux fragments des gènes de la toxine α et de l'entérotoxine a été mise au point. Le gène *plc* étant présent chez toutes les souches de *C.perfringens*, sa mise en évidence ne permet qu'un diagnostic d'espèce alors que la détection du gène *cpe* discrimine les souches non entérotoxigènes.

L'identification des produits d'amplification est confirmée par hybridation, avec une sonde interne aux amorces utilisées pour l'amplification des gènes codant la toxine α et l'entérotoxine (SUTRA.L et al 1998).

VII. DIAGNOSTIC DE *Chlamydia*

VII.1. Généralités

Les *Chlamydia* sont parmi les bactéries les plus ubiquitaires du règne animal. Ce sont des pathogènes intracellulaires obligatoires. Deux genres sont retrouvés dans la famille des *Chlamydiaceae*, le genre *Chlamydia*, agent de maladies sexuellement transmissibles très répandues, qui comporte l'espèce *C. trachomatis* responsable du trachome et le genre *chlamydophila* qui regroupe l'espèce *Cph. Pneumoniae*, responsable d'infections respiratoires et l'espèce *Cph.psittaci*, dont les réservoirs sont les oiseaux et certains mammifères (bovins, ovins, chats), à l'origine de la psittacose des oiseaux ; l'homme étant un hôte occasionnel, dont l'infection peut provoquer une pneumonie sévère (JATON.K et GREUB.G, 2005).

Ces trois espèces sont les principales rencontrées chez l'homme, alors qu'il en existe d'autres chez les animaux, tels que *Cph.abortus* à l'origine d'avortements, surtout chez les petits ruminants ou encore *Cph.pecorum* qui provoque des manifestations diverses chez de nombreuses espèces animales.

VII.2. méthodes de détection

Le diagnostic des infections à *Chlamydia* se fait classiquement par la culture sur milieu vivant (oeufs embryonnés, cultures cellulaires, animal sensible) d'un prélèvement pathologique, ou par la recherche d'anticorps chez le sujet malade.

Dans le premier cas, en plus des difficultés de mise en route et de la cherté de la technique, se pose le problème de la contamination du prélèvement par d'autres espèces bactériennes.

Dans le deuxième cas, les résultats ne sont pas toujours fiables car d'anciennes infections peuvent fausser les résultats (PRESCOTT.LM, 2003)

L'avènement des méthodes moléculaires, telle la PCR qui permet une identification directe à partir des échantillons cliniques, constitue une avancée considérable dans le diagnostic des maladies à *Chlamydia* qui repose sur la détection de gènes cibles portés par ces bactéries.

VII.2.1. Les gènes cibles

VII.2.1.1. gènes codant pour L'ARN ribosomal (ARNr)

Les ARNr s'associent à des protéines pour former des ribosomes qui, chez les procaryotes, sont constitués de deux sous unités (30S et 50S) : la sous unité 30S contient de l'ARNr 16S et la sous unité 50S contient les ARN 5S et 23S.

Chez les bactéries, les gènes qui codent pour les ARNr sont organisés en opérons, dont la structure est semblable : trois gènes, séparés par deux espaces, codent pour les ARNr 16S (gène *rss*), les ARNr 23S (gène *rrl*), les ARNr 5S (gène *rrf*) (EUZEBY.JP, 2006).

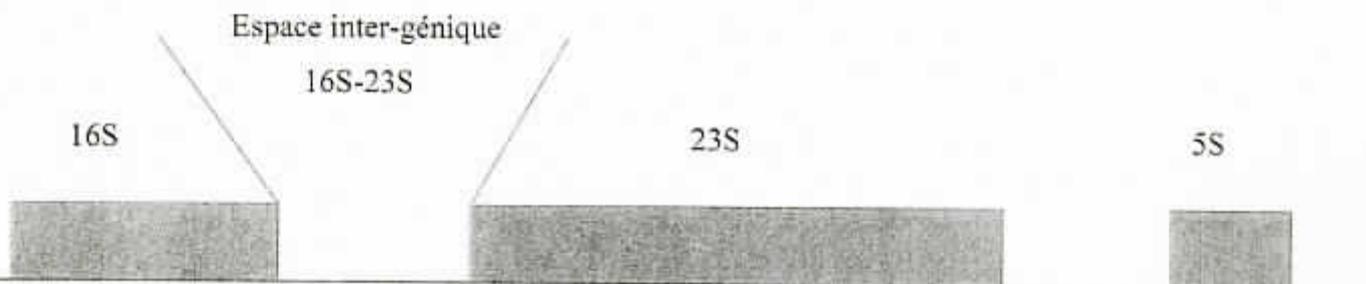


Figure 32: Organisation des gènes de l'ARNr chez les bactéries
(SCHASE.K et FREY.K, 2006).

