

ÉCOLE NATIONALE SUPÉRIEURE VÉTÉRINAIRE

Projet de fin d'études

En vue de l'obtention du
Diplôme de Docteur Vétérinaire

LA PCR EN ALGERIE

Présenté par : **DEROUICHE Lamis**

HEROUI Chahinez

Soutenu le : **25/06/2018**

Devant le jury composé de:

- | | |
|------------------------------------|--------------------------------|
| - Président : HACHEMI Amina | Maître assistant A (ENSV) |
| - Promoteur : MIMOUNE Nora | Maître de Conférences A (ENSV) |
| - Examineur 1: BAAZIZI Ratiba | Maître de Conférences B (ENSV) |
| - Examineur 2 : ADDAD Salah Eddine | Docteur Vétérinaire |

Année universitaire : 2017/2018

Résumé

La PCR est une technique de la biologie moléculaire qui a révolutionnée les approches scientifiques, qui évolue sans cesse depuis sa découverte mais pour l'Algérie n'a pas été insérée qu'en 2004. Pour cela, l'objectif de cette étude est de réaliser une enquête en moyen d'un questionnaire à l'intention des responsables et personnels de laboratoire soit dans le domaine hospitalier ou bien le domaine vétérinaire, pour but de sensibiliser la communauté scientifique (praticiens, étudiant) et d'apporter une contribution à la connaissance les pratiques de la PCR et son statut dans les différents centres d'analyses en Algérie.

Le questionnaire comporte 13 questions, distribué sur 4 structures : hôpital El Kattar, CHU Mustapha Bacha (service microbiologie et service virologie), laboratoire privé et l'Institut National de la Médecine Vétérinaire (INMV), dont les responsables de laboratoire ont collaborés a la réalisation de cette enquête.

D'après les responsables des structures visitées, les types de PCR utilisés sont: la PCR en temps réel, PCR conventionnel et la PCR en point final.

Le plus grand effectif de tests réalisés se trouve au niveau de l'hôpital El Kattar (alger) avec 800 tests par mois soit environ 5000 tests par an suivi respectivement par les autres centres d'analyses : CHU Mustapha Bacha (exactement service de virologie) avec 230 tests par mois, Institut National de la Médecine vétérinaire avec 68 tests par mois soit 816 tests par an et en dernier laboratoire privé (Alger) avec 14 tests par mois.

Pour l'ensemble des structures, l'usage de la PCR s'arrête dans le diagnostique des maladies virales, bactériennes, parasitaires, la détection des résistances aux antibiotiques (CHU Mustapha Bacha-service microbiologie) et la recherche de l'ADN provirale (l'hôpital El Kattar).

La deuxième partie de ce travaille est de comparer les résultats obtenus avec celle qui a été faite en 2016 par TOBAL afin d'apprécier le statut de la PCR et sa progression en Algérie.

On arrive à conclure que la progression de la PCR en Algérie durant ces dernières années reste toujours limitée par rapport aux pays développés dans le domaine de biologie moléculaire ce qui pousse à demander des accès à des formations adéquates afin de développer les techniques de biologie moléculaire autre que celle de la PCR dans des domaines plus vastes.

Mots-clés : PCR-ALGERIE- ENQUETE-INMV-EL KETTAR-MUSTAPHA BACHA-LABORATOIRE PRIVE.

الملخص

رد فعل سلسلة البلمرة (PCR) هو تقنية للبيولوجيا الجزيئية التي أحدثت ثورة في الأساليب العلمية. تم اختراع هذه التقنية في عام 1985. ومنذ ذلك يتطور باستمرار ولكن لم يتم إدراجه في الجزائر حتي عام 2004. لهذا، فإن الهدف من هذه الدراسة هو إجراء تحقيق باستخدام الاستبيان موجه إلى مسؤولي وموظفي المختبر سواء في المستشفيات أو في مجال الطب البيطري لتوعية المجتمع العلمي (الممارسين ، والطلاب) و تقديم مساهمة في معرفة ممارسات ال PCR ووضعها في مختلف مراكز التحليل في الجزائر. ويتضمن الاستبيان 13 سؤالا موزعة على 4 هياكل: مستشفى القطر ، مستشفى مصطفى باشا (مختبر علم الأحياء الدقيقة ومختبر علم الفيروسات)، والمختبرات الخاصة والمعهد الوطني للطب البيطري (INMV) ، الذي تعاون فيه مسؤولي المختبرات لانتهاه من هذا المسح.

وفقا لمديري الهياكل التي تمت زيارتها، فإن أنواع PCR المستخدمة هي: PCR في الوقت الفعلي، PCR التقليدي و PCR عند نقطة النهاية.

أكبر عدد من الاختبارات يوجد في مستشفى القطر(الجزائر) مع 800 الاختبارات شهريا أو ما يقرب من 5000 الاختبارات سنويا تليها على التوالي من قبل غيرها من مراكز التحليل: مستشفى مصطفى باشا (خدمة الفيروسات بالضبط) مع 230 اختبار شهريًا ، المعهد الوطني للطب البيطري مع 68 اختبارًا شهريًا أو 816 اختبارًا سنويًا وأخيرا المختبر الخاص (الجزائر) مع 14 اختبارًا شهريًا.

في جميع الهياكل، استخدام ال PCR يتوقف في تشخيص الامراض الفيروسية، البكتيرية والطفيلية، والكشف عن مقاومة المضادات الحيوية (علم الأحياء الدقيقة CHU مصطفى خدمة باشا) والبحث عن الحمض النووي proviral (مستشفى القطر).

الجزء الثاني من هذا العمل هو مقارنة النتائج التي تم الحصول عليها في عام 2016 من قبل توبال لتقييم وضع تقارير إنجاز المشروعات وتقديمها في الجزائر.

يمكننا أن نستنتج أن التقدم المحرز في PCR في الجزائر في السنوات الأخيرة لا يزال محدودا مقارنة بالدول المتقدمة في مجال البيولوجيا الجزيئية التي تتطلب طلب الحصول على التدريب الكافي لتطوير تقنيات البيولوجيا الجزيئية الأخرى غير ال PCR في نطاق اوسع.

Abstract

PCR is a technique of molecular biology that has revolutionized scientific approaches. This technique was devised by the American scientist Kary Mullis and developed by Dr. HA Herlich with the collaboration of the company Cetus in 1985. Since then, it has been evolving constantly but for Algeria was not inserted until 2004. For this, the objective of this study is to carry out a survey by means of a questionnaire to the intension of the managers and laboratory personnel either in the field hospital or the veterinary field, in order to sensitize the scientific community (practitioners, students ...) and make a contribution to the knowledge of the practices of the PCR and its status in the various analysis centers in Algeria. The questionnaire consists of 13 questions, distributed on 4 structures: El Kattar hospital, Mustapha Bacha University Hospital (microbiology and virology department), private laboratory and the National Institute of Veterinary Medicine (INMV), whose laboratory managers collaborated with the completion of this survey.

According to the managers of the structures visited, the types of PCR used are: real-time PCR, conventional PCR and end-point PCR.

The largest number of tests carried out is at the El Kattar hospital (Algiers) with 800 tests per month or about 5000 tests per year followed respectively by the other centers of analysis: CHU Mustapha Bacha (exactly virology service) with 230 tests per month, National Institute of Veterinary Medicine with 68 tests per month or 816 tests per year and last private laboratory (Algiers) with 14 tests per month.

For all structures, the use of PCR stops in the diagnosis of viral, bacterial, parasitic diseases, the detection of antibiotic resistance (Mustapha Bacha-microbiology service center) and the search for proviral DNA (El Kattar Hospital).

The second part of this work is to compare the results obtained with that made in 2016 by TOBAL to assess the status of the PCR and its progress in Algeria.

We can conclude that the progress of the PCR in Algeria in recent years is still limited compared to developed countries in the field of molecular biology which requires to request access to adequate training to develop molecular biology techniques other than that of PCR in larger areas.

Keywords: PCR-ALGERIA- INQUIRY-INMV-EL KETTAR-MUSTAPHA BACHA-PRIVATE LABORATORY.

Remerciement

- On remercie dieu tous puissant de nous avoir donné la santé et la volanté d'entamer et de terminer ce mémoire.
- Tout d'abord ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu avoir le jour sans l'aide et l'encadrement de **Mme Mimoune Nora**, on la remercie pour la qualité de son encadrement exceptionnel, pour sa patience, sa rigueur et sa responsabilité durant notre préparation de ce mémoire.
- On remercie également **Dr HACHEMI A.** d'avoir fait honneur de sa présence comme président de notre jury. Tous nos remerciements.
- Un grand merci pour **Dr ADDAD S.E** et **Dr BAAZIZI R.** d'avoir accepter d'être les examinateurs de ce travail. remerciement respectueux.
- On tient à remercier les personnels du laboratoire de **PINMV** pour leur accueil et de nous avoir fournit les informations nécessaire à notre recherche et d'avoir répondu à nôtres questionnaire. Tous nous sincères remerciements.
- Un grand merci à **Pr GOURARI S.** médecin virologue à l'hôpital Mustapha Bacha de nous avoir renseignés et répondu à notre questionnaire qui nous a servie dans notre recherche. Tous nos remerciements chaleureux.
- Tous nous remerciement à **Dr OUERDANE**, responsable du laboratoire de l'hôpital d'El KETTAR de nous avoir accueillis chaleureusement et d'avoir pris le temps de répondre à nos questions.

Dédicace et Remerciement

- A mes chers parents, source de mes joies, secrets de ma force, merci pour tous vos sacrifices pour que vous enfants grandissent et prospèrent.
- A mes deux petites sœurs **INES** et **SARRA**, en témoignage de l'attachement, de l'amour et de l'affection que je porte pour vous.
- A tous les membres de la famille, merci pour votre encouragement.
- A mes chers amis(e) : **Ward, Katia, Radia, Saliha, Mounia, Chahra, Zineb, Imene, Basma**, je ne peux trouver les mots justes pour vous exprimer mon affection. En témoignage de l'amitié qui nous uni et des souvenirs de tous les moments que nous avons passé ensemble.

Je vous dédis ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.

DEROUICHE LAMIS

Dédicace et Remerciement

Je dédie ce modeste travail :

A mes parents aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de l'amour dont ils ne cessent de me combler. Que dieu leur procure bonne santé et longue vie

A celui que j'aime beaucoup qui m'a soutenue tout au long de ce projet : mon fiancé **Juba**.

Et bien sur à mes sœurs **DIHYA, OUAHIBA, FAHIMA, HANENE et IMENE**. Sans oublier mes beaux parents que j'aime.

Aux personnes qui m'ont toujours aidé et encouragé, qui étaient toujours à mes côtés, et qui m'ont accompagnés durant mon chemin d'études supérieur, mes aimables amies, collègues d'études, toi **LAMIS, KATIA, kamylia, RADHIA, ZINEB, SALIH, CHAHRAZED, KHOUIRA, MANARE** et à toi cher ami **WARD** tes conseils m'ont servi énormément.

Aux personnels de ma Bibliothèque, surtout **YACINE**, merci d'avoir toujours été à notre service

A la mémoire de notre très chère camarade, **IDRIS ROMAÏSSA**. Que dieu te garde dans son vaste paradis

HEROUI CHAHINEZ

La liste des tableaux

1. les types d'enzymes utilisés en PCR.....p03
2. comparaison entre PCR et la réplication d'ADN in vivo.....p07
3. Exemples de pathogènes fréquents pour lesquels une PCR peut êtrep28
Indiquée pour le diagnostic
4. Germes et molécules les plus fréquemment recherchés par PCR.....p36
5. Nombre de tests effectuées /mois par rapport aux demandes en 2016.....p40
6. Durée de remise des résultats et le prix des analyses pourp41
Chaque établissement.

La liste des figures

Figure1 : dénaturation des deux brins

Figure2 : L'hybridation

Figure3 : l'élongation d'un fragment d'ADN

Figure4 : la sélection d'une séquence cible par un logiciel

Figure5 : purification d'ADN

Figure6 : électrophorèse sur gel d'agarose

Figure7 : visualisation des fragments d'ADN après électrophorèse

Figure8: identification d'ADN à partir du poids moléculaire

Figure9: PCR quantitative

Figure10: principe de la technique de LAPM

Figure11: détection des produits de la LAMP

Figure 12: Schéma des différentes étapes d'un Southern blot

Figure 13: illustration de la technique Southern Blot

Figure 14: illustration de la technique Mismatch

Figure 15: illustration de la technique de RFLP

Figure16: COBAS : Extracteur et amplificateur en temps réel

Figure 17: COBAS TaqMan 48 : extracteur semi automatique en temps réel

Figure 18: Sacace SaMag-12 : extracteur semi automatique en temps réel (détection des mutations génétiques)

Figure19: Sacace : amplificateur en temps réel associé à un ordinateur programmé

Figure20: Rotor-Gene Q (QIAGEN) : extracteur manuel en temps réel

Figure21: amplificateur et extracteur automatique en temps réel

Figure22 : appareil d'amplification d'ADN (dénaturation, hybridation, élongation)

Figure 23: rapport mensuel de l'utilisation de PCR au niveau des structures visitée

Figure24: pourcentage du nombre de tests effectués par mois dans les différents centres d'analyse sur la wilaya d'Alger

Figure25: Nombre de personnels formés pour chaque structure visitée

Liste des abréviations

PCR : Réaction en chaîne par polymérase

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

TAQ : Extraite de la bactérie thermophile, *thermus aquaticus*

RT-PCR : Reverse transcription-PCR

RFLP : Restriction fragment length polymorphisme

OIE : World organisation of animal health

UTP : Uridine triphosphate

UNG : Uracile-N-glycosylase

PFU : Extraite de bactérie thermophile, *Pyrococcus furiosus*

ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay

TMB : Tétraméthyl benzidine

ABTS : Acide 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6 sulphonique)

R° : réaction

LAMP : Loop-mediated isothermal amplification of DNA

INMV : Institut national de la médecine vétérinaire

IA : influenza aviaire

IBR : rhino-trachéite infectieuse bovine

NDV : virus de la New Castle

PPR : peste des petits ruminants

BTV : virus de la Bleu Tongue

FMD : fièvre aphteuse

RVF : rift valley fever

WND : West Nile Disease

VHB : virus de l'hépatite B

VHC : virus de l'hépatite C

CMV : cytomégalovirus

HSV : Herpes simplex *v*irus

HIV : immunodéficie humaine virus

SOMMAIRE

Introduction générale

Partie Bibliographique

I.	Définition.....	p02
II.	Historique et principe.....	p02
	1. Historique.....	p02
	2. Principe et description de la technique.....	p04
	a) Dénaturation.....	p04
	b) Hybridation.....	p04
	c) Elongation.....	p04
III.	Contrôle de la réaction.....	p08
	a) Les risques de contamination et prévention.....	p08
	b) Les inhibiteurs de la réaction.....	p09
IV.	Fidélité = Taux d'erreur.....	p10
V.	Détection des produits de PCR.....	p11
	a) L'électrophorèse.....	p11
	b) PCR-ELISA.....	p12
VI.	Les variétés des PCR	p13
	a) PCR en temps réel.....	p13
	b) PCR multiplex.....	p14
	c) La PCR emboîté.....	p14
	d) PT-PCR.....	p15
	e) RT-PCR in situ.....	p15
	f) La LAMP.....	p15
	1. Technique	p16
	2. Avantage.....	p18
	3. Limites.....	p19
VII.	Application de la PCR dans le diagnostic.....	p20
	A. Maladies génétiques.....	p20
	1. Technique southern Blot.....	p22
	2. Technique Mismatch.....	p24
	3. Technique RFLP.....	p26

