

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة امحمد بوقرة بومرداس

Université M'hamed Bougara de Boumerdès



Faculté des Sciences  
Département de Biologie

Mémoire de fin d'études  
En vue de l'obtention du diplôme de Master  
Domaine : science de la vie et de la nature  
Filière : Biologie Cellulaire et Moléculaire  
Spécialité: Génétique

**APPLICATION DE BIOLOGIE MOLECULAIRE DANS LE  
DIAGNOSTIC MOLECULAIRE DES INFECTIONS CAUSEES  
PAR :  
BORDETELLA PERTUSSIS, ENTEROVIRUS ET LES  
HERPESVIRIDAE PAR PCR EN TEMPS REEL**

Présenté par : M<sup>lle</sup> BENTAALLA Sara

M<sup>me</sup> BOUNOUS Amina

Soutenu le : 22/06/2016

Devant le jury :

Présidente : Mme BOUCHEAK-ARAB O..... MCB (UMBB)

Promotrice : M<sup>me</sup> ABAD M. A ..... Assistante (C.H.U. HUSSEIN DEY)

Co-promotrice: M<sup>me</sup> AIT IDIR ..... MCB (UMBB)

Examinatrice : Mme ALLOUANE ..... MCB (UMBB)

Promotion 2015/2016

## *Remerciement*

*Nous remercions dieu le tout puissant de nous avoir donné la santé et la volonté d'entamer  
et déterminer ce mémoire.*

*C'est avec un grand honneur et un grand plaisir que nous remercions notre promotrice  
Mme **ABAD** Malika Amel assistante santé public, pour nous avoir proposé ce  
sujet et pour nous avoir dirigé tout au long de la réalisation de ce travail et pour son esprit  
scientifique. Soyez assuré de tout notre respect et de notre profonde gratitude.*

*Nous adressons toute notre gratitude à notre co-promotrice: Madame **AGDJR**  
pour sa disponibilité, sa patience, ses précieux conseils et ses encouragements, et ses  
judicieuses orientations.*

*Nous remercions sincèrement Madame **BOUHFENAK-ARAB** pour nous  
avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce mémoire, Nous adressons toute notre gratitude  
ses ces judicieuses orientations.*

*Nous remercions également Madame **ALLOUANE** pour avoir fait l'honneur  
d'accepter de se joindre à ce Jury de Mémoire, nous vous remercions pour toutes vos  
conseils et vos orientations.*

*Nous adressons toute notre gratitude à notre responsable Mr  
**HAMADOUCHE**.*

*Nos profonds remerciements vont également à toutes les personnes qui nous ont aidés et  
scutenue de près ou de loin.*

# Dédicace

A mes chers parents

Tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je vous porte, ni la profonde gratitude que je vous témoigne pour tous les efforts et les sacrifices que vous n'avez jamais cessé de consentir pour mon instruction et mon bien-être.

A mon trésor et cher amour **YOUNES**

Je t'exprime à travers ce travail tout les sentiments d'amour.

Merci pour toute l'aide et le soutien que tu m'as apporté.

Que Dieu te garde pour moi et nous rassemble dans les deux vies.

A mes chères sœurs **NASSIMA, MOUNIA** et **RIMA**

Tous mes vœux de bonheur, santé et de réussite.

A mon cher frère **ABDOU**

Je te souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de réussite.

A ma grande famille

En témoignage de mon respect et de mon amour.

A mes précieuses amies **BIBA** et **NAWEL**

En témoignage de l'amitié qui nous unit et des souvenirs de tous les moments que nous avons passés ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.

A tous mes amies et mes collègues sans exception.

A ma Chère Bînôme : **BOUNOUS AMINA**

Qui ma m'a appris le sens de la persévérance.

A la mémoire de ma grand mère **YAKOUT**

« Que dieu l'accueille dans son vaste paradis ».

A toutes personnes qui m'ont aimée et respectée tout au long de ma vie.