Ces gènes ARNr se sont imposés dans le diagnostic moléculaire (EUZEBY.JP, 2006) et ce pour plusieurs raisons :

- ils sont abondants dans la cellule et faciles à purifier ;
- ils ont une structure bien conservée, car toute modification pourrait avoir des conséquences importantes sur les synthèses protéiques ;
- certaines séquences de l'ARNr sont identiques chez toutes les bactéries et donc utilisables comme sites de complémentarité pour des amorces de séquences universelles ; d'autres sont très conservées et sont propres à un genre ou une espèce, ce qui permet une identification plus précise.

La détection de la bactérie peut se faire, soit par la recherche de l'espace inter génique 16-23S de l'ARNr et il s'agira alors du diagnostic de *Chlamydiaceae spp*, soit alors par la recherche de

l'ARNr 16S pour un diagnostic d'espèces (*C.trachomatis*, *Cph.pneumoniae*, *Cph.psittaci*) (SCHASE.K et FREY.K, 2006).

Remarque : La recherche des gènes qui codent pour l'ARN ribosomal peut être appliquée pour le diagnostic de toutes les bactéries.

VII.2.1.2. Le gène ompA

Ce gène code pour la protéine majeure de la membrane externe (MOMP), qui joue un rôle dans l'adhésion de la bactérie à la cellule qu'elle infecte. La MOMP est organisée en quatre domaines variables, DV I, DV II, DV II, DV IV, séparés entre eux par des domaines constants (CORSO.D et LE FAOU.A, 2004), (DAUTRY-VARSAT.A, 2005).

Cette protéine est présente chez tous les membres de la famille des *Chlamydiaceae*, le diagnostic d'espèces repose donc sur la recherche de régions conservées de cette protéine.

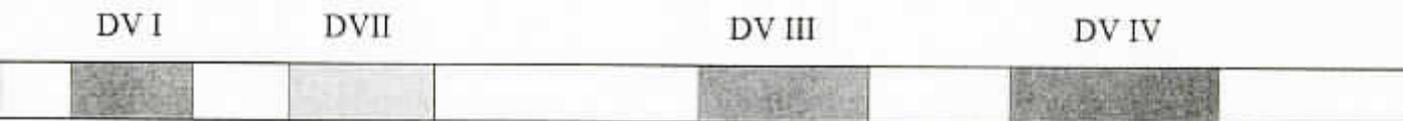


Figure 33: Organisation du gène ompA
(SCHASE.K et FREY.K, 2006).

VII.2.1.2.1. Détection

De nombreux essais ont été effectués, mais le plus concluant repose sur la réalisation d'une PCR nichée qui utilise comme cible deux régions différentes du génome de la bactérie.

La première amplification permet un diagnostic du genre alors que la seconde différencie les espèces au sein de celui-ci. (SCHASE.K et FREY.K, 2006).

CONCLUSION

Les techniques d'identifications mises à la disposition des microbiologistes évoluent sans cesse. Le développement des techniques de biologie moléculaire, notamment la PCR, a en particulier introduit de nouveaux moyens d'identification, basés sur la recherche de gènes qui caractérisent les bactéries ou qui sont responsables de leur pathogénicité.

Les séquences d'ADN ont été étudiées et des sondes complémentaires ont été fabriquées, afin de permettre une détection rapide des gènes caractéristiques éventuellement présents dans les prélèvements. La PCR 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. Elle s'applique aussi parfaitement à ceux qui ont une culture très lente ou lorsque les prélèvements sont polymicrobiens.

L'utilisation en routine de ces méthodes dites rapides est actuellement limitée aux germes les plus pathogènes, du fait du coût élevé de certains réactifs. De plus, peu parmi elles sont considérées comme des méthodes de référence et un résultat positif doit souvent être confirmé par les méthodes traditionnelles.