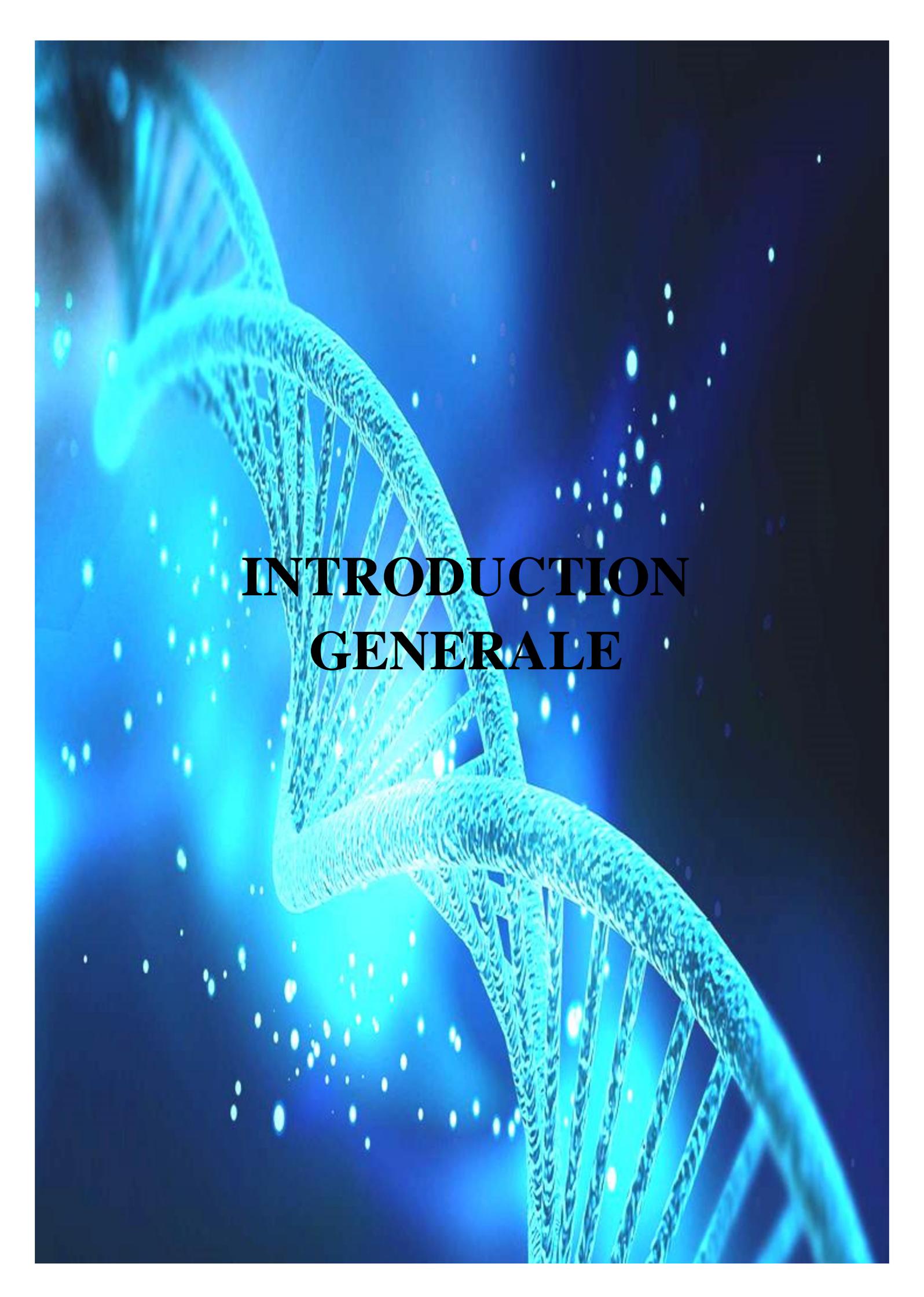
	B. Maladies infectieuses	p27
VIII.	Application de la PCR dans divers domaines.....	p28
	A. Domaine légale.....	p29
	B. Domaine vétérinaire.....	p30
	C. Domaine agricole.....	p30

Partie Expérimentale

I.	Matériels et méthodes.....	p31
II.	Résultats et discussion.....	p32
III.	Conclusion et recommandation.....	p44

Références Bibliographiques

Annexe

A glowing blue DNA double helix structure is the central focus, set against a dark blue background filled with numerous small, bright light particles. The DNA strands are rendered with a textured, wireframe-like appearance, and the overall scene has a futuristic, scientific feel.

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

Introduction :

L'acide désoxyribonucléique, ou ADN, est une macromolécule biologique présente dans toutes les cellules ainsi que chez de nombreux virus. L'ADN contient toute l'information génétique, appelée génome, permettant le développement, le fonctionnement et la reproduction des êtres vivants. C'est un acide nucléique, au même titre que l'acide ribonucléique (ARN). (www.ecole-adn.fr)

Les molécules d'ADN des cellules vivantes sont formées de deux brins antiparallèles enroulés l'un autour de l'autre pour former une double hélice. On dit que l'ADN est bicaténaire, ou double brin. Chacun de ces brins est un polymère appelé poly nucléotide. Chaque monomère qui le constitue est un nucléotide, lequel est formé d'une base nucléique, ou base azotée — adénine (A), cytosine (C), guanine (G) ou thymine (T) — liée à un ose — ici, le désoxyribose — lui-même lié à un groupe phosphate. L'ordre dans lequel se succèdent les nucléotides le long d'un brin d'ADN constitue la séquence de ce brin. C'est cette séquence qui porte l'information génétique. Celle-ci est structurée en gènes. (www.ecole-adn.fr)

L'ADN extrait à partir d'un organisme n'est pas directement analysable. Il contient une masse trop importante de séquences nucléotidiques. Il convient donc d'isoler, de purifier la ou les séquences qui présentent un intérêt.

Les méthodes développées nécessitent d'être simples, sans risque, sensibles, reproductibles et automatisables pour faciliter le criblage d'un grand nombre d'échantillons, d'où l'intérêt de la biologie moléculaire et la PCR. Ces techniques ont révolutionné la compréhension de la genèse et du fonctionnement des êtres vivants et sont à l'origine de multiples applications dans les domaines de la santé, de l'alimentation et de l'environnement (www.futura-sciences.com)

En Algérie très peu de connaissances sont actuellement disponibles sur la pratique de la PCR, ainsi que sur son utilisation dans les différents domaines et surtout dans le domaine de la médecine vétérinaire.

De ce fait, L'objectif de ce travail est de sensibiliser la communauté scientifique (praticiens, étudiants...) et d'apporter une contribution à la connaissance des pratiques de la PCR et son statut dans les différents centres d'analyses en Algérie.



**LA PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE**

Partie bibliographique

I. Définition

La technique de PCR, utilise les propriétés répliquatives naturelles de l'ADN pouvant conduire à de grande quantité in vitro d'une séquence désiré d'ADN à partir d'un mélange complexe de séquences hétérogène. La PCR peut amplifier plusieurs millions de fois des copies d'une région sélectionnée d'ADN d'une taille de 50 à plusieurs milliers de paires de bases. (www.futura-sciences.com)

II. Historique et principe de la technique

1-Historique

Cette technique d'amplification a été mise au point en 1986 par K.Mullis.

Il faut savoir qu'avant découverte, la méthode d'amplification était assez longue .Auparavant, une telle opération nécessite impérativement le clonage de la séquence ADN, son isolement, son amplification dans une cellule hôte et sa purification. Cette méthode a été abandonnée au profit de la PCR qui a certainement connu le développement le plus spectaculaire et le plus rapide dans la biologie.

Après 2 ans, R.K.Saiki a réalisé pour la première fois la réaction avec une **enzyme thermostable**

(La TAQ) : « extraite de bactérie thermophile thermus aquaticus » qui permet une automatisation de la technique. Les enzymes classiques étaient détruites à l'étape de dénaturation. L'ouverture des tubes et l'ajout d'enzymes à chaque cycle était nécessaire ce qui induisait de fortes possibilités de contamination. (Voir tableau 1)

Partie bibliographique

Tableau 1 : les types d'enzymes utilisés en PCR (MAFTEH, RAYMOND : biologie moléculaire, 2004)

Polymérase	3' → 5' Exonucléase	Source et propriétés
Taq	NON	À partir de <i>Thermus Aquaticus</i> Demi-vie à 95°C est de 40min
Pfu	OUI	À partir de <i>pyrococcus furiosus</i> Demi-vie à 95°C est 19 heures
Vent ou TLI	OUI	À partir de <i>thermococcus litoralis</i> Demi-vie à 95°C est à peu près de 7 heures

Depuis les travaux de R.K.Saiki, l'utilisation de la TAQ POLYMERASE comme enzyme pour l'étape d'élongation, la réaction de PCR est aujourd'hui une technique fondamentale dans les laboratoires biologiques et médicaux. (L'OIE, 2008)

En 1992, R.Higuchi a réalisé pour la première fois la PCR en temps réel ou PCR quantitative, les séquences d'ADN spécifiques sont détectées en même temps que la réaction. Cette amélioration nécessite l'ajout de bromure d'éthidium qui fluoresce en présence de double brins d'ADN. Une augmentation de la fluorescence dans le tube réactionnel indique une amplification positive. Donc cette méthode facilite énormément la surveillance et le déroulement de la réaction. (TOBAL, 2016)

Ensuite, et après plusieurs travaux de recherches durant des années, des appareils automatisés ont été commercialisés, appelé **thermocycleur**, sont capables de réaliser dizaines voire centaines de réactions en parallèle, ce qui les rend des appareils incontournables dans les laboratoires.

Partie bibliographique

2 –principe et description de la technique

Afin de faciliter l'analyse et la détection d'ADN à faible quantité et son amplification, la réaction de la PCR passe par 3 étapes thermiques : la dénaturation de l'ADN à environ 95°C, l'hybridation à 50°C et l'élongation à 72°C.

a) La dénaturation

L'ADN cible est d'abord dénaturé par la chaleur pour séparer les deux brins complémentaires afin d'obtenir une matrice simple brin.

A une température de 94 à 95°C. A cette température, les liaisons hydrogène, qui maintiennent l'ADN double brin, sont rompues. A la fin de cette étape, on obtient de l'ADN simple brin, prêt pour l'hybridation avec les Oligonucléotides amorces (**J.Watson et F.Crick, 1953**) (voir figure1)

b) L'hybridation :

Des amorces spécifiques (courtes molécules synthétiques d'ADN complémentaires des deux brins) sont ensuite hybridées à une matrice simple brin à basse température

Les amorces sont choisies pour former les limites de la séquence ADN qui doit être amplifiées. (**J.Watson et F.Crick, 1953**) (Voir figure2)

c) L'élongation

Les bras d'ADN sont prolongés avec ADN POLYMERASE à une température intermédiaire. Lorsque la polymérase a synthétisé un nouveau brin d'ADN, le produit est séparé de la matrice par chauffage à une température plus élevée. (**J.Watson et F.Crick, 1953**) (Voir figure3)

- Les figures ci-dessous montrent les trois principales étapes thermiques par lesquelles passe la PCR. (**Mimoune et Messai, 2008**)

Partie bibliographique

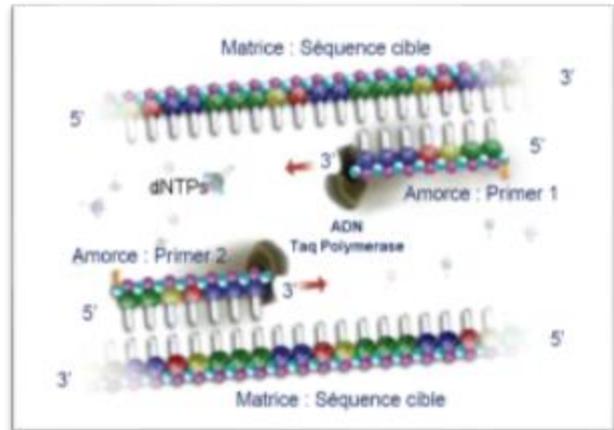
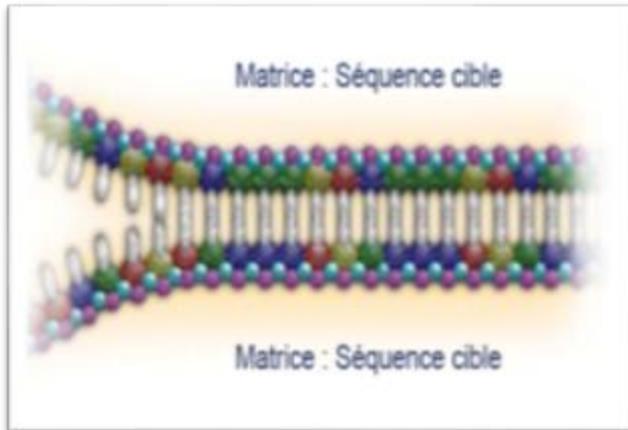


Figure1 : élongation des deux brins d'ADN

Figure2 : l'hybridation

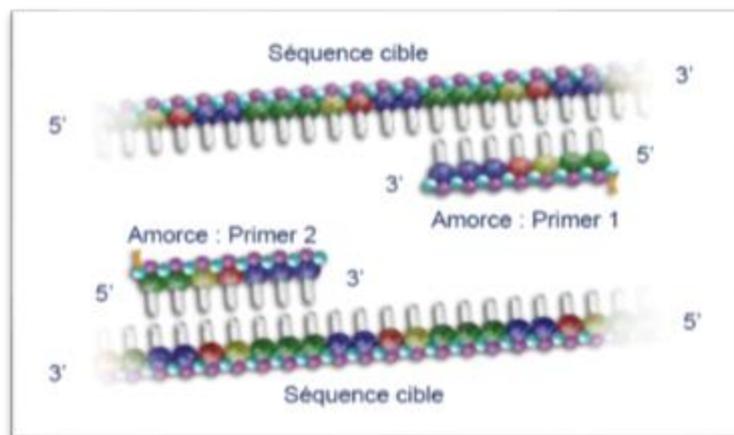


Figure3 : l'élongation d'un fragment d'ADN

Ces étapes suivent des cycles qui sont répétés 20 à 40 fois, permettant ainsi l'amplification de l'ADN cible.

La clé de l'amplification de la séquence d'ADN cible est au niveau de la sélection des oligonucleotides qui une fois prolongés, vont générer des sites complémentaires pour les oligonucleotides et permettre une hybridation au cours d'un nouveau cycle.

Partie bibliographique

Recherche d'amorces avec PerlPrimer

Il s'agit d'un logiciel libre téléchargeable

Définir la région à amplifier

Copier/ coller la sequence

Visualisation et analyse des amorces

Visualisation de la séquence et des amorces

Forward Primer	Pos	Len	Tm	Reverse Primer	Pos	Len
CAATTCGTTATTGGCGATAGC	393	21	60.12	ATACCGCCAATAAAGTTCAC	718	20
AATTCGTTATTGGCGATAGC	394	20	58.77	ATACCGCCAATAAAGTTCAC	718	20
AATTCGTTATTGGCGATAGCC	394	21	61.21	ATACCGCCAATAAAGTTCAC	718	20
ATTCGTTATTGGCGATAGCC	395	20	60.63	ATACCGCCAATAAAGTTCAC	718	20
GTGAAATTATCGCCACGTTTCG	370	21	62.56	CACAAAGATAATAATGATGCCGGC	701	24
GTGAAATTATCGCCACGTTTCG	370	21	62.56	CACAAAGATAATAATGATGCCGGC	699	22
TGAAATTATCGCCACGTTTCG	371	20	61.39	CACAAAGATAATAATGATGCCGGC	701	24

Finished ... found 33 primer pairs

Figure4 : la sélection d'une séquence cible par un logiciel (site internet 1)

Pour détecter l'ARN (EX ; ARN viral), une copie d'ADN complémentaire doit être d'abord réalisé en utilisant une transcriptase (RT). L'ADNc agit comme une empreinte pour l'amplification par PCR. Cette technique est appelée RT-PCR.