SARA

## *Dédicace*

*C'est avec toute l'ardeur de mes sentiments que je dédie ce modeste travail à :*

*Mes chers parents ma mère et mon père Pour leur patience, leur amour, leur soutien et leurs encouragements, aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que vous mérites pour tous les sacrifices qu'ils n'ont cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte.*

*Que Dieu me les garde*

*A mon très cher mari et mon amour **Khaled***

*Ton sacrifice, ton soutien moral, ta gentillesse sans égal, ton profond attachement m'ont permis de réussir mes études. Sans ton aide, tes conseils et tes encouragements ce travail n'aurait vu le jour. Au nom de l'amour et d'respect je te dire merci*

*A mon adorable petite fille Célia Assil*

*A mes chères sœurs :*

*Fatiha, Safia, Salima et Hassina*

*Je vous souhaite une vie pleine de bonheurs et de réussites*

*A mon beau-frère Younes qui m'a trouvé le lieu de stage*

*A mes chers collègues de travail :*

*Feroudja, Ouassila, Fouzia, Amira, Amina, Zhira, KHadija, Nadia, Hanane, Dalale, Samia, Houria, Noura, Yakout, de l'EPH Bordj Menaiel*

*Sans votre patience, votre amitiés, votre encouragements et votre aides je ne peux pas continuer mon études merci beaucoup*

*A mon chef de service Benfetoum Achour merci pour me laissez terminer mes études*

*A ma chère amie et mon binôme : sara je te souhaite une longue vie pleine de réussite d'amour et de bonheurs*

*Famille : Bounous et KHettab*

*Enfin, je voudrais dédier ce mémoire à tout personnes ayant participé de loin ou de près à la réalisation de cette travaille.*

*Amina*

# Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction	1
Chapitre I : Synthèse bibliographique	
1. Principe général des techniques de biologie moléculaire	3
2. Principales techniques de biologie moléculaire	
2.1 Préparation des acides nucléiques	
2.2 Séparation des acides nucléiques, mesurer leur taille	6
2.3 Amplification de séquence d'ADN	7
2.4 Détermination des séquences nucléiques et protéiques	14
2.5 Construction des banques	20
3. Biologie moléculaire dans l'étude des agents infectieux	21
3.1 Etude des agents infectieux	
3.2 Principales techniques de biologie moléculaire utilisées dans l'étude des agents infectieux	30
3.3 Choix des automates et des kits commerciaux pour la microbiologie	36
Chapitre II : Matériel et méthodes	
1. Matériel	39
2. Méthodologie	40
2.1 Extraction d'ADN	
2.2 Recherche des germes	41
2.2.1 Amplification par PCR en temps réel	
Chapitre III : Résultats et discussion	
1. Résultats	46
1.1 Détection de <i>Bordetella pertussis</i> à partir des aspirations naso-pharyngées	
1.2 Détection d'Entérovirus dans le LCR	
1.3 Détection d'Herpesviridae : CMV /EBV/HSV1/HSV2 à partir du sang total	49
2. Discussion	51

Conclusion	54
Références bibliographiques	56
Annexes	
Résumé	

# Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN codant

ARN : acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messenger

ARNr : acide ribonucléique ribosomique

ARNt : acide ribonucléique de transfert

BAC : Bacterial artificial chromosome (chromosome bactérien artificiel)

BET : Bromure d'éthidium

CMV : cytomégalovirus

DGGE: denaturing gradient gel electrophoresis (Électrophorèse sur gel en gradient dénaturant)

DHPLC: denaturing high performance liquid chromatography (Chromatographie liquide à haute performance sur gel dénaturant)

dNTP : désoxyribonucléotides

ddNTP : didésoxyribonucléotide

EDTA : Éthylène Diamine Tétra-Acétique ou acide éthylène diamine tétraacétique

EBV : Epstein-Barr

HA: heteroduplex analysis (analyse d'hétéroduplexe)

HSV1 : virus herpes simplex type 1

HSV2 : virus herpes simplex type 2

LCR: ligase chain reaction (réaction de ligature en chaîne)