L'utilisation de la biologie moléculaire en bactériologie (alimentaire et médicale) permet tout d'abord un gain réel de temps, ce qui devrait permettre un traitement adapté plus précoce, une commercialisation plus rapide des denrées périssables et au total une baisse significative des coûts.

Malgré leur lenteur et certaines lacunes, comme par exemple l'impossibilité dans certains cas de distinguer une souche pathogène d'une souche saprophyte, les techniques d'isolement et d'identification bactériennes classiques gardent un avantage pour l'instant, car les germes sont isolés vivants et dénombrés et permettent donc une prise de décision fiable.

Les techniques rapides progressent sensiblement et ouvrent des perspectives insoupçonnées et des champs d'application très vastes ; leurs utilisations sont de plus en plus importantes dans les pays développés et elles deviendront dans un avenir proche, incontournables.

En Algérie, elles commencent à être utilisées dans le domaine vétérinaire, notamment dans le diagnostic de la grippe aviaire et de la Blue tongue. Elles sont également utilisées en médecine humaine, pour le diagnostic de certaines maladies génétiques. Elles sont appelées à connaître, comme partout ailleurs, un grand essor.



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ALBERTS B., BRAY D., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K., JOHNSON A., WATSON JD, 2004 : biologie moléculaire de la cellule.4^{ème} édition, MEDECINE-SCIENCES FLAMMARION, pages 238,240.

ALBERTS., BRAY., HOPKIN., JOHNSON., LEWIS., RAFF., ROBERTS., WALTER, 2005 : l'essentiel de la biologie cellulaire.2^{ème} édition, MEDECINE-SCIENCES FLAMMARION, page 336.

ANONYME, 2005 : GENET, réseau d'enseignement en génétique. Les outils de génétique moléculaire. Techniques liées aux acides nucléiques.
Adresse URL : <http://genet.univ-tours.fr/index.htm>

ANONYME, 2006a : biopuces à acides nucléiques pour la détection et la caractérisation des microorganismes. Institut de recherche en biotechnologies. Canada.
Adresse URL : <http://irb-bri.cnrc.gc.ca/business/top>

ANONYME, 2006b : Fiche d'information en ligne. La PCR
Adresse URL : <http://www.ilm.pf/fi-pcr.html>

ANONYME, 2006c : polycopié de cours de l'école nationale vétérinaire de Belgique, pages 1-50.

ANONYME, 2006d : catalogue protéomique solutions en lignes.
Adresse URL : http://catalogue.proteomicsolutions.fr/PCR_primus96.html

ANONYME, 2007a: ADN polymérase.
Adresse URL: http://fr.wikipedia.org/wiki/ADN_polym%C3%A9rase

ANONYME, 2007b : réplication de l'ADN. Origine et terminaison de la réplication.
Adresse URL : http://pages.usherbrooke.ca/vdory/pdf/BCM_300_11.PDF

BAGORY M, 2006 : PCR et PT-PCR quantitative en temps réel. Publication, pages 1-5.
Adresse URL : <http://www.creatis.insalyon.fr/~bagory/documents/La%20PCR%20et%20RT-PCR%20quantitative%20temps-reel.pdf>

BERARDIN M, 2005 : caractérisation des souches d'*E.coli* producteurs de shigatoxines (STEC) isolés de fromages au lait cru Français et génotypes des variants stx d'une collection d'*E.coli* O 157 :H7. Mémoire de l'école pratique des hautes études, pages 8-32.
Adresse URL : http://www.ephe.univmontp2.fr/site_html/Site%20EPHEAUF/monographies_html/manuscrits/biol_cell&mol_html/dip_berardin_icrc05.htm

BERCHE P, 2002 : cours de bactériologie médicale de la faculté de médecine Necker-enfants malades, Paris V, pages 1-8.
Adresse URL : <http://www.microbes-edu.org/etudiant/listeriam.html#haut>

BERNARD J., REYNAUD A, 2003 : Entérobactéries, systématique et méthodes de diagnostic. TEC et DOC édition médecine médicale et internationale, pages 31-38.

BERNOT A., 2001 : analyse de génomes, transcriptomes et protéines. 3^{ème} édition, page 4.

BISOGNANO C, 2000 : impact de la résistance antibiotique et des fluoroquinolones sur l'adhérence à la fibronectine de *Staphylococcus aureus* : étude fonctionnelle et mécanismes moléculaires. Thèse de l'université de Genève.