Tout produit de la PCR généré a par définition une taille caractéristique. Son identité est généralement confirmée en utilisant des sondes ADN ou des produits de digestion d'enzymes de restriction qui peuvent être utilisés pour fournir des RFLPs. Plus communément, depuis l'introduction de techniques automatisées de séquençage en cycles, l'identification est réalisée via un séquençage direct du produit de PCR. EX : le séquençage a été utilisé pour le typage de la virulence du virus de l, influenza aviaire de type A, pour lequel des motifs de structure au niveau du site de cyclane du gène de l'hémagglutinine sont associés à des marqueurs de haute pathogénicité chez le poulet.

La PCR est une méthode hautement sensible pour détecter des agents infectieux dans les tissus de l'hôte et chez les vecteurs, même lorsque seulement un petit nombre de cellules de l'hôte sont infectés.

Partie bibliographique

La PCR peut cibler et amplifier une séquence d'un gène qui a été intégré dans le génome de cellules infectées de l'hôte. La réaction peut aussi être dirigée pour amplifier des séquences géniques virales non intégrées.

Tableau 2 : comparaison entre PCR et la réplication d'ADN in vivo (www.école-adn.fr)

	DNA réplication (in vivo)	PCR (in vitro)
Résultat finale	Copie le génome entier.	Fait des 230- 240 copies d'une séquence cible
Etapas de la réplication	Comment est – il accompli ?	Comment est – il accompli ?
étape 1 : dénaturation de l'ADN double brin	Enzyme appelé hélicase.	Faire fondre les torons (tube d'essai thermique jusqu'à ébullition ; >90°C)
étape 2 : « amorce » le processus de copie en recuisant une petite amorce sur les bases exposées	Des millions d'amorces d'ARN différentes produites par la primase dans le génome.	Une paire spécifique d'amorces d'ADN conçue par un scientifique pour correspondre à un gène particulier
Etape 3 : copier l'ADN en utilisant une enzyme pour catalyser la polymérisation de bases nucléotidiques individuelles.	ADN polymérase + A, C, G, T	ADN polymérase (de l'extrémophile des sources chaudes). + A, C, G, T.
C'est tous ?	C'est essentiellement ça	Répète le processus 30-40fois, en doublant chaque fois le nombre des copies.

Il est possible d'utiliser la PCR pour rechercher des contaminants dans les lots de vaccins. Cependant, elle ne permet pas de différencier les organismes vivants des organismes morts ou des fragments incomplets d'ADN et cela peut rendre difficile l'interprétation des résultats et affecter l'application de la PCR pour cette fonction. (L'OIE, 2008)

Partie bibliographique

Quand la PCR est utilisée à des fins diagnostiques, une grande attention doit être portée pour éviter une contamination des échantillons, du fait de la sensibilité extrême de la technique, qui peut donner facilement des faux résultats positifs. Des études inter-laboratoires ont montré que des échantillons positifs sont toujours détectés, mais de faux positifs sont fréquemment obtenus avec des échantillons négatifs connus. Ceci indique la présence continue de problèmes de contamination.

La prise en compte de ces précautions permet l'utilisation de PCR comme une option réaliste pour le diagnostic. **(Bernard H et al, 2008)**

III. Control de la réaction

a) Les risques de contamination et leurs préventions :

L'un des risques de la réaction est l'introduction involontaire dans le mélange réactionnel d'ADN contaminant, en particulier ADN produit par des amplifications par PCR réalisé auparavant avec le même couple d'amorces et désaminée par aérosol lors de l'ouverture des tubes et de la manipulation des produits. Le risque est l'obtention des résultats faussement positifs qui peut avoir des conséquences très graves (application microbiologiques, diagnostic **(Bernard H, et al, 2008)**)

Toute une série de mesures à suivre pour détecter et prévenir une telle contamination :

- ✓ La séparation des zones du laboratoire en « zone salle » dans laquelle les produits d'amplification sont manipulés et analysés et « zone propre », avec une zone où les mélanges réactionnels sont préparés et autre zone pour l'extraction de l'ADN ou l'ARN. la circulation des personnels et du matériel doit se faire de la zone propre vers la zone salle et jamais l'inverse, les blouses doivent être changées entre chaque zone.
- ✓ L'utilisation des systèmes capables de détecter les produits d'amplification sans ouvrir les tubes, donc sans désamination : ex : les appareils de PCR en temps réel.
- ✓ Il faut toujours avoir une réaction « blanche » c.-à-d. des échantillons négatifs connus sans introduction des produits d'amplification .une réaction positive pour les blancs signale directement une contamination.
- ✓ Des systèmes ont été développés pour résoudre ce problème comme le système d'UTP-UNG (d-uracile triphosphate et uracile-N-glycosylase).

Ces systèmes utilisent une réaction enzymatique pour dégrader spécifiquement les produits de PCR à partir d'une amplification préalable (dans laquelle du dUTP a été incorporé) sans dégrader les matrices d'acides nucléiques initiales. **(L'OIE, 2008)**

Partie bibliographique

b) Les inhibiteurs de la réaction

Il est également important de contrôler les résultats négatifs qui pourraient être dus à la présence de substances pouvant interférer avec la réaction dans le mélange réactionnel de la PCR ou dans l'échantillon du patient.

1- Ce contrôle peut s'effectuer par l'introduction d'une matrice connue (contenant une concentration connue d'ADN cible à l'étude) pour la production d'un produit de PCR. **(TOBAL, 2016).**

C.-à-d. qu'il est parfois utile de prévoir un ADN ou ARN contrôle exogène, qui est introduit dans le mélange réactionnel de PCR en même temps que l'échantillon à tester, ensuite on vérifie au cours de la réaction (PCR temps réel) ou après la fin de la réaction, l'amplification du matériel de contrôle simultanément à l'amplification de l'échantillon.

Le produit d'amplification standard doit être spécifié pour le reconnaître, dans sa séquence (différence d'un nucléotide, différence de longueur ou l'ajout de quelques nucléotides), dans ce cas il est appelé standard interne homologue. Si la séquence est totalement différente de la séquence ciblée, on parle de standard interne hétérogène. **(Bernard et al, 2008)**

2-Purifier l'ADN :

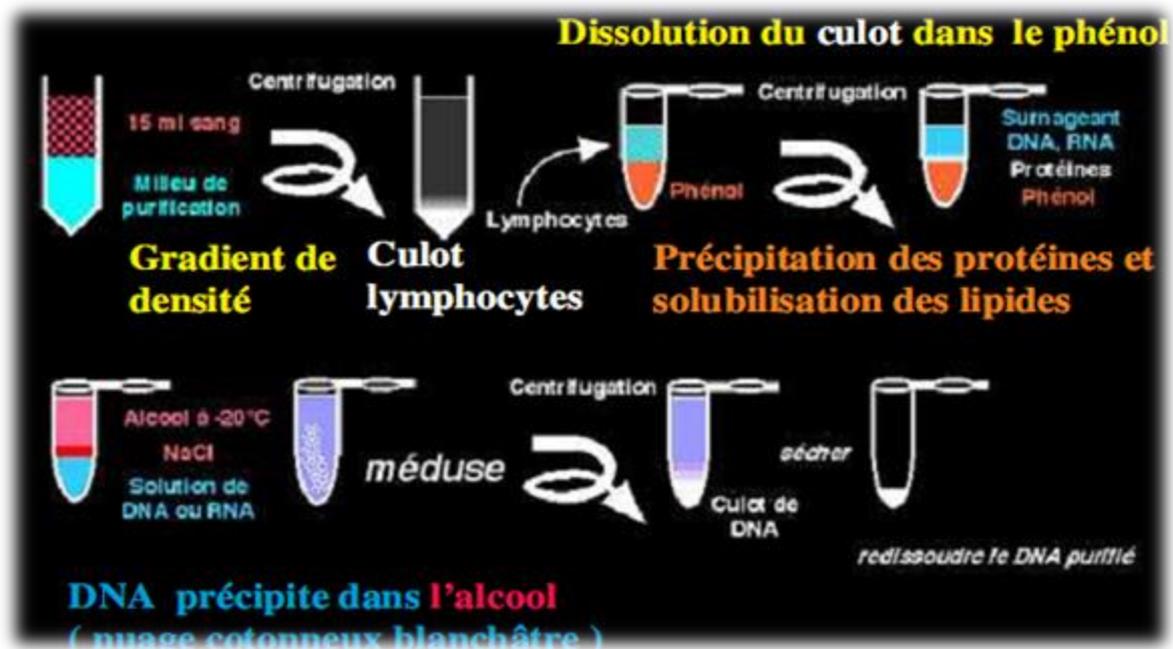


Figure 5 : purification d'ADN (Housset, Raisonier, 2010)

I.v Fidélité = taux d'erreurs :

À la fin de 20 cycles d'amplification *in vivo* d'un fragment de 1000 bases, avec ADN Polymérase ayant un taux d'erreur apprécié à 10^{-5} , le pourcentage de molécules porteuses d'une mutation est de 18%.

In vitro, sur une échelle de fidélité, la **TAQ POLYMERASE** se situe en bas de l'échelle avec un taux d'erreur d'environ $2 \cdot 10^{-5}$, la **PFU polymérase** a représenté un net progrès dans les ADN POLYMERASES thermostables avec un taux d'erreur d'environ $1,6 \cdot 10^{-6}$, soit plus de 10 fois moins. (Bernard Hainque et al, 2008)

Dans le processus de PCR, la polymérase TAQ peut faire une erreur toutes les 104 bases environ en raison de l'absence de la fonction de correction d'erreur (MAFTEH, RAYMOND, 2004)

Dans le cadre de diagnostic génétique, lorsqu'une mutation est mise en évidence par une technique utilisant la PCR, il convient de s'assurer par une deuxième PCR indépendante que la mutation observée est bien contenue dans l'ADN de départ et n'est donc pas un artefact de PCR.

VI. Détection des produits de PCR :

- a. **L'électrophorèse** est basée sur la séparation des acides nucléiques chargés négativement sous l'effet d'un champ électrique, Cette séparation s'effectue à travers la matrice du gel d'agarose coloré par le bromure d'éthidium ,ce réactif est un analogue des nucléotides qui s'intercale entre les bases ,et exposé à une lumière d'ultraviolette de courte longueur d'onde .il met une fluorescence orange et Les fragments d'ADN sont visualisés sous forme de bandes orangées.(**Dr H. CHADI, la PCR :technique et application**)

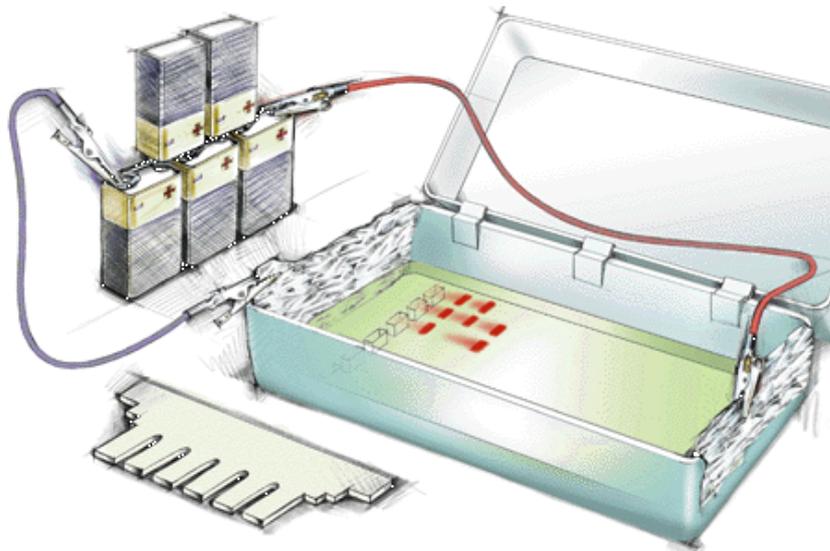


Figure6 : électrophorèse sur gel d'agarose (site internet 2)

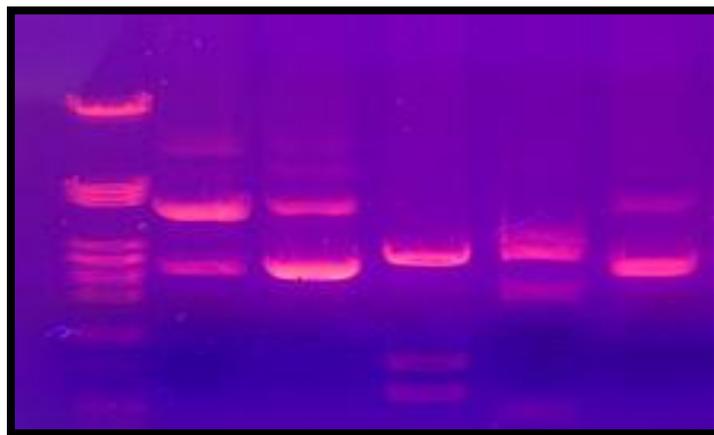


Figure7 : visualisation des fragments d'ADN après électrophorèse (école-adn.fr)

Partie bibliographique

Les molécules de plus petites tailles se déplacent plus rapidement et migreront plus loin que les molécules de tailles supérieures, elles peuvent être identifiées par comparaison avec un marqueur de poids moléculaire.

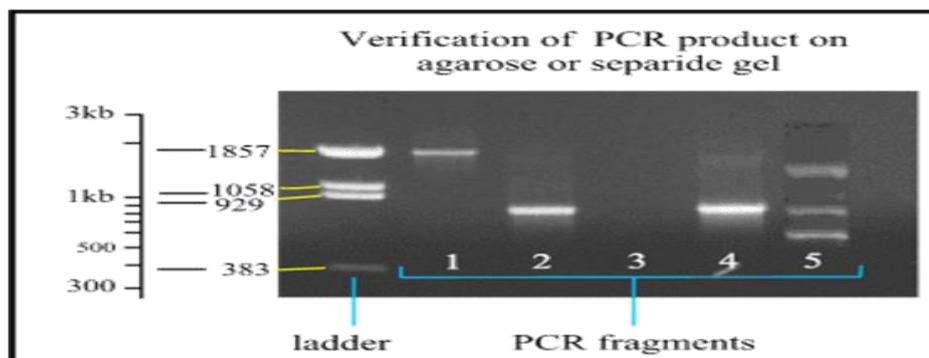


Figure8: identification d'ADN à partir du poids moléculaire (école-adn.fr)

b. PCR-ELISA

La PCR-ELISA est une méthode d'amplification d'une séquence d'ADN cible qui repose sur les mêmes principes que PCR, mais utilisant pour sa révélation l'hybridation d'une sonde d'ADN couplée à une réaction enzymatique. Le principe général du marquage (ici non radioactif) se fonde sur la fixation d'une molécule marqueur sur l'ADN sonde selon des modalités proches de celles utilisés pour le marquage immuno-enzymatique (kojo, 1993)

Deux méthodes sont habituellement utilisées pour les analyses de PCR-ELISA :(www.memoireonline.com)

- Dans la première méthode, les produits d'amplification obtenus avec des amorces marqués à la biotine, sont directement fixés au fond de la microplaque préalablement sensibilisés à la streptavidine. puis les produits PCR sont hybridés par une sonde spécifique marquée à la digoxigénine ou à la fluorescéine. la présence de cette sonde est ensuite détectée par des anticorps anti-digoxigénine ou anti-fluorescéine, conjugués à l'enzyme d'un chromogène telle que la peroxydase ou la phosphatase alcaline. après l'ajout des substrats (peroxyde pour la peroxydase et NADPH pour la phosphatase alcaline, il apparait une coloration caractéristique pour les échantillons positifs.
- La 2^{ème} méthode utilisée consiste à hybrider les produits PCR marqués à la digoxigénine avec une sonde d'ADN spécifique marquée à la biotine et

Partie bibliographique

se trouvant fixés au fond d'une microplaque sensibilisés à la streptavidine. la révélation des produits PCR ce fait à l'aide d'Anticorps anti DIGOXIGENINE conjugué à la peroxydase, après l'ajout du substrat (ABTS ou TMB peroxydase +H₂O₂)

Cette méthode fait intervenir 4 étapes principales :

- Marquage des produits de PCR avec la digoxigénine pendant la réaction d'amplification.
- Les produits de PCR sont dénaturés et hybridés avec une sonde spécifique marquée à la biotine. la sonde fixe spécifiquement une séquence interne de l'ADN cible.
- L'ensemble sonde spécifique marqués à la biotine hybridée avec la séquence cible d'ADN est immobilisée dans une microplaque sensibilisés à la streptavidine.
- En fin, Les produits de PCR marqués à la digoxigénine, hybridés et immobilisés dans la microplaque, sont détectés grâce à des AC anti-digoxigénine conjugués à la peroxydase. la révélation se fait par l'ajout (ABTS ou TMB peroxydase +H₂O₂).la lecture des microplaques se fait à 450 nm au spectrophotomètre

VII- Les variétés de PCR

A. PCR en temps réel

La technologie de PCR en temps réel est basée sur la détection et la quantification d'un « reporter » fluorescent. L'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés durant la R°.