PCR : Polymerase Chain Reaction

RT-PCR : reverse transcription - Polymerase Chain Reaction

SDA: strand displacement amplification (déplacement de brin d'amplification )

SDS : sodium dodécylsulfate

SSCP: single strand conformation polymorphism (Polymorphisme de conformation des simples brins)

TAE : Tris/Acétate/EDTA

TBE : Tris/Borate/EDTA

VHB : hépatite B

VIH : l'immunodéficience humaine

YAC: Yeast artificial chromosome (chromosome artificiel de levure)

## Liste des figures :

Figure1: Évolution des techniques de biologie moléculaire depuis la PCR	8
Figure 2 : Schéma de principe de la technique de PCR	10
Figure3 : Le suivi en temps réel d'une réaction PCR	13
Figure4: Principes du séquençage selon la méthode de Sanger	19
Figure 5 : Principe d'extraction d'ADN bactérien	32
Figure 6 : résultat de la PCR en temps réel qualitative sur la <i>Bordetella pertissus</i> .	47
Figure 7 : résultat de la PCR en temps réel qualitative sur les entérovirus à partir des LCR	48

## Liste des tableaux :

Tableau I : Quelques applications du séquençage	18
Tableau II : Quelques gammes de kits commercialisées pour la microbiologie clinique.	37
Tableau III : Principaux automates dédiés spécifiquement aux kits de biologie moléculaire pour la microbiologie.	38
Tableau V I : Le diagnostic moléculaire des patients étudiés.	39
Tableau V : Conditions d'amplification de la PCR en temps réel qualitative pour la détection de <i>Bordetella pertussis</i> à partir d'aspiration naso-pharyngé	43
Tableau VI : Conditions d'amplification de la PCR en temps réel qualitative pour la détection des entérovirus à partir du LCR.	44
Tableau VII: Conditions d'amplification de la PCR en temps réel quantitative pour la détection des CMV, EBV, HSV1, HSV2 à partir du sang total	45
Tableau VIII : résultat de recherche de rétrovirus par PCR en temps réel quantitative.	50

# Introduction

Au XXe siècle, suite à l'élaboration des lois de la génétique, de la découverte des chromosomes et de l'identification de l'ADN comme support de l'information génétique, est apparue la biologie moléculaire (Medraoui, 2014).

La biologie moléculaire comprend l'ensemble des techniques basées sur l'étude, la détection et la modification des acides nucléiques. C'est un outil à la fois de recherche, de diagnostic et de prédiction des maladies en médecine humaine (Tella, 2013).

Depuis la mise au point de la technique d'amplification par PCR (polymerase chain reaction) en 1983, la biologie moléculaire s'est implantée rapidement dans les laboratoires de microbiologie clinique (Lamoril *et al.*, 2007).

En effet, bien que de nombreuses techniques de microbiologie appliquées dans la recherche de *Bordetella pertissus*, les *entérovirus* et les *herpesviridae* (culture bactérienne, culture cellulaire « seulement viral », sérologie, test immunologique « ELISA »), la biologie moléculaire a pu trouver sa place en routine dans le diagnostic moléculaire de ces germes responsables des maladies infectieuses suivantes: la coqueluche, la méningite virale et le rejet des greffes.

L'étude des agents infectieux à l'aide des outils de biologie moléculaire est ainsi devenue indispensable dans certaines indications.

La biologie moléculaire est parfois le seul outil capable de détecter un nouvel agent pathogène. Comparée aux techniques de microbiologie classique, la biologie moléculaire présente de nombreux avantages. Le résultat est rapide, sensible et spécifique, permet la confirmation du diagnostic, un traitement adapté et une hospitalisation plus courte. Les infections nosocomiales peuvent être dépistées plus tôt, la source d'infection identifiée, le traitement et la prophylaxie ajustés. Enfin, l'automatisation se développe progressivement, facilitant ainsi la mise en place de ces techniques et améliorant ses performances (notamment sa rapidité d'analyse) tout en diminuant ses inconvénients (Lamoril *et al.*, 2007).