Adresse URL :

http://www.unige.ch/cyberdocuments/theses2001/BisognanoC/these_front.html

BOGARD M., LAMORIL J, 1999 : biologie moléculaire en biologie clinique. Tome I, collection option/bio. Editions ELSEVIER, page 94.

BORDE I, 2006 : biologie moléculaire et génétique. La PCR. Université PIERRE et MARIE CURIE.

Adresse URL : <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/PCR/index.htm>.

BOURBONNAIS G, 2007 : cours de biologie en ligne. Cégep de Saint Foy. Les nucléotides

Adresse URL :

<http://ici.cegep-ste-foy.qc.ca/profs/gbourbonnais/pascal/nya/genetique/notesadn/adn3.htm>

BOURBONNAIS G, 2007 : cours de biologie en ligne. Cégep de Saint Foy. L'ADN dans la cellule.

Adresse URL :

<http://ici.cegep-ste-foy.qc.ca/profs/gbourbonnais/pascal/nya/genetique/notesadn/adn5.htm>

BOURBONNAIS G, 2007 : cours de biologie en ligne. Cégep de Saint Foy. La réplication.

Adresse URL :

<http://ici.cegep-ste-foy.qc.ca/profs/gbourbonnais/pascal/nya/genetique/notesadn/adn6.htm>

BROGNIEZ-COLIN C, 2005 : diagnostic par PCR dans l'espèce canine : application à la CLAD chez le SETTER IRLANDAIS. Thèse de l'école nationale vétérinaire de Lyon, pages 14-43.

Adresse URL : http://www.vet-lyon.fr/bib/fondoc/th_sout/listhe_sout.php

CALVET C ; cours de biologie ESPCI ; biologie moléculaire ; réplication de l'ADN.

Adresse URL : http://www.bio.espci.fr/scolarité/c_BIO/mol/mol12.htm

CHINA B., GHAFIR Y., DAUBE G, 2002 : estimation qualitative et quantitative par amplification génétique des bactéries présentes dans les denrées alimentaires. Article de synthèse. Université de Liège.

Adresse URL : http://www.facmv.ulg.ac.be/amv/articles/2002_146_2_04.pdf

CHINA B., DAUBE G., DE SCHAETZEN M-A, 2003: les mollusques bivalves des aliments dangereux ? Université de Liège, faculté de médecine vétérinaire. Laboratoire de microbiologie des denrées alimentaires, pages 1-8.

Adresse URL : http://www.facmv.ulg.ac.be/amv/articles/2003_147_6_05.pdf

CORSO.D, LE FAOU.A, 2004: *Chlamydia*.TEC et DOC édition médecine médicale et internationale, page 20

DAUTRY-VERSAT.A, 2005 : étude des mécanismes moléculaires de l'entrée des *Chlamydia*. Rapport d'activité de l'institut Pasteur.

Adresse URL : <http://www.pasteur.fr/recherche/RAR/RAR2005/Ubic.html>

DEVILARD E, 2002 : étude du transcriptome dans la maladie d'HODGKIN. Mémoire de l'école pratique des hautes études, pages 12-17.

Adresse URL : http://www.ephe.univ-montp2.fr/site_html/Site%20EPHE-AUF/monographies_html/manuscrits/biol_cell&mol_html/dip_devilard_gmp02.html

DURANT G., FREZET S, 2003 : biologie moléculaire en routine au laboratoire de bactériologie, page 12.

Adresse URL :

http://umr5558-mq1.univ-lyon1.fr/moindata/dpbdes/attachts/S_e9minairesBact_e9rio_2fBiologieMol_e9culaireEnRoutine/attachments/Biologie_moleculaire.pdf.

EUZEBY JP, 2000 : dictionnaire de bactériologie alimentaire. *Listeria*

Adresse URL : <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/l/listeria.html>

EUZEBY JP, 2006 : dictionnaire de bactériologie vétérinaire. Définition d'une génospecies et d'une espèce bactérienne.

Adresse URL: <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/genomospecies.html>

FISCHER DJ., POON R., UZAL FA., ADAMS V, 2006: dissecting the contributions of *Clostridium perfringens* type C toxins to lethality in the mouse intravenous injection model. Department of molecular genetics and chemistry. University of Pittsburgh School of medicine.