En observant la quantité de fluorescent émise à chaque cycle, il devient possible de suivre la R° durant sa phase exponentielle ou la première augmentation significative dans la quantité d'amplicon est en corrélation directe avec la quantité initiale de la matrice original cible. Plusieurs instruments de PCR en temps réel sont présentés sur le marché. Ces appareils utilisent généralement un système en tubes fermés et la quantification ne requiert aucune manipulation post – amplification, ce qui minimise ou élimine les problèmes de contamination et réduit le temps d'analyse.

Le processus complet est donc automatisé du début à la fin rendant ainsi cette technique intéressante pour des applications d'analyse à grande échelle (**site internet3**)

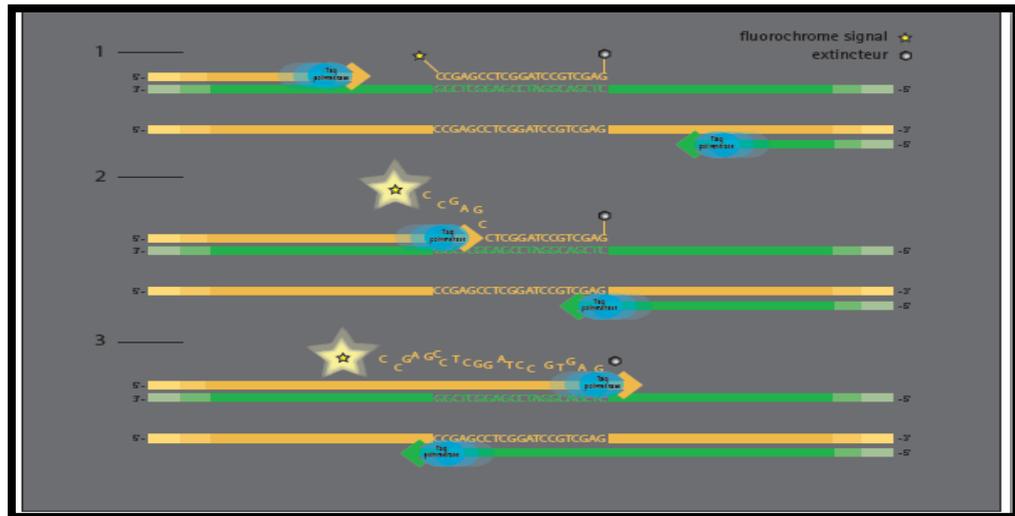


Figure9: PCR quantitative (Tobal, 2016)

B. PCR multiplexe

La réaction la plus utilisée pour identifier des pathogènes, des mutations, des maladies génétiques. C'est une approche plus économique que la PCR simple, car elle nécessite moins de réactifs, d'échantillons et de temps en utilisant plusieurs couples d'amorces pour amplifier simultanément plusieurs cibles d'ADN en une seule Réaction, plutôt qu'un seul couple d'amorces pour amplifier une cible d'ADN unique.

En pratique, il n'est pas simple de mener à bien une PCR multiplexe. La mise au point est souvent fastidieuse, car lorsque le nombre de cibles à amplifier dans une même Réaction augmente, le niveau de complexité s'accroît. Des optimisations sont généralement nécessaires avant de bénéficier pleinement des avantages de la PCR multiplexe. (John M. Butler, 2009)

C. La PCR emboîtée (Nested PCR)

Est une PCR en deux étapes successives, avec deux couples d'amorces différents, le second liant de séquences situées à l'intérieur du premier amplicon. Cette technique était initialement utilisée pour réduire le risque de contamination

(le produit final devait pouvoir interagir avec deux couples d'amorce, donc deux niveaux de spécificité. elle est maintenant très utilisée par les virologues travaillant sur les virus à ARN qui peuvent avoir une haute mutabilité. le premier couple d'amorces est conçu pour pouvoir accrocher les quelques parties stables

du génome viral. le deuxième pour identifier le sous type. elle permet aussi une meilleure sensibilité du résultat. (**John M. Walker, Ralph Rapley, 2009**)

D. *RT-PCR (reverse transcriptase PCR)*

Technique qui associe une transcription inverse suivie d'une PCR. Elle permet de synthétiser le brin complémentaire d'un ARN avec des désoxyribonucléotides en utilisant une ADN polymérase ARN dépendante. Cet ADN_C est généralement destiné à être amplifié par PCR (ADN_C étant plus stable, il permet plus de liberté que les ARN pour les analyses suivantes).

RT-PCR en une étape ; est un protocole mélangeant les réactifs de RT de PCR afin que les deux étapes puissent se faire sans avoir à ouvrir le tube. Cela permet de réduire le risque de contamination ou d'inversion des échantillons mais il est difficile d'optimiser le milieu réactionnel pour chaque étape. Cela induit en outre un risque de biais pour normaliser l'étape de RT car cela implique d'utiliser la PCR multiplexe. (**John M. Walker, Ralph Rapley, 2009**)

E. *RT-PCR in situ* :

Méthodologie consiste à réaliser la RT-PCR non pas sur des molécules en solution mais sur des groupes histologiques. Bien que les résultats ne soient que semi quantitatifs. Ils apportent en outre une information sur la localisation des transcrits dans le tissu. (**Franck Pellestor, 2006**)

F. *La LAMP : "Loop-mediated isothermal amplification of DNA"*

Est une technique à tube unique pour l'amplification de l'ADN développée par NOTOMI et AL en 2000. Cela peut être utilisé une alternative à faible coût pour détecter certaines maladies. Il peut être combiné avec une étape de transcription inverse pour permettre la détection d'ARN.

1. *Technique*

LAMP est une technique d'amplification d'acide nucléique isotherme. Contrairement à la réaction de polymérisation en chaîne par polymérase dans laquelle la Réaction est effectuée avec une série d'étapes ou de cycles de T° alternés, l'amplification isotherme est réalisée à une T° constante et ne nécessite pas de thermocycleur.

Dans LAMP, la séquence cible est amplifiée à une T° constante de 60-65° en utilisant 2 ou 3 séries d'amorces et une polymérase avec une activité de dépliement de brin élevée en plus d'une activité de réplication. (**Notomi T et al, 2000**)

Partie bibliographique

Typiquement ,4 amorces différentes sont utilisées pour identifier 6 régions distinctes sur le gène cible, ce qui ajoute fortement à la spécificité. Une paire supplémentaire d'amorce en boucle peut encore accélérer la réaction. En raison de la nature spécifique de l'action de ces amorces, la quantité d'ADN produite dans LAMP est considérablement plus élevée que l'amplification basée sur la PCR.

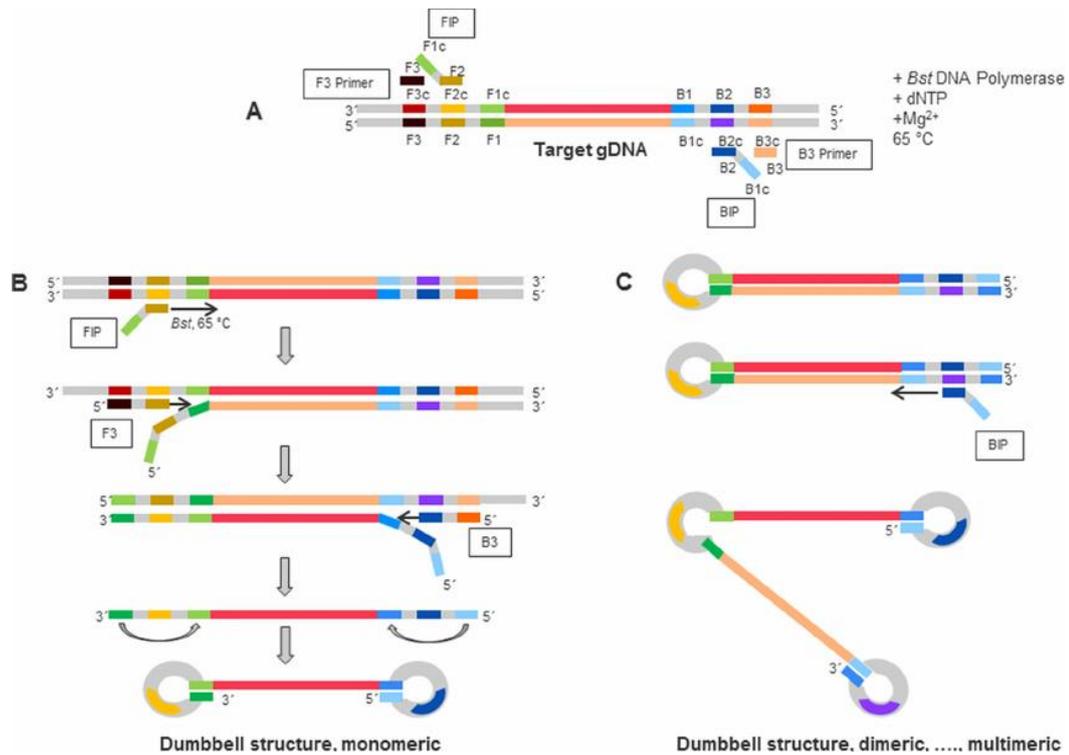
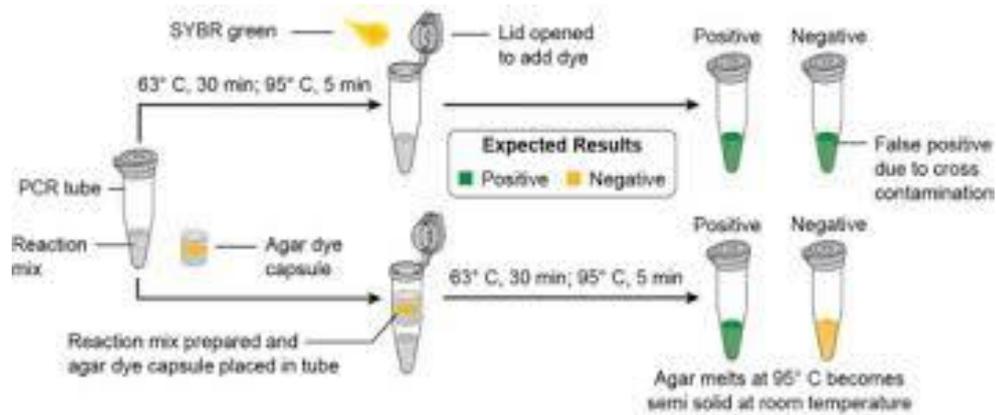


Figure10: principe de la technique de LAMP (site internet4)

La détection du produit d'amplification peut être déterminée par photométrie pour la turbidité provoquée par une quantité croissante de pré-épitope de pyrophosphate de magnésium en solution comme sous-produit d'amplification. Ceci permet une visualisation facile à l'œil nu, en particulier pour les plus grands volumes de R^o, ou via des approches de détection simple pour des volumes plus petits. La R^o peut être suivie en temps réel en mesurant la turbidité ou par la fluorescence en utilisant des colorants intercalant telle que SYTO. Dyes telle que SYBR vert, peut être utilisé pour créer un changement de couleur visible qui peut être vu à l'œil nu sans avoir besoin d'un équipement dispendieux, ou une réponse plus précise grâce à l'instrumentation.



(Mori Y, et al, 2000.

Figure11: détection des produits de la LAMP (Science Direct Support Center)

Les molécules de colorant s'intercalent ou marquent directement l'ADN, et peuvent à leur tour être corrélées au nombre de copies initialement présentes.

De ce fait, la LAMP peut être également quantitatif. Dans la détection par tube de l'amplification de l'ADN est possible en utilisant la calceïne chargée en manganèse qui commence à fluorescer lors de la complication du manganèse par le pyrophosphate pendant la synthèse d'ADN in vitro.

De plus, la détection visuelle des amplicons LAMP par l'œil nu était basée sur leur capacité à s'hybrider avec l'ADN lié à l'or complémentaire et empêcher ainsi le changement normal de couleur rouge à violet qui se produirait autrement par agrégation induite par le sel des particules d'or. ainsi méthode LAMP combinée à la détection d'amplicons par AuNP présente des avantages par rapport aux autres méthodes en termes de temps de dosage réduit, confirmation d'amplicons par hybridation et utilisation d'un équipement plus simple (pas besoin de thermocycleur, d'équipement d'électrophorèse ou d'illuminateur trans UV).

2. Utilisation et avantages :

LAMP est une technique relativement nouvelle d'amplification de l'ADN qui en raison de sa simplicité, de sa robustesse et de son faible coût, pourrait offrir un avantage majeur. LAMP a le potentiel d'être utilisé comme test de dépistage simple sur le terrain. Puis que la LAMP est isotherme, ce qui éradique le besoin de thermocycleur coûteux utilisés en PCR conventionnelle, il peut être une méthode utile

Partie bibliographique

pour le diagnostic des maladies infectieuses dans les pays à revenu faible et moyen. LAMP est largement étudiée pour détecter des maladies infectieuses comme la tuberculose dans les régions en développement, le paludisme (malaria) et la maladie de sommeil, doivent encore être largement validés pour d'autres pathogènes communs. (*Njiru ZK, et al, 2008*).

Il a été observé que la LAMP est moins sensible (plus résistante) que la PCR aux inhibiteurs dans les échantillons complexes tels que le sang, probablement en raison de l'utilisation d'une ADN polymérase différente (typiquement l'ADN polymérase BST plutôt que la polymérase Taq comme dans la PCR. La détection de pathogène à partir d'échantillons minimalement traité tels que du sang traité thermiquement, ou en présence de matrices d'échantillon clinique. Cette caractéristique de LAMP peut être utile dans des conditions de ressources faibles ou sur le terrain où une extraction classique d'ADN ou d'ARN avant le test de diagnostic peut être impossible. (*Geojith G, et al, 2011*).

3. Limites

LAMP est moins polyvalent que la PCR, la technique d'amplification des acides nucléiques la plus connue. LAMP est utile principalement comme technique de diagnostic ou de détection, mais n'est pas utilisée pour le clonage ou une myriade d'autres applications de biologie moléculaire activées par la PCR.

Parce que LAMP utilise 4 ou 6 amorces ciblant 6 ou 8 régions dans un segment assez petit du génome, et parce que la conception d'amorce est soumise à de nombreuses contraintes, il est difficile de concevoir des jeux d'amorces pour LAMP « by eye ».

Les progiciels commerciaux sont généralement utilisés pour aider à la conception de l'amorce signifie qu'il y a moins de liberté pour choisir le site cible qu'avec la PCR. Dans l'application, diagnostic, ceci doit être équilibré par rapport à la nécessité de choisir une cible appropriée (un site conservé dans un génome viral très variable, ou une cible spécifique d'une souche pathogène particulière).

Les approches de multiplexage pour LAMP sont moins développées que pour PCR. Le plus grand nombre d'amorce par cible dans LAMP augmente la probabilité d'interaction d'amorces pour les ensembles cibles de multiplexage. Le produit de

Partie bibliographique

LAMP est une série de concatémères de la région cible, donnant lieu à une échelle caractéristique de bande, plutôt qu'à une seule bande comme PCR, bien que cela ne pose pas de problème lors de la détection de cible unique avec LAMP.