L'objectif de ce travail porte sur le diagnostic moléculaire des agents infectieux : *Bordetella pertissus* responsable de la coqueluche, les *Entérovirus* responsable de la méningite virale et les *Herpesviridae* lors le rejet du greffe, par application de certaines techniques :

- Extraction de l'ADNN génomique des agents pathogènes,

- Amplification de l'ADN extrait par PCR en temps réel réalisée en deux méthodes : qualitative dans le cas de recherche de la présence ou l'absence de la Bordetella pertussis et des entérovirus, quantitative dans la recherche à la fois de la présence ou l'absence des Herpesviridae et de quantifier leurs concentration dans un échantillon.

Cette étude est divisée en trois parties, la première est une synthèse bibliographique sur la biologie moléculaire et ces principales techniques, plus de son application en microbiologie y compris l'étude microbiologie des agents infectieux. La deuxième porte le matériel et les méthodes et la troisième comprend les résultats et discussion.

## **2. Principe général des techniques de biologie moléculaire**

En 1961, William Astbury a décrit la biologie moléculaire comme étant: "plus qu'une technique mais une approche qui s'intéresse à l'étude des manifestations biologiques à l'échelle moléculaire. Elle s'intéresse particulièrement aux formes tridimensionnelles et structurales des molécules biologiques et à leurs fonctions" (Lodish et *al.*, 2005).

La biologie moléculaire est une discipline qui s'intéresse à l'étude des bases moléculaires de la biologie et à l'activité biologiques des molécules au niveau cellulaire, elle inclut de nombreux acteurs: ADN, ARN et protéines (Monier et Cécillon, 2012).

## **3. Principales techniques de biologie moléculaire**

Les outils de biologie moléculaire regroupent un ensemble de techniques de pointe utilisées pour les analyses biologiques d'organismes vivants et la compréhension des mécanismes de la cellule à l'échelle des molécules (Monier et Cécillon, 2012).

Les techniques de biologie moléculaire évoluent rapidement (Figure1). Leurs principes et indications varient selon les applications (Lamoril et *al.*, 2007).

### **2.1 Préparation des acides nucléiques**

#### **2.1.a Extraction et purification d'ADN**

La préparation d'ADN consiste en une digestion des membranes cellulaire et nucléaire des cellules pour libérer l'ADN et le solubiliser. Plusieurs protocoles utilisent la dégradation enzymatique des protéines par la protéinase K dans un tampon contenant du sodium dodécylsulfate (SDS) affaiblissant les membranes. La digestion est suivie d'une étape de purification pour éliminer les protéines et les contaminants récupérés avec l'ADN en solution. Cette étape est importante puisque les différents composés de la solution de lyse et les enzymes cellulaires peuvent entraîner la dégradation du matériel génétique ou perturber les analyses ultérieures (Boirgoin, 2000).

L'exemple le plus appliqué pour l'homme est celui de l'isolement d'ADN à partir du sang total.

***Différentes étapes d'extraction de l'ADN du sang*** (Huybens et *al.*, 2009) :

- Le lavage : Une première étape consiste à éliminer les globules rouges et toutes les impuretés du milieu extra cellulaire. On ajoute aux prélèvements effectués une solution

hypotonique qui fera éclater les globules rouges. Les globules blancs étant beaucoup plus résistants, ils ne seront pas détruits.

Comme les globules rouges ne contiennent pas d'ADN, il sera extrait des globules blancs.

- La centrifugation permet de séparer les globules blancs des débris de globules rouges. A la fin de la centrifugation, il apparaît au fond du tube un « culot » blanc (ce sont les restes de globules blancs) et un « surnageant » rouge (ce sont les débris de globules rouges) que l'on va retirer du tube.

Ces deux premières étapes sont réalisées jusqu'à ce que la solution au dessus du « culot » soit limpide.