Adresse URL: <http://iai.asm.org/cgi/content/full/74/9/5200?view=long&pmid=16926413>

FRANCINA A. ; 2003 ; polycopié de biologie moléculaire. Les ADN. Faculté de médecine Grande Blanche.

Adresse URL : <http://spiral.univ-lyon1.fr/polycops/BiologieMoleculaire/index.html>

FRANCINA A. ; 2003 ; polycopié de biologie moléculaire. Les techniques de base de la biologie moléculaire. Faculté de médecine Grande Blanche.

Adresse URL : <http://spiral.univ-lyon1.fr/polycops/BiologieMoleculaire/index.html>

FREEMAN WH, 2004: life: the science of biology. Seventh edition. Nucleic acid hybridization. HUMANA PRESS, page 321.

FREIFELDER D, 1990 : biologie moléculaire. MASSON édition, pages 31-35.

GAUTHIER D, 2006 : introduction aux techniques utilisées en biochimie.

Adresse URL : <http://www.chimie-biochimie.umoncton.ca/bch/dg/siitub/electro.html>

GREZEL D, 2007 : polycopié de cours de microbiologie et d'immunologie de l'école nationale vétérinaire de Lyon.

Adresse URL :

http://www.vet-lyon.fr/ens/expa/microbio_immuno/m_virulence.html#virulence

GRIFFITHS., MILLER., SUZUKI., MATSUDAIRA., DARNELL, 2002 : introduction à l'analyse génomique. 3^{ème} édition. De Boeck édition, page 262.

GRIFFITHS AJF., GELBART WM., MILLER JH., LEWONTIN RC., 2001 : analyse génétique moderne. De Boeck, pages 86-90.

HARTL DL., JONES EW., 2003 : génétique les grands principes. 3^{ème} édition, DUNOB édition, pages 7-230.

HERON JF, 2001 : ressources pour l'enseignement des SVT. Réplication de l'ADN. Institut national de recherche pédagogique.

Adresse URL : <http://www.inrp.fr/Acces/biotic/genetic/adn/html/points3.htm#replication>

HURET JP, 2006: Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. ADN structure moléculaire.

Adresse URL : <http://atlasgeneticsoncology.org/Educ/DNAID30001FS.html>

JATON K., GREUB G, 2005 : *Chlamydia* : signes d'appel, diagnostic et traitement. Revue médicale suisse. Revmed.ch, No 13.

Adresse URL : <http://titan.medhyg.ch/mh/formation/article.php3?sid=30280#top>

KANTATA ZADA B., MANSOURY K., TROCOLI A., LAPORTE R, 2006 : techniques d'identification. Université de Bordeaux.

Adresse URL :

<http://twiki.alpha.u-bordeaux1.fr/twiki/bin/view/GleevecGroupe2/WebHome#tech>

LACOURREGE G, 2006 : plate-forme puce à ADN. Principes des puces.

Adresse URL : <http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF2/principe.html>

LAMPRELL H, 2003 : production des enterotoxines dans le fromage en fonction de la diversité phénotypique et génétique des souches de *Staphylococcus aureus*. Thèse de l'école doctorale des sciences de la vie et de la santé, spécialité science des aliments.

Adresse URL : <http://www.inra.fr/theses/theses-integral.html>

LARPENT JP, 1997 : microbiologie alimentaire techniques de laboratoire, page 62-67.

LEFEVRE PC, BLANCOU J, CHERMETTE R ; 2003. Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail. Réaction d'amplification en chaîne par polymérase, pages 217, 218.

LODISH H., BALTIMORE D., BERK A., ZIPURSKY SL., MATSUDAIRA P., DARNELL J, 1995: molecular cell biology. 3^{ème} édition. De boeck édition, page 35.

LODISH., BALIMORE., BERK., ZIPURSKY., MATSUDAIRA., DARNELL, 2000 : biologie moléculaire de la cellule. De Boeck édition, pages 108-378.

MANGE D, 2002 : cours réseaux cellulaires. Introduction à la biologie moléculaire.
Adresse URL : http://ludwig-sun1.unil.ch/~vjongene/molbio/chapt_6.htm

MARIANI-KURKDJIAN P, 2000 : infections à *Escherichia coli*, producteurs de vérotoxines.