Une application de PCR multiplexe dans la quelle l'identité d'une cible est confirmée par la taille d'une bande sur un gel n'est pas réalisable avec LAMP. On a réalisé une lyophilisation dans LAMP en choisissant une région cible avec un site de restriction , et digéré avant de passer sur un gel tel que chaque produit donne lieu à une taille de fragment distincte , bien que cette approche ajoute de la complexité à la conception expérimentale et au protocole. L'utilisation d'une ADN polymérase déplaçant les brins LAMP empêche également l'utilisation de sondes d'hydrolyse, sonde TaqMan qui repose sur l'activité exonucléase 5'-3' de la Taq polymérase. Une approche de multiplexage alternatif en temps réel basés sur des désactivateurs de fluorescence a été rapportée. (*Tanner et al, 2012*)

VII. Application de la PCR dans le diagnostic

La PCR a révolutionnée les approches expérimentales en biologie moléculaire, et elle a marquée des résultats fabuleux dans le diagnostics de plusieurs maladies, tels que les maladies génétiques détectés par l'amplification de toute ou une partie d'un gène qui responsable de la maladie, permettant ainsi de révéler la ou les mutations délétères, leurs natures, leurs position et leurs tailles. On peut aussi détecter des glissements antigéniques (drift=erreur lors de transcription), des réassortiments génétiques (shift= remplacement d'une séquence par une autre), des inversions et mêmes des mutations ponctuelles (**cours pathologies infectieuses, Baazizi, 2018**). Soit grâce à des analyses directes des produits de PCR par électrophorèse, soit en la combinant à d'autres techniques.

La PCR peut encore être utilisée pour détecter des maladies infectieuses qu'elles soient virales, bactériennes ou parasitaires. Même si il existe d'autres méthodes ou techniques qui peuvent détecter ces maladies, la PCR est l'outil de diagnostic de choix compte tenu de son énorme avantage de produire des résultats très fiables et rapides à partir d'échantillons biologiques infimes dans lesquels la présence du pathogène n'est pas décelable par d'autres techniques en plus de sa bonne spécificité et sensibilité.

Partie bibliographique

A. Maladies génétiques :

Une maladie génétique est une maladie due à une ou plusieurs anomalies sur un ou plusieurs chromosomes qui entraînent un défaut de fonctionnement de certaines cellules de l'organisme. Ces cellules fabriquent des protéines. L'activité et la structure de chaque protéine est déterminée par l'information génétique contenue dans un gène. Si le gène est altéré, il entraîne la cellule dans un dysfonctionnement, qui peut se révéler, à tout âge de la vie, avec l'expression d'une maladie. Les maladies génétiques sont dites dominantes ou récessives, si l'allèle responsable est ou non dominant (chez un individu chaque gène est représenté par deux allèles). On peut aussi les classer en fonction de la position du gène responsable de l'anomalie. S'il est situé sur la paire de chromosomes sexuels, la maladie est dite « gonosomale », s'il est localisé sur une paire de chromosomes homologues, la maladie est dite « autosomale ».

On parle donc de maladie autosomale récessive (ex. : phénylcétonurie) ou de maladie gonosomale récessive (ex. : hémophilie).

Parmi les maladies génétiques, on trouve aussi bien des affections bénignes ou faiblement handicapantes (par exemple, le daltonisme) que des affections extrêmement graves. Mais leur caractéristique commune est généralement d'être une affection à vie et qu'elle peut dans certains cas être transmise à la descendance, puisque inscrite dans les gènes de l'individu. **(Site internet5)**

La recherche d'une maladie génétique est basée sur la détection d'une mutation sur une séquence d'un gène. L'interprétation des résultats est en relation avec la nature de mutation qui siège. Plusieurs cas de figures qui se présentent. la mutation dans le cas des insertions et délétion se manifeste par la modification de la taille du gène ou d'une partie de ce dernier. Dans le cas d'une insertion, l'amplification de tout ou partie d'un gène où la mutation est connue, décrite, le produit PCR issu de l'ADN malade est plus long que celui issu d'une personne saine. Résultat contraire dans le cas de délétion. La taille des produits de la PCR est évaluée après analyse par électrophorèse conduisant ainsi au diagnostic.

Dans le cas d'inversion et de mutation ponctuelle, pour aboutir à un résultat, le critère de taille n'est plus retenu. Il faut donc recourir à d'autres techniques complémentaires à la PCR. Trois techniques peuvent être envisagées, le Southern Blot, le RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisme) ou la détection Mismatch. **(Tobal, 2016)**

Partie bibliographique

1. La technique Southern Blot :

Le Southern blot est une technique permettant, après une phase de séparation sur gel, de visualiser spécifiquement des loci ciblés. Cette technique a été mise au point par E. M. Southern en 1975 qui a combiné électrophorèse, transfert et hybridation avec une sonde oligonucléotidique marquée, grâce à un isotope radioactif ou un fluorochrome dont la séquence est complémentaire et donc spécifique de celle qui correspond à la mutation et elle est adaptée aux cas d'inversions. Cette technique est de moins en moins utilisée dans les laboratoires d'identification (police scientifique, laboratoires vétérinaires), elle a été remplacée par l'électrophorèse capillaire après une PCR sur des régions flanquantes de microsatellites (cette technique, beaucoup plus automatisable et standardisable a supplanté le Southern Blot). Après une PCR sur des régions flanquantes de microsatellites (cette technique, beaucoup plus automatisable et standardisable a supplanté le Southern Blot). (*c.audebert, 2011*)

Partie bibliographique

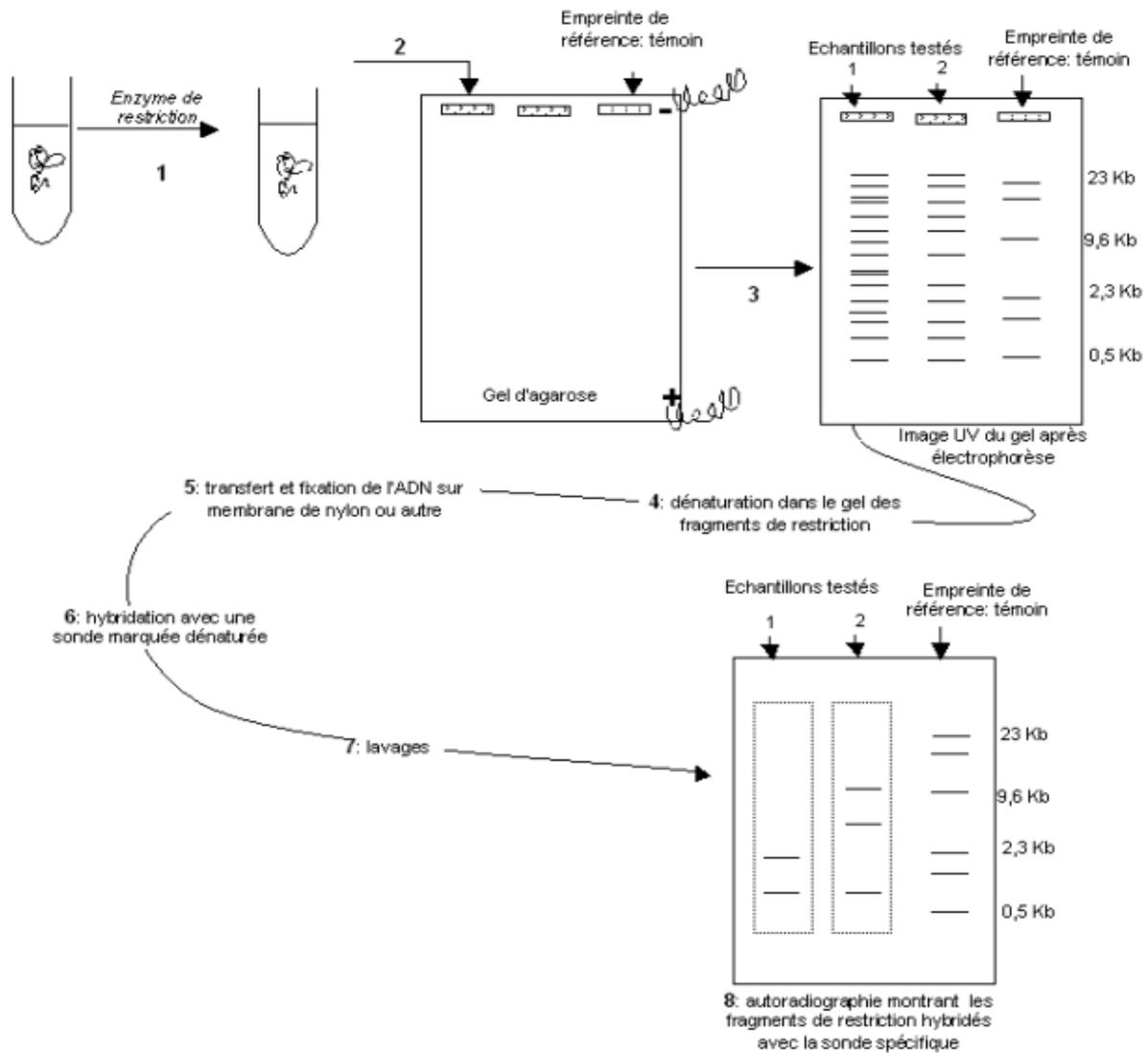


Figure12: Schéma des différentes étapes d'un Southern blot (extrait de « banque de schémas SVT - Académie de Dijon, Alain Gallien »)

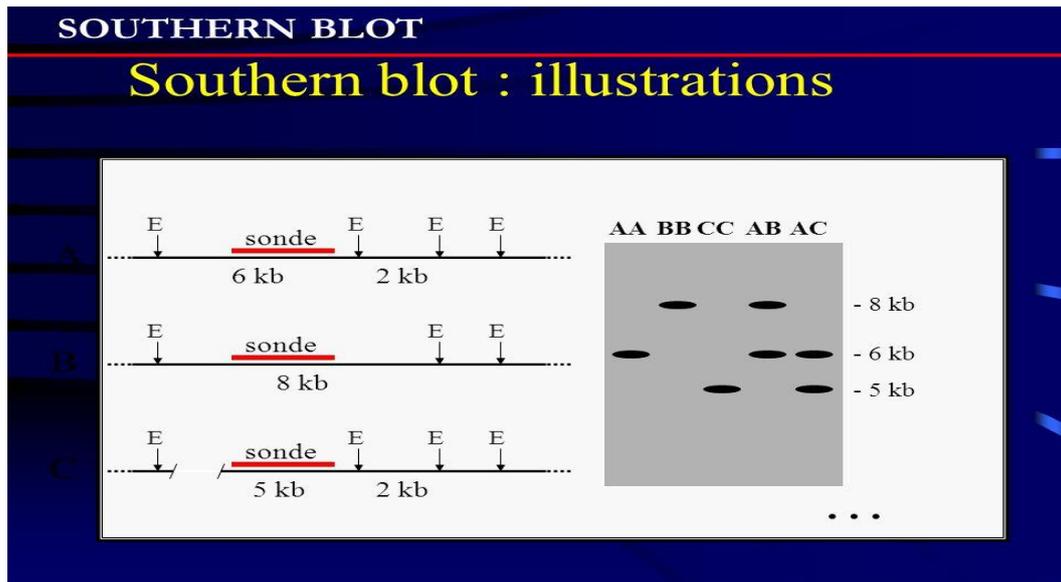


Figure13: illustration de la technique Southern Blot (école-adn.fr)

2. La technique Mismatch :

Le Mismatch repair est un mécanisme de surveillance de l'ADN lors de la réplication qui permet de réparer préférentiellement ces erreurs dans le brin nouvellement synthétisé. La reconnaissance du brin matrice par rapport au brin nouvellement synthétisé est basée sur la présence de méthylations spécifiques dans le premier, ce qui permet à la cellule de reconnaître la copie de l'original et d'éviter de modifier ce dernier. Il implique plusieurs protéines très conservées, connues sous le nom de **Mut** chez les bactéries, qui tirent leur nom du fait que leur dysfonctionnement engendre l'apparition de nombreuses mutations dans les souches bactériennes. Chez l'homme, l'altération des gènes correspondants est responsable de l'apparition de cancers précoces avec une forte prévalence. Elle est adaptée aux inversions et aux mutations ponctuelles. (Site internet 6)

La technique se résume en un mélange de deux produits PCR l'un est issu de l'ADN d'un patient (échantillon) et l'autre ADN d'une personne saine qui est utilisé comme référence. Ce mélange sera dénaturer par la température puis hybridé. Si y'aura mutation de l'ADN échantillon, les appariements entre ADN échantillon et l'ADN référence seront incomplets au niveau de la mutation.

Partie bibliographique

Les mésappariements (Mismatch) concernent une seule paire de base dans le cas de mutation ponctuelle et pour le cas d'une inversion on aura plusieurs paires de base. Ensuite ces mésappariements seront dégradés grâce à la nucléase S1 (Enzyme qui ne dégrade que l'ADN monocaténaire) suivi d'un clivage par voie chimique (tetroxide d'arsmium, puis pipéridine). Tous ce la pour arriver à conclure que la mutation induit un mésappariement au niveau duquel un clivage, enzymatique ou chimique, conduisant à la génération de deux fragments à partir d'un produit PCR unique. Le produit vers la fin sera analyser par électrophorèse. (Tobal, 2016)

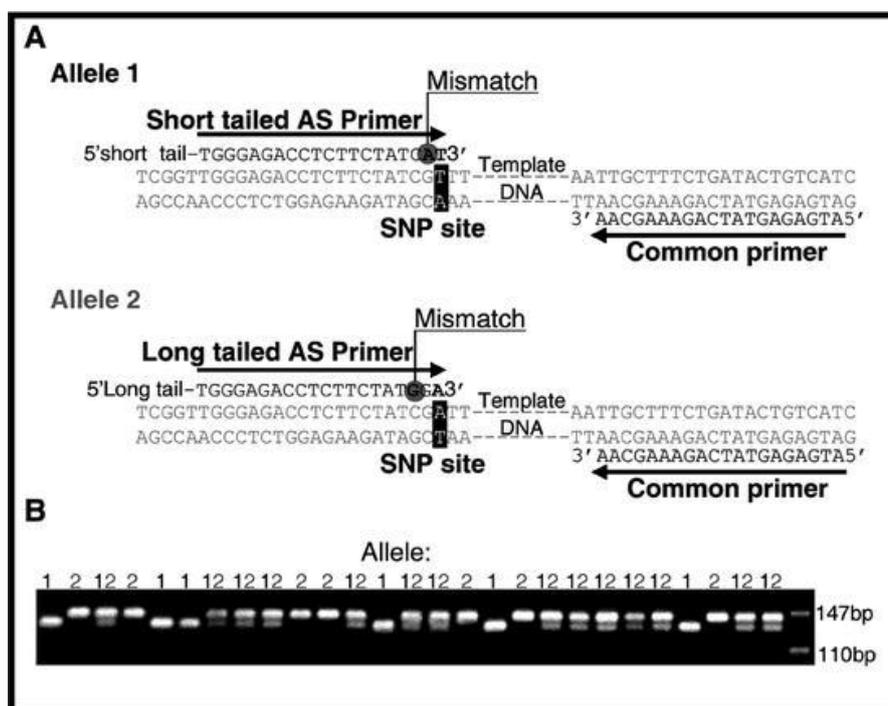


Figure14: illustration de la technique Mismatch (Single Nucleotide Polymorphisms, 2009)

3. La technique RFLP (restriction fragment length polymorphisme)

Toute modification des séquences d'ADN (mutation, addition, délétion) réorganise fréquemment les sites de restriction. Lors de l'action d'enzymes de restriction, la taille des fragments de restriction est alors modifiée : on observe un polymorphisme. L'enzyme de restriction capable d'hydrolyser le produit PCR (issu d'un ADN sain ou d'un ADN malade) au niveau de la séquence où se situe la mutation qu'elle soit une inversion ou une mutation ponctuelle. Le ou les fragments d'ADN obtenus vers la fin ils seront révélés par électrophorèse. (Copyright Gnis, 2007-2018, les marqueurs RFLP)