- La destruction des globules blancs (ou lyse des blancs) : Pour cette étape, on utilise une solution agressive de détergent afin de déstabiliser la membrane des globules blancs et le noyau de la cellule. Ensuite, une enzyme appelée « Protéinase K » est ajoutée à la solution. Elle va dégrader les protéines de la cellule. Une incubation entre 55 et 65°C pendant quelques minutes active la protéinase K.

Suite à cette étape, le tube contient un mélange d'ADN, et les restes des cellules : fragments de protéines, résidus de la membrane de la cellule et toutes les molécules du cytoplasme.

- Précipitation de l'ADN : Grâce à la précipitation, on peut séparer l'ADN du reste de la solution de lysat.

Par l'isopropanol pur (dit isopropanol 100%) s'est l'ADN.

- Élimination de la solution de lyse : La centrifugation va mettre la pelote d'ADN au fond du tube. Ainsi, on pourra éliminer le surnageant contenant les restes de la cellule sans toucher à l'ADN.

- Lavage à l'éthanol 70% : Pour éliminer le maximum de la solution de lyse, l'éthanol 70% sera plus efficace que l'isopropanol pour éliminer les restes de la solution de lyse, car il contient 30% d'eau.

### 2.1.b Extraction d'ARN

Différents protocoles pour extraire l'ARN avec même schéma de principe :

Lyse cellulaire mécanique (congélation, billes de céramique ou détergents) ou enzymatique (lysozyme ou la lyticase)+Protection des ARN de l'action des ARNases.

2 grands principes:

- 1) les différences de propriétés physico-chimiques ARN/protéines ;
- 2) l'adsorption sélective des ARN sur support solide.

*Purification:*

chromatographie d'affinité entre cette queue poly(A) et une colonne dont la phase fixe est pourvue de fragments d'oligo(dT) de quelques dizaines de nucléotides qui peuvent s'hybrider avec les RNA poly(A) (Medraoui, 2014).

### 2.1.c Dosage

Le dosage s'effectue par spectrophotométrie où les bases puriques et pyrimidiques absorbent fortement dans l'ultraviolet à 260 nm. Une unité de densité optique à 260 nm (DO lue sur le spectrophotomètre) correspond à une solution d'ADN double brin à 50 µg/ml. Une solution d'ARN ou d'ADN simple brin correspond à 25 µg/ml. Aussi il convient de rechercher une éventuelle contamination protéique car les protéines absorbent non seulement à 280 nm mais aussi à 260 nm. Pour cette raison on effectue une seconde mesure de DO à 280 nm. Un ADN pur doit avoir un rapport de 260/280 compris entre 1,8 et 2. Une éventuelle contamination par du phénol peut être recherchée en mesurant l'absorption à 270nm (Raisonnier, 2006).

## **2.2 Séparation des acides nucléiques, mesurer leur taille**

### **2.2.a Electrophorèse**

L'électrophorèse, la migration d'un ion dans un champ électrique, est utilisée dans les séparations analytiques des molécules biologiques, la méthode d'électrophorèse la plus couramment utilisée est celle de l'électrophorèse en zones

Une technique dans laquelle l'échantillon est contraint à se déplacer dans une phase solide, comme le papier filtre, la cellulose, ou d'un gel.

Par cette technique:

1) on élimine largement l'agitation provoquée par la convection, un facteur limitant du point de vue résolution.

2) en plus, cette technique requiert une quantité faible de matériel permettant ainsi la migration des composantes en bandes discrètes. (Lassoued, 2007).

### **2.2.b Centrifugation**

La centrifugation permet de séparer des constituants de taille et de masse très variables contenus dans un liquide, depuis des molécules jusqu'à des cellules entières.

#### Centrifugation différentielle :

L'étape initiale la plus courante dans la purification des protéines est de la séparation des protéines solubles du matériel cellulaire insoluble grâce à la centrifugation différentielle. Un mélange de départ, généralement un homogénat cellulaire, est versé dans un