Adresse URL :

<http://209.85.135.104/search?q=cache:VtTEt85F7OEJ:www.medspe.com/site/articles/20020219/article1/mariani.pdf%3FPHPSESSID%3Dad+Mariani+kurkdjian:+pyrexie&hl=fr&ct=clnk&cd=2&gl=fr>

MASSELOT, 2007 : cours de génétique en ligne. Gènes et génomes. Université PIERRE et MARIE CURIE.

Adresse URL :

http://www.edu.upmc.fr/sdv/masselot_05001/polymorphisme/microsatellites.html

MBEGUIE-A-MBEGUIE D, 2000 : isolement, identification et caractérisation des gènes impliqués dans la maturation de l'abricot. Thèse de l'université de droit, d'économie et des sciences d'Aix Marseille. INRA

Adresse URL : <http://www.inra.fr/theses/these-integrale/Theses/mbeguiе/html/these.html>

MORNET E, 2007 : support de cours. Méthodes d'analyse de l'ADN. Laboratoire de cytogénétique et génétique moléculaire humaine et laboratoire SESEP.

Adresse URL : http://www.sesep.uvsq.fr/formation/cours_online.html#methodes2

POITRAS E., HOUDE A, 2002 : la PCR en temps réel : principe et applications. Reviews in biology and biotechnology by the moroccan society of biology in .Vol2, No2, December 2002. pages 2- 11.

PRESCOTT. , HARLEY. ; KLEIN. ; 2003 : Microbiologie. De boeck. 2eme édition, Pages 54-992.

RENOUF V, 2006 : description et caractérisation de la diversité microbienne durant l'élaboration du vin : interactions et équilibres- relation avec la qualité du vin. Thèse de l'institut national polytechnique de Toulouse, pages 72-77, 114-120.

Adresse URL : <http://ethesis.inp-toulouse.fr/archive/00000340/>

RENZONI A., MANDIN P., SPRINGER M., COSSART P, 2002 : *Listeria*, découverte d'un nouveau mécanisme de régulation. Unité des interactions bactéries –cellules, institut pasteur, Paris. Institut de biologie physico- chimique, Paris.

Adresse URL : <http://www.gazettelabo.fr/2002archives/breves/2002/0902/pasteurlisteria.htm>

ROSSEL R., LE ROUX A., DE MONTZEY S., BOUVET J., MONTET MP., VERNOZY-ROZAND C, 2001 : E.coli verotoxiques : E.coli O157 :H7 et autres. Pas de risque majeur en abattage- découpe de porc

Adresse URL : [www.office-elevage.fr/vpc/225/pas22\(5\).pdf](http://www.office-elevage.fr/vpc/225/pas22(5).pdf)

SACHSE K., FREY J, 2006: methods in molecular biology, volume 216. PCR détection of microbial pathogens. HUMANA PRESS, pages 11-750.

SAWIRES YS., SONGER JG, 2005 : clinical microbiology. *Clostridium perfringens* : insight into virulence evolution and population structure. Department on veterinary science and microbiology university of Arizona.

Adresse URL : <http://microvet.arizona.edu/Faculty/songer/pop.pdf>.

SIATKA C, 2006 : la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) : principes et applications. L'école de l'ADN. Nîmes

Adresse URL : <http://www.congres-des-sciences.be/archives/2006/DOC-Siatka.pdf>

STIEGLER V, 2003 : méthodes de détection des salmonelles en agro-alimentaire. Thèse de l'école nationale vétérinaire de Lyon, pages 41-54.

Adresse URL : http://www.vet-lyon.fr/bib/fondoc/th_sout/listhe_sout.php

SUAU-PERNET A., MANGE F, 2007 : biologie moléculaire de la cellule : cours de biologie moléculaire BGL106.

Adresse URL : <http://www.cnam.fr/depts>

scbn/biologie/cours/blg106/coursblg106/coursblg106_021006.pdf

SUTRA L., FEDERIGHI M., JOUVE JL, 1998 : manuel de bactériologie alimentaire. Polytechnica édition, pages 63-143.

VERDIER I., LINA G., GILLET Y., VANDENESCH F, 2002 : cours de bactériologie médicale. Centre national de référence des Staphylocoques, faculté de médecine Laennec-Lyon. Service de pédiatrie, hôpital Edouard Herriot, Lyon.