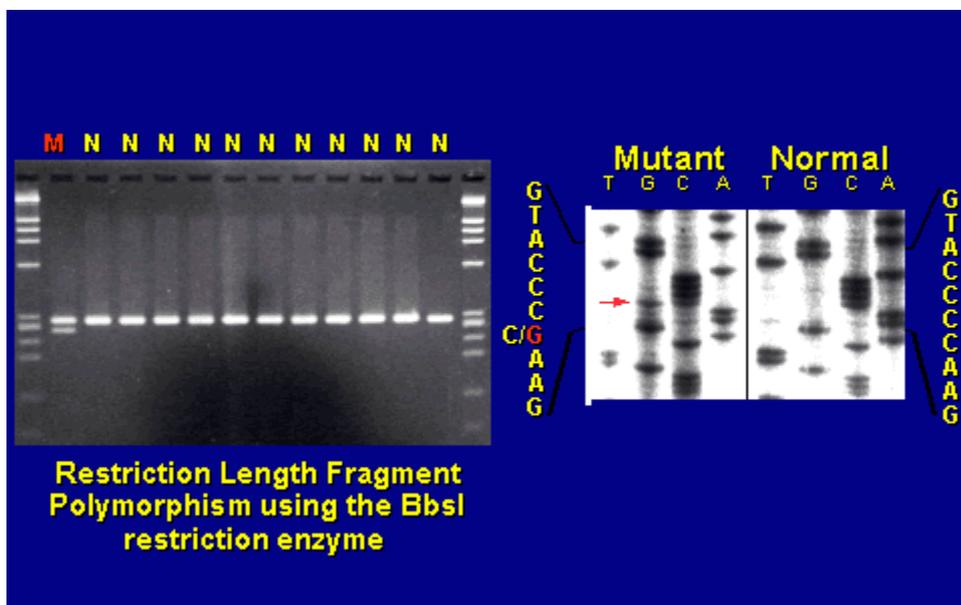


Figure15: illustration de la technique de RFLP (site internet7)

Partie bibliographique

B. Maladies infectieuse

Toute contamination humaine ou animale par des virus ou par des microorganismes (bactéries, parasites...) est décelable par la présence de leur matériel génétique dans l'organisme de l'hôte infecté, ce qui rend la PCR un outil le plus performant dans la recherche et la détection d'un pathogène dans un échantillon biologique, compte tenu de sa spécificité et sa sensibilité qui sont très grande. Le diagnostic par la PCR dans ce cas doit tenir compte de certains critères : le choix des amorces susceptibles d'amplifier de façon très sélective une séquence de l'ADN du virus ou du microorganisme. L'ADN matriciel, d'autres part doit être extrait d'un tissu dans lequel la présence du microorganisme est certaine (notion de tropisme).

Le diagnostic de laboratoire des maladies infectieuses se base sur deux approches :

- a) détecter le microbe lui-même (directement par microscopie ou après culture) ou l'une de ses structures moléculaires (protéines ou acides nucléiques)
- b) mesurer la réponse immunitaire humorale (anticorps spécifiques) ou cellulaire (stimulation lymphocytaire).

Le choix de l'approche analytique dépend du questionnement clinique, du type de pathogène et de l'existence de tests de laboratoire pour le pathogène en question. (**Alexis Dumoulin, 2014**)

Partie bibliographique

	Détection par PCR	Détection d'antigènes	Sérologie	Matériel optimal pour la PCR
Infections respiratoires aiguës				
Influenza (grippe), RSV, adénovirus	Recommandée	Alternative à la PCR (sensibilité moindre)	Pas d'utilité diagnostique	Expectoration, frottis nasopharyngé profond, aspiration nasale
Coqueluche (<i>Bordetella pertussis</i>)	Recommandée dans les 3 premières semaines	Pas d'utilité diagnostique	Détection d'anticorps antitoxine utile dans les phases tardives ¹²	Frottis nasopharyngé profond, aspiration nasale
<i>Legionella pneumophila</i>	Recommandée en complément de la détection d'antigènes	Détection d'antigènes urinaire: méthode de choix pour le dépistage	Pas d'utilité diagnostique	Expectoration, frottis nasopharyngé profond
<i>Chlamydia pneumoniae</i>, <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Recommandée en phase aiguë: sensibilité dépendant du type de prélèvement	Pas d'utilité diagnostique	Utile en complément, pour documenter une séroconversion ^{13,14}	Expectoration, frottis nasopharyngé profond
Infections gastrointestinales virales				
Adénovirus, rotavirus	Alternative à la détection d'antigènes	Méthode de choix pour le dépistage (test rapide)	Pas d'utilité diagnostique	Selles natives
Norovirus	Recommandée	Pas d'utilité diagnostique	Pas d'utilité diagnostique	Selles natives
Infections gastrointestinales bactériennes				
<i>Salmonella</i>, <i>Shigella</i>, <i>Campylobacter</i>, <i>Yersinia</i>	Alternative à la culture (méthode de choix)	Pas d'utilité diagnostique	Pas d'utilité dans la phase aiguë. Rôle controversé pour le diagnostic des arthrites réactives ¹⁵	Selles natives
<i>Clostridium difficile</i>	Alternative ou complémentaire à la détection d'antigènes et de toxines	Utile pour la détection d'antigènes et de toxines, sur selles natives ou après culture	Pas d'utilité diagnostique	Selles natives

Tableau 3 : Exemples de pathogènes fréquents pour lesquels une PCR peut être indiquée pour le diagnostic (revue Med Suisse, 2014)

VIII. Application de la PCR dans divers domaines

La PCR a d'abord été investiguée dans domaines humaines (détection des résistances aux antibiotiques, médecine légale, anomalies génétiques et héréditaires et autres), dans le domaine vétérinaires (traçabilité dans la filière animale, diagnostics des maladies infectieuses surtout dans le cadre de détection des maladies à déclaration obligatoire qu'elles soient zoonotique ou non) et récemment elle commence à être utilisée dans le domaine agricole (étude et compréhension des génomes des plantes et organismes pathogènes, caractéristiques génétiques des variétés végétales et dans l'évaluation du régime alimentaire des animaux)

Partie bibliographique

A. Domaine légale

Comme exemple l'utilisation de la PCR dans la police scientifique :

Autant de séries à la mode dans lesquelles les enquêteurs parviennent à identifier les coupables de crimes sanglants et morbides. Ils élucident ces enquêtes à l'aide entre autres de l'ADN prélevé sur les lieux du crime.

Lors d'une enquête, sur le lieu d'un crime, les enquêteurs disposent de différents matériaux afin de pouvoir prélever toutes traces d'ADN. Ces traces peuvent être du sang, des poils, des résidus de salive ou bien de sperme.

A la suite d'un prélèvement, pour étudier l'ADN, il faut évidemment l'extraire. Cela se fait principalement grâce à la centrifugation. Après cette opération on obtient un surnageant, une suspension qui représente l'ADN qui sera étudié. Cependant, cette suspension est en quantité minimale et ne permet aucune véritable étude. Il faut donc amplifier cet ADN retrouvé par PCR (étapes cités au par avant) et l'ADN coupé est soumis à l'électrophorèse afin de l'identifier.

L'électrophorèse sur gel d'agarose aboutit donc a l'apparition du modèle de l'ADN.

En effet, les différents fragments découpés par les enzymes de restriction sont de tailles différentes et uniques à chacun. Les fragments ont migrés le long du gel et l'on peut ainsi étudier les bandes d'ADN.

Chaque bande est unique, elle correspond à un ADN et elle correspond à un individu. Il suffit donc aux enquêteurs de comparer l'ADN du ou des suspect(s) avec l'ADN qui a été retrouvé sur les lieux du crime. Si les deux bandes concordent et sont les mêmes en tous points alors le suspect est confondu et présumé coupable jusqu'à ce que la justice prenne le relai. (**Site internet8**).

Partie bibliographique

B. Domaine vétérinaire

➤ Traçabilité dans la filière animale

Le développement de nouvelles méthodes de génétique moléculaire émergentes permet de déterminer les caractéristiques de chaque individu et ouvre la voie à l'identification et à la traçabilité des individus et de leurs produits par la procédure de «l'empreinte génétique». L'analyse des séquences d'ADN microsatellites donne des informations très efficaces pour les tests de discrimination et de paternité individuels. Cette information peut être obtenue avec des traces d'échantillon biologique.

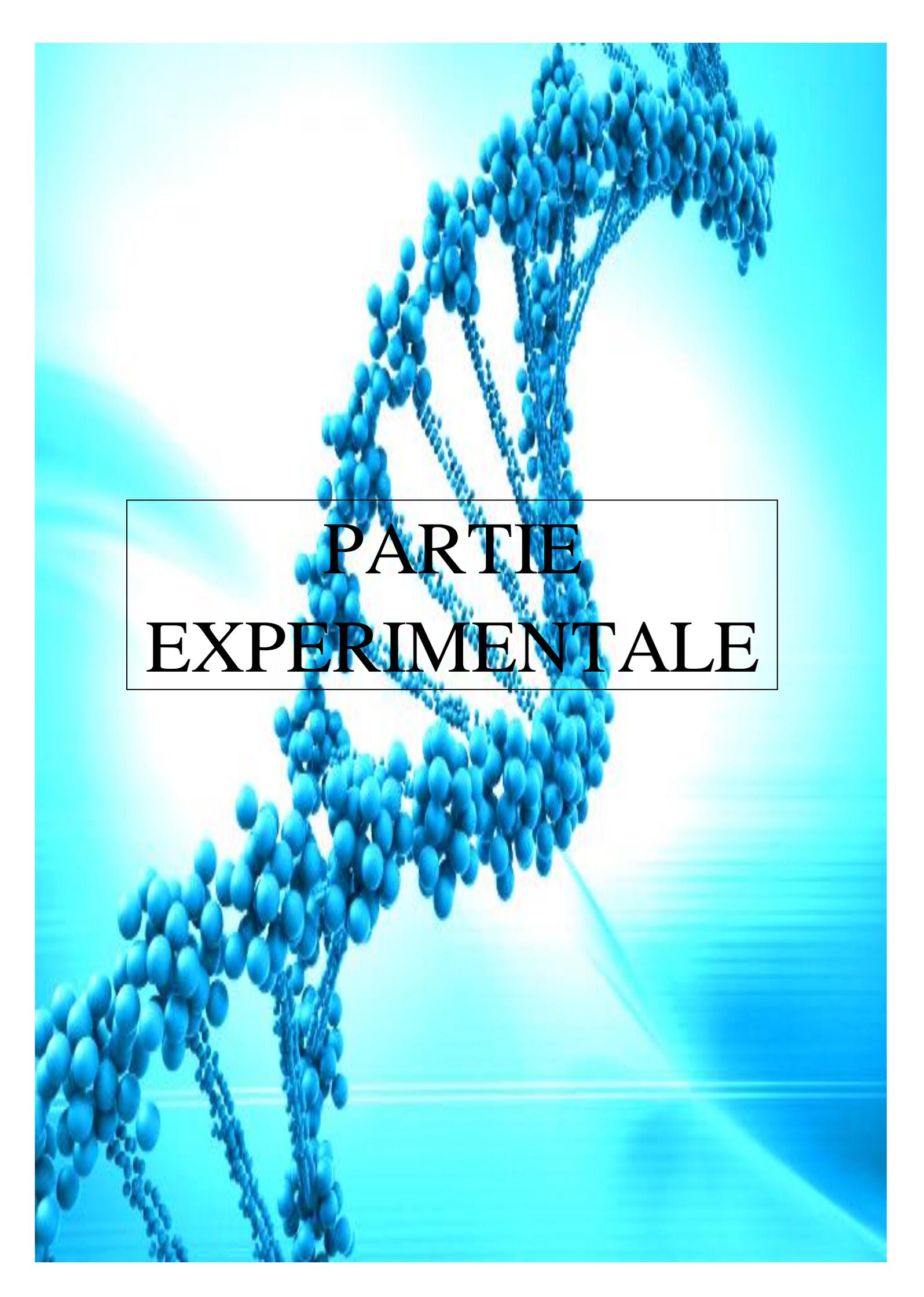
L'empreinte génétique avec analyse des microsatellites est maintenant une méthode fiable, pratique pour l'identification, la certification et l'authentification des produits carnés transformés et non transformés. La première étape de la traçabilité moléculaire dans le secteur bovin nécessite une banque de données capillaires où les échantillons peuvent être conservés pendant de nombreuses années. Ceci est obtenu avec le projet "pilotheque" en relation avec le système de contrôle SANITEL et semble être le meilleur moyen de compléter l'identification des bovins au stade de la production. Avec le nouveau système d'étiquetage de la viande bovine, les empreintes génétiques associées au système SANITEL deviendront un critère de contrôle objectif au stade de la commercialisation. (*D. Portetelle, et al, 2000*)

C. Domaine agricole

Evaluation du régime alimentaire de la Gazelle dorcas du Maroc *Gazella dorcas massaesyala* dans la réserve M'Sabih Talaa par analyse micro histologique

La connaissance du régime alimentaire d'une espèce menacée est d'une importance primordiale pour comprendre sa place dans la communauté biologique ; elle améliore notre compréhension du fonctionnement de l'écosystème dans son intégralité et contribue à mettre en place des plans de gestion efficaces pour la conservation. Plusieurs méthodes ont été développées pour évaluer la composition du régime alimentaire :

L'examen micro histologique des épidermes de plantes contenues dans les fèces est la technique la plus largement utilisée en dépit de l'entraînement nécessaire pour arriver à des déterminations correctes et le biais potentiel des résultats du à la différence de digestibilité entre les différentes espèces de plantes Enfin, la technique basée sur l'analyse de l'ADN pour identifier les espèces constitue un nouveau concept (*AIT BAAMRANE et al, 2017*)



**PARTIE
EXPERIMENTALE**

Partie Expérimentale

I. Matériels et méthodes

Notre travail est porté sur la réalisation d'une enquête sur l'utilisation et la mise en marche de la technique de la PCR dans plusieurs structures hospitalières et aussi dans le domaine vétérinaire en Algérie, et cela à partir d'un questionnaire qui a été distribué à l'intention des responsables et personnels de laboratoire.

L'intérêt de cette étude est :

- ❖ D'évaluer la progression de la PCR en Algérie.
- ❖ De comparer les résultats de notre étude avec ceux qui ont été faites au par avant.
- ❖ D'enrichir nos connaissances sur les différents domaines d'utilisation de cette technique.
- ❖ De souligner quelques difficultés rencontrées lors de la pratique de la PCR
- ❖ de développer certaines suggestions et recommandations afin d'améliorer et d'élargir le champ d'utilisation de la PCR en Algérie.

Ce questionnaire (13 questions) est distribué sur quatre structures qui sont :

- l'hôpital Mustapha Bacha-Alger (service microbiologie et virologie)
- l'hôpital EL-Kattar
- l'Institut National de la Médecine Vétérinaire (INMV)
- laboratoire privé

Les questions portent sur les différents types de PCR utilisés, l'année de mise en marche, le nombre de testes effectués par mois, les germes ou les molécules les plus recherchés, la fiabilité et la marge d'erreur commise, durée de temps pour remise des résultats, le prix et enfin le nombre de personnels formés (Questionnaire en annexe).

Après l'obtention des questionnaires distribués, nous les avons classés selon les réponses obtenues pour chacun des questions traités (cités précédemment). L'exploitation des résultats est réalisée via des tableaux et des schémas au moyen de l'Excel.

II. Résultats et discussions

1. D'après les responsables et les personnels des structures qu'on a visitées, les types de PCR généralement utilisés en Algérie sont :

- PCR en temps réel
- PCR en point final
- RT-PCR

Bien que les types cités ci-dessus sont les plus utilisés, mais ils ont introduit récemment de nouveaux types :

- PCR niché (Laboratoire privé).
- LAMP-PCR (l'INMV).
- PCR multiplex (CHU Mustapha Bacha-service microbiologie).

A. Photos personnel de thermocycleur pour PCR utilisé à l'hôpital d'El Kattar



Figure 16: COBAS : Extracteur et amplificateur en temps réel



Figure 17: COBAS TaqMan 48 : extracteur semi automatique en temps réel



Figure 18: Sacace SaMag-12 : extracteur semi automatique en temps réel (détection des mutations génétiques)

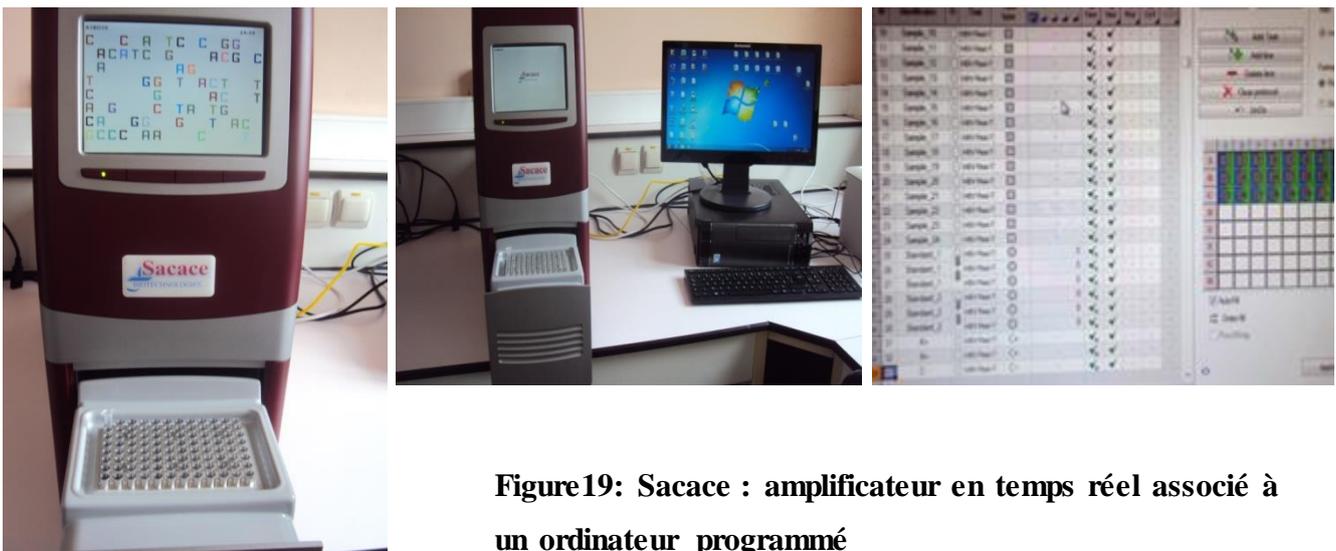


Figure19: Sacace : amplificateur en temps réel associé à un ordinateur programmé

Partie Expérimentale

B. Photos personnel de thermocycleur pour PCR utilisé à l'hôpital Mustapha Bacha (service virologie)



Figure20: Rotor-Gene Q (QIAGEN) : extracteur manuel en temps réel



Figure21: amplificateur et extracteur automatique en temps réel

C. Thermocycleur utilisé au niveau de laboratoire privé :



Figure22 : appareil d'amplification d'ADN (dénaturation, hybridation, élongation)

Partie Expérimentale

Le choix de ces types est en fonction de la rapidité, la fiabilité et la disponibilité des réactifs.

Plus ces types de PCR qui sont utilisés en Algérie, d'autres types sont bien développés ailleurs, plus tôt dans les pays développés :

- **RT-PCR in situ :**

Méthodologie consiste à réaliser la RT-PCR non pas sur des molécules en solution mais sur des groupes histologiques.

- **Race-PCR :** Utilisée pour obtenir et séquencer les extrémités 3' et 5' des transcrits d'ADNc directement à partir de produits de PCR. La méthode utilise une amorce oligo (dT) modifiée qui lui permet de "verrouiller" à la jonction de la séquence d'ADNc spécifique d'un gène et d'une queue poly (A) naturelle (3') ou annexée (5'). En conséquence, des produits de PCR de premier cycle discrets sont obtenus qui sont facilement isolés et séquencés directement. (ND **Borson et al, 1992**)

En comparant avec l'étude qui a été faite par Tobal (2016), on constate qu'en 2 ans l'Algérie a apportée de nouveaux types de PCR (LAMP, mais l'application de ces dernières reste toujours limitée dans certaines structures, consécutives à la faible disponibilité des réactifs, leur cherté et raréfaction des appareils de PCR ainsi que le manque de personnel formé.

Malgré cela, l'Algérie connaît un retard en comparant avec d'autres pays surtout les continents développés concernant l'avancement scientifique.

Partie Expérimentale

2. Les germes et les molécules les plus fréquemment recherchés

Le tableau ci-dessous illustre les germes et les molécules les plus fréquemment recherchés au sein des structures visitées.

Tableau 4 : germes et molécules les plus fréquemment recherchés par PCR

structures germes et molécules	INMV (institut national de la médecine vétérinaire)	CHU Mustapha Bacha MICROBIOLO GIE	CHU Mustapha Bacha VIROLOGIE	EL KATTAR	LABORAT OIRE PRIVE
VIRUS	IA, IBR, CAPRIPOX, NDV, PPR, BTV, FMD, RVF, WND, USUTO	VHB, VHC, CMV, virus respiratoires, entérovirus, HSV1et 2,	VHB, VHC, CMV, virus respiratoires,	HIV, VHC, VHB, CMV	/
BACTERIE S	Salmonelle Listeria Brucella	s aureus, Helicobacter pylore compylobacter, bactérie respiratoires atypiques, méningo- encéphalite, coqueluche, Pneumocoques	/	/	/
PARASITE S	Trypanosomes	/	/	/	toxoplasma gondii
AUTRES	/	Détection des résistances aux antibiotiques	/	ADN PROVIRAL	/

(**IA** : influenza aviaire ; **IBR** : rhino-trachéite infectieuse bovine ; **NDV** : virus de la New Castle ; **PPR** : peste des petits ruminants ; **BTV** : virus de la Bleu Tongue ; **FMD** : fièvre aphteuse ; **RVF** : rift valley fever, **WND** : West Nile Disease ; **VHB** : virus de l'hépatite B ; **VHC** : virus de l'hépatite C ; **CMV** : cytomégalovirus ; **HSV** : Herpes simplex virus ; **HIV** : immunodéficience humaine virus)

Partie Expérimentale

La majorité des structures hospitalières, la technique de PCR est appliquée beaucoup plus dans la recherche des maladies virales que dans la recherche des maladies bactériennes :

➤ **Maladie virales**

- le virus de l'hépatite C(ARN) et B(ADN) par l'amplification du génome en utilisant la PCR en temps réel.
- Cytomégalo virus (CMV)
- Virus respiratoires
- Entérovirus
- Herpes virus
- Virus de l'immunodéficience humain(HIV)

➤ **Maladies bactériennes**

Après nôtres enquête, on a constaté que la recherche des bactéries s'effectue seulement au niveau du service microbiologie à l'hôpital Mustapha Bacha

- Staphylocoque aureus,
- Helicobacter pylore
- compylobacter
- bactérie respiratoires atypiques
- méningo-encéphalite
- coqueluche
- Pneumocoques

Autres que la recherche des germes, certaines structures s'intéresse à appliquer la technique de PCR dans la détection des gènes de résistance aux antibiotiques (Mustapha Bacha-service microbiologie) et la recherche de l'ADN pro viral (hôpital EL-KETTAR).

❑ Dans le domaine vétérinaire, la PCR est utilisée dans la recherche des virus, des bactéries et des parasites.

➤ **L'INMV** : Les virus fréquemment recherchés sont :

- L'influenza aviaire
- New Castle
- Blue Tongue
- Fièvre aphteuse
- Rhino trachéite infectieuse bovine

Partie Expérimentale

- Maladie des muqueuses
 - La peste des petits ruminants
 - Rift Valley Fever
 - West Nile Disease
 - Capripox virus
 - USUTU : est un virus à ARN, zoonotique vectorielle (moustique hématophage), d'origine africaine¹ et considéré comme « émergent ». Il fait partie des arbovirus, au sein de la famille des *Flaviviridae*, responsable d'encéphalite virale. (**site internet 5**)
- Les bactéries recherchées sont :
 - Salmonelle
 - Listeria
 - Brucella
 - Parasites : trypanosomes

En comparant avec l'étude qui a été faite par Tobal (2016), au par avant, l'INMV se limitait seulement dans le diagnostique des maladies virales contrairement à ce qui est vu dans nos résultats apportés ci-dessus.

De plus, il y a un laboratoire privé qui reçoit des échantillons du secteur vétérinaire pour la recherche de *Toxoplasma gondii* par l'utilisation de la PCR classique.

- En Algérie, l'utilisation de la PCR avec ses différents types est limité dans le domaine de diagnostique médical contrairement aux autres pays où la PCR connaît des progrès dans des domaines plus vastes tels que :
 - Domaine génétique : détection et création des mutations génétiques
 - Médecine agro-alimentaire.
 - Médecine vétérinaire : sexage des spermatozoïdes, l'étude d'évolution des espèces
 - Domaine végétal : sécurité alimentaire
 - Fossiles
 - Fabrication des vaccins et médicaments (Inhibiteur de la thrombine traite efficacement

Hématome et inflammation (œdème, rougeur, chaleur).

Partie Expérimentale

3. Le nombre de tests de PCR effectués par mois

Le schéma suivant élucide le nombre de tests/mois réalisé au niveau des structures visitées.

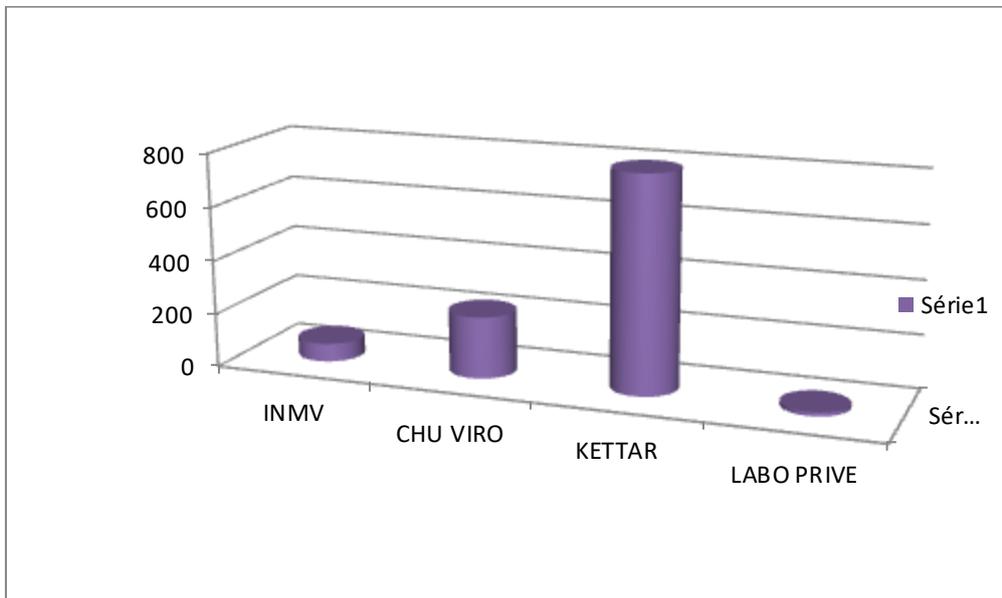


Figure 23: rapport mensuel de l'utilisation de PCR au niveau des structures visitée

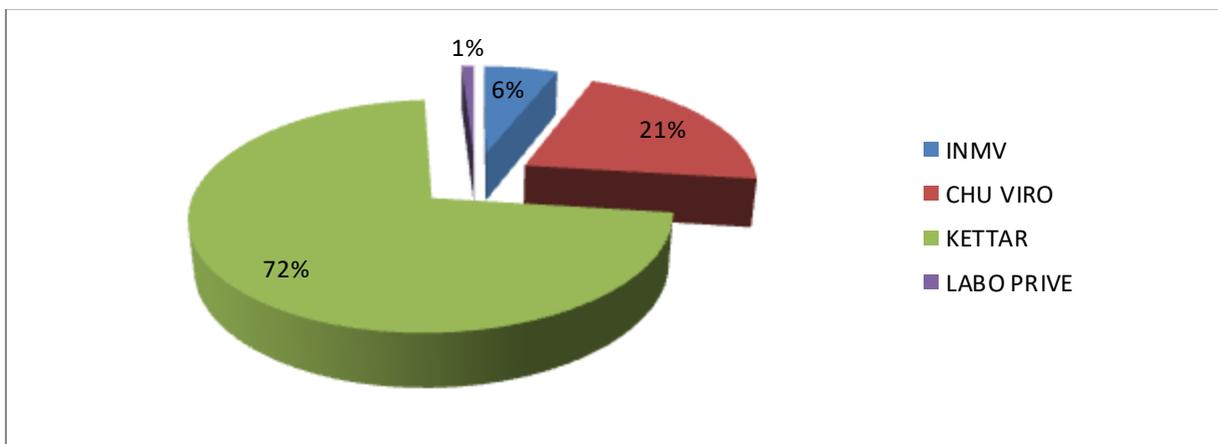


Figure24: pourcentage du nombre de tests effectués par mois dans les différents centres d'analyse sur la wilaya d'Alger.

- ❑ Les tests effectuées par l'hôpital d'El-Kattar représentent la portion la plus grande qui est de 72% des tests totaux effectuées par mois ; soit 1112 ; dont 800 pour cet hôpital.
- ❑ Les tests effectuées par l'hôpital Mustapha Bacha représentent 21% du total ; soit 230 tests virologiques par mois.
- ❑ En troisième position, l'INMV représente une portion plus faible que les autres secteurs hospitalières qui est 6% ; soit 68 tests par mois.

Partie Expérimentale

❑ En dernier lieu, le laboratoire privé représente la portion la plus petite ; qui est uniquement 1% ; soit 14 tests/mois.

- Les résultats obtenus montrent que l'Algérie a fait un bon progrès vers l'introduction de cette technique dans les domaines scientifiques et médicaux ou vétérinaires afin de diagnostiquer les maladies et les agents pathogènes en causes.
- Aussi, les résultats obtenus montrent que le pourcentage de tests par rapport aux demandes est très satisfaisant (toutes les demandes sont passés aux analyses par la PCR) et cela en comparant avec les données de Tobal (2016) qui a trouvé une réponse inférieure à la moitié des demandes.

Tableau 5: nombre de tests effectuées /mois par rapport aux demandes (Tobal, 2016)

Centre d'Analyse	INMV	Hôpital Mustapha Bacha		Hôpital El Kattar
		Virologie	Bactériologie	
Test / Mois	30	50	30	750
Nombre de demande	245	350	200	1200
Test effectué/ demande	12.24%	14.28%	15%	62.5%

- En revanche, on peut dire que le pourcentage des tests reste insuffisant surtout ce qui concerne le domaine vétérinaire (INMV) et cela peut être due au l'ignorance chez la plupart des gens qui veulent diagnostiquer, soit dans le cadre médicale, soit dans le domaine de la médecine vétérinaire en plus de titre onéreux des réactifs.

Partie Expérimentale

4. Durée de remise des résultats, le prix

Le tableau ci-dessous résume, le prix et la durée de remise des résultats au niveau des structures visitées.

Tableau 6 : Durée de remise des résultats et le prix des analyses pour chaque établissement.

	INMV	CHU MICROBIOLOGI E	CHU VIROLOGI E	EL KETTAR	LABORATOIR E PRIVE
REMISE DES RESULTAT S	6-24H	24H	6H	5-7 JOURS	1 MOIS
PRIX	GRATUI T	/	1000 DA	GRATUI T	4000 DA

Durée de remise des résultats

On remarque que la durée de remise des résultats est pratiquement très courte pour la technique de PCR par rapport aux autres méthodes d'analyse des échantillons surtout en utilisant des appareils automatisées qui ont facilités énormément l'utilisation de la PCR.