Adresse URL : <http://www.microbes-edu.org/etudiant/staph.html#haut>

VERNOZY-ROZAND C., BOUVET J, 2000 : méthodes génétiques de détection des *Escherichia coli* verotoxiques (VTEC) et des *Escherichia coli* O157 :H7 dans les aliments. Unité de microbiologie alimentaire et prévisionnelle de l'école nationale vétérinaire de Lyon

VERNOZY-ROZAND C., MONTET MP, 2001 : *Escherichia coli* O157 : H7 .TEC et DOC édition médecine médicale et internationale, pages 32, 33.

VERNOZY-ROZAND C., SERVANE R, 2003 : bilan des connaissances relatives aux *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC)

Adresse URL : <http://www.afssa.fr/ftp/afssa/basedoc/STEC25avril.pdf>

VERNOZY-ROZAND C, 2007 : sécurité alimentaire, la petite bête qui monte qui monte

Adresse URL : http://www.vet-lyon.fr/pre/vetolyon/archive/secu/s_01_10.html

WATSON., HOPKINS., ROBERTS., STEITZ., WEINER, 1989 : biologie moléculaire du gène. 4^{ème} édition. Inter édition, pages 320-322.

WEIGHARDT F, 2005 : analyse d'échantillons alimentaires pour la présence d'organismes génétiquement modifiés. PCR quantitative pour la détection d'OGM.

Adresse URL : <http://gmtotraining.jrc.it/docs/Manual%20FR/Module%2010.pdf>

RESUME

L'identification des bactéries repose classiquement sur un ensemble de tests morphologiques et biochimiques ; cette procédure est longue et l'interprétation parfois difficile. Le diagnostic des agents pathogènes par la PCR et ses variantes, reposant sur la détection de certains de leurs gènes caractéristiques, a été développé depuis peu et donne des résultats fiables et rapides. Le gain de temps considérable, obtenu par ces techniques, dans le diagnostic des pathogènes responsables de maladies infectieuses ou présents dans des aliments contaminés, est très important lorsqu'il s'agit de prendre des décisions sanitaires ou hygiéniques.

Dans ce travail bibliographique, nous avons d'abord rappelé les notions nécessaires à la compréhension de ces méthodes moléculaires puis nous avons décrit les principales techniques utilisées. Nous avons enfin, développé des exemples de pathogènes importants mis en évidence par ces méthodes, avec à chaque fois, la description des gènes considérés et des moyens pratiqués pour leurs détections.

ABSTRACT:

Micro-organisms identification is classically based on morphological and biochemical tests which may takes long time and give difficult interpretation. The development of molecular biology offered new identification techniques where the analyses are based on significant and specific criteria as nucleotidic sequences of the nucleic acids. Nucleotidic sequences are identified (in the samples) after hybridization with complementary nucleotidic probes or after amplification.

The PCR (Polymerase Chain Reaction) or polymerization in chain is an *in vitro* method allowing elective amplification of a DNA sequence, using two starters located on both extremities of the considered area and a thermostable polymerase DNA.

Using molecular biology tools for diagnosis of pathogenic bacteria in food and biological products allowed a considerable profit of time and the identification of pathogenic germs not detectable with classical cellular cultures.

مختصر

يرتكز تشخيص الكائنات المجهرية تقليدياً على مجموعة من التجارب التشخيصية والكيميائية الأحيائية؛ يمكن أن يظهر هذا الإجراء طويلاً و التأويل صعباً في بعض الأحيان. لقد وفر علم الأحياء الجزيئي تقنيات جديدة للتشخيص؛ تركز التحليل على مقاييس حساسة و نوعية (موضوعية) التي هي نظم تسلسلية لمركبات أولية لأحماض النويات. تعين هذه الخيرة في العينات بعد التهجين بواسطة سابرات نواتية مكملة أو بعد التضخيم. يعتبر تفاعل تعدد تجمع الجزيئات التسلسلي كيفية تجرى في وسط اصطناعي و تمكن من التضخيم الانتقائي لنظام تسلسل الحامل المادي للوراثة بفضل طعم لكل من جانبي المنطقة المعنية و حامل المادي للوراثة الخميرة المستقرة حرارياً. إن استخدام آلات علم الأحياء الجزيئي لتشخيص الجراثيم المرصدة ضمن الأغذية و المنتوجات الأحيائية قد مكنت من ربح جد معتبر للوقت و من تسليط الضوء على الجراثيم المرصدة التي لم يتم كشفها بواسطة الزرع الخلوي.