La durée de remise des résultats est variable selon :

- 1) La priorité aux cas d'urgence.
- 2) Selon le nombre de demande.
- 3) Selon le type de PCR utilisé.
- 4) Selon la disponibilité et le stockage des réactifs.
- 5) Le nombre de personnels formés.

Le prix

Pour les établissements d'états les tests sont gratuits (INMV, El Kattar) ou un prix symbolique (CHU, laboratoire de virologie qui est de 1000 DA), ce qui encourage la demande et l'utilisation de cette technique surtout pour les centres de suivie et de contrôles.

Par contre, le prix fixé par les laboratoires privés est cher, et cela due peut être au titre onéreux des réactifs et les appareils.

Partie Expérimentale

NB : le nombre de testes effectués par mois pour le laboratoire de microbiologie à l'hôpital Mustapha Bacha est variable selon la disponibilité des réactifs d'où les personnels n'ont pas pu répondre à cette question ainsi leur ignorance concernant le prix donné aux résultats d'analyses.

5. Le nombre de personnels formés

Ce schéma présente le nombre de personnes formées pour chaque établissement mis en question.

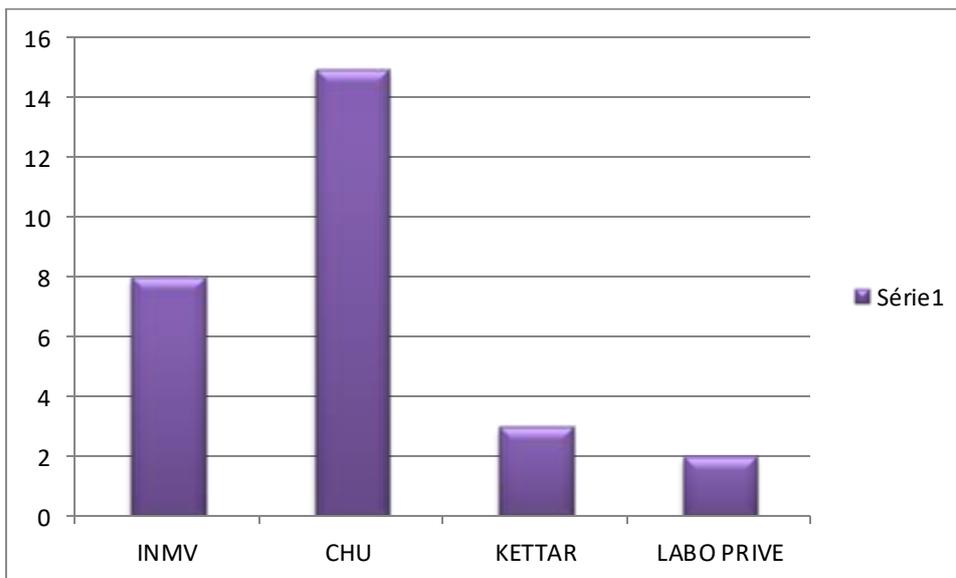


Figure25: Nombre de personnels formés pour chaque structure visitée

- CHU Mustapha Bacha est classé le premier du côté de personnels formés qui est 15 personnes, soit plus de 10 personnes pour le laboratoire de microbiologie et 5 personnes pour le laboratoire de virologie.
- Le deuxième est l'INMV, soit 8 personnes.
- Ensuite c'est El Kattar qui est présenté par 3 personnes formés.
- Et en dernier le laboratoire privé où le nombre de personnels formés est de 2.

Le nombre limité de personnes formées pour cette technique confirme que la PCR en Algérie reste toujours mal exploitée, consécutive à l'introduction récente de la PCR dans les différents domaines de la médecine, ainsi le manque de formation et de la sensibilisation des personnels.

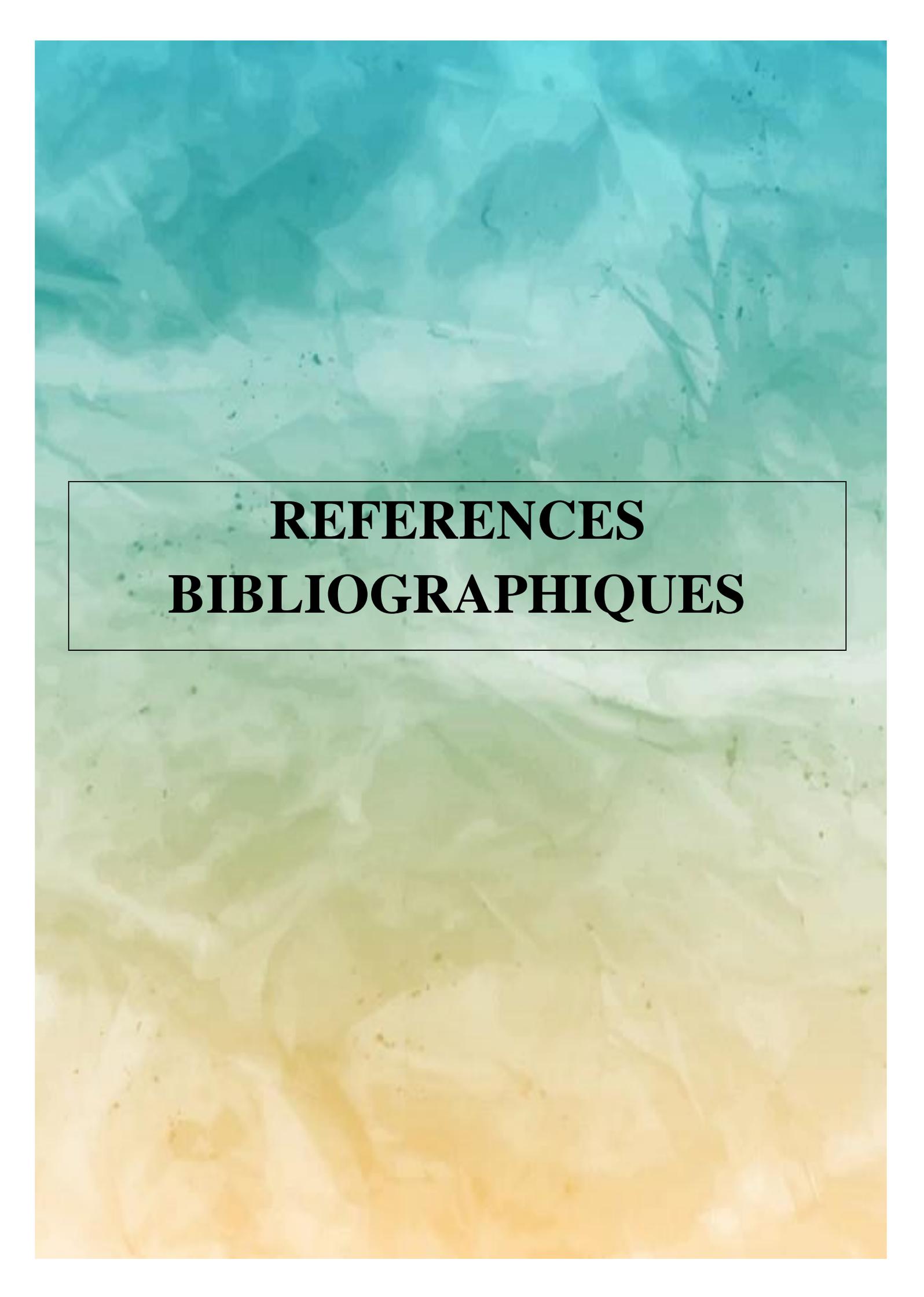
6. La date de mise en marche du PCR

- a) CHU Mustapha Bacha : depuis 2006 pour le laboratoire de virologie.
Pour le laboratoire de microbiologie (CHU Mustapha Bacha) le personnel n'a pas répondu sur cette question
- b) Hôpital El Kettar : l'introduction du PCR en point final en 2004, et la PCR en temps réel en 2009.
- c) L'NMV : depuis 2006.
- d) Laboratoire privé : depuis 2012.

Ce qui confirme que la PCR en Algérie est une technique nouvellement introduite pour le domaine de diagnostic, alors que le principe de cette technique a été décrit en 1986.

III. Conclusions et recommandations

- La biologie moléculaire permet de procéder à de nouvelles analyses, avec précision et rapidité, sur des infections ou maladies potentiellement dangereuses pour l'homme et l'animal, jusqu'alors difficilement détectables.
Autre avantage, cette technique de pointe rend possible des actions d'analyses collectives à très grande échelle.
- La PCR a révolutionnée les approches expérimentales en biologie moléculaire, et rapidement s'est implanté dans les laboratoires, à la tête la PCR en temps réel qui est considérée comme une méthode impressionnante et récente.
- La PCR comme toute autre technique expérimentale n'est pas à l'abri des risques de contamination ou des erreurs quelque soit lors de la manipulation ou lors de l'interprétation des résultats d'où la nécessité d'être vigilant car de nombreuses études restent nécessaire pour définir le seuil de positivité traduisant signification pathologique.
- L'introduction de la PCR en Algérie depuis 2004, été le point de départ pour renforcer le domaine de diagnostic dans différents domaines quels soit médicale, agricole, vétérinaire ou légale.
- La comparaison entre l'étude qui a été faite en 2016 par TOBAL et notre étude (2018) nous permet de souligner une progression remarquable de la PCR au niveau des centres d'analyses étudiés(en 2016 : le nombre de teste effectués par l'INMV était de 30 tests par mois avec une réponse de 12% aux demandes, en 2018 ils ont fait 68 tests par mois avec une réponse de 100% aux demandes). En revanche, l'Algérie s'attarde modéré par rapport aux laboratoires mondiaux, espérant la modernisation et l'élargissement des domaines de recherches dans la biologie moléculaire.
- Pour promouvoir la biologie moléculaire en Algérie, il faut faciliter l'accès avec des formations adéquates par le biais d'encourager les scientifiques théoriquement, moyennement et financement.



REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Abderrahmen Mafteh, Raymond Julien, novembre 2004.** « biologie moléculaire »
2. **AIT BAAMRANE et al, 2017 :** «Evaluation du régime alimentaire de la Gazelle dorcas du Maroc *Gazella dorcas massaesyala* dans la réserve M'Sabih Talaa par analyse micro histologique ».
3. **Baazizi R, 04/03/2018 à 12h30, cours pathologies infectieuses.** « la grippe aviaire »)
4. **Bernard H et al, 2008 :** « appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire »
5. **C. Housset, A.Raisonnier : université pierre et marie curie, 2010.** « purification d'ADN ».
6. **Copyright Gnis, 2007-2018,** les marqueurs RFLP.
7. **D. Portetelle et al, 2000.** « Traçabilité dans la filière animale », Vol. 4, No 4
8. **Dr CHADI, Magistère en médecine vétérinaire soutenu à l'ENSV :** « PCR: technique et application ».
9. **Extrait de banque de schémas SVT - Académie de Dijon (Alain Gallien) :** Schéma des différentes étapes d'un Southern blot.
10. **Franck Pellestor, 2006.** « Prince and in situ-PCR protocols », Chapitre17 : application of reverse transcription in situ-PCR in cancer analysis
11. **Geojith G et al, 2011.** "Efficacy of loop mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the laboratory identification of Mycobacterium tuberculosis isolates in a resource limited setting". J. Microbiol. Methods.
12. **J.Watson et F.Crick, 1953.** « molucular structure of nucleic acids », Nature, vol.171, pp.737-738
13. **John M. Butler, 2009.** « Fundamentals of forensic DNA typing », chapter7 : DNA Amplification-multiplex PCR
14. **John M. Walker, Ralph Rapley, 2009.** « Molecular biologie and biotechnologie », chapitre4, page82
15. **John M. Walker, Ralph Rapley, 2009.** « Molecular biologie and biotechnologie », chapitre4, page83
16. **Kojo et al, 1993.** « Evaluation de diagnostique par PCR directe et PCR-ELISA sur les ITS des trypanosomes pathogènes du bétail »
17. **Manuel terrestre de l'OIE, 2008, Chapitre 1.1.7.** Les biotechnologies dans le diagnostic des maladies infectieuses et le développement des vaccins

18. **Mimoune et Messai, 2008. Exposé :** La PCR: La réaction de polymérisation en chaîne.
19. **Mori Y, et al, 2000.** "Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation". Biochem. Biophys. Res. Commun.
20. **ND Borson et al, 1992.** « A lock-docking oligo (dT) primer for 5' and 3' RACE PCR ».
21. **Njiru ZK et al, 2008.** "African trypanosomiasis: sensitive and rapid detection of the sub-genus Trypanozoon by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of parasite DNA"
22. **Notomi T et al, 2000.** "Loop-mediated isothermal amplification of DNA"
23. **Reviews in biologie and biotechnologie by the Moroccan society of biologie in canada vol 2, décembre 2002.**
24. **Revue Med Suisse, 2014, volume 10 :** Exemples de pathogènes fréquents pour lesquels une PCR peut être indiquée pour le diagnostic.
25. **Science Direct Support Center :** détection des produits de la LAMP.
26. **Single Nucleotide Polymorphisms pp 415-424, 05 August 2009:** Illustration de la technique Mismatch
27. **Site internet 1:** www.slideplayer.fr. « la sélection d'une séquence cible par un logiciel »
28. **Site internet 2:** www.blog-du-labo-nde.over-blog.com.
29. **Site internet 6:** https://fr.wikipedia.org/wiki/Mismatch_repair
30. **Site internet 3:** Reviews in biologie and biotechnologie by the Moroccan society of biologie in Canada vol 2, 2002).
31. **Site internet4 :** Article in International Journal of Food Microbiology 266· December 2017)
32. **Site internet7 :** <http://www.fac.org.ar/scvc/llave/pediat/diaz/diazi.htm>
33. **Site internet8 :** [https://police-scientifique.webnode.fr/sources/\)06/06/2018_à_23h02](https://police-scientifique.webnode.fr/sources/)06/06/2018_à_23h02)

34. **Site internet5:** https://fr.wikipedia.org/wiki/Maladie_g%C3%A9n%C3%A9tique
35. *Tanner et al, 2012.* "Simultaneous multiple target detection in real-time loop-mediated isothermal amplification". BioTechniques
36. **TOBAL, 2016. Mémoire de fin d'étude soutenu à l'ENSV :** « Enquête sur la pratique de la PCR en Algérie »
37. www.école-adn.fr . « Institut de formation, innovation en génétique »
38. www.futura-sciences.com
39. www.memoireonline.com
40. www.wikipidia.com



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique

المدرسة الوطنية العليا للبيطرة

Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire

Questionnaire à l'intention des responsables et personelles de laboratoire

Ce questionnaire s'inscrit dans le cadre d'un projet de fin d'études à propos de la biologie moléculaire en Algérie.

Répondez, SVP, à ce questionnaire en se basant sur vos pratiques quotidiennes.

1. Quelle technique de biologie moléculaire utilisez-vous dans votre service ?

-

2. L'année de mise en marche de la technique de PCR dans votre structure ?

-

3. Quels sont les différents types de PCR utilisés ?

-

-

-

4. Quel est le type le plus utilisé dans votre service ?

-

5. Sur quels critères vous basez pour choisir le type ?

-

-

-

6. Nombre de tests effectués par mois ? (bilan mensuel ou annuel)

7. Les germes ou les molécules les plus recherchés lors des tests ?

virus	Bactéries	Parasites	Autres

8. Quelle est la fiabilité des résultats obtenus et quelle est la marge d'erreur commise ?

-

9. Durée de temps pour remise des résultats ?

-

10. Le prix d'analyse ?

-

11. Combien de personnels qui sont formés pour l'application de cette technique dans votre structure

-

12. Contraintes rencontrées lors de l'utilisation de cette technique ?

-

-

-

13. Recevez-vous des échantillons du secteur vétérinaire ?

-

14. Quelles sont vos recommandations ?

-

-

-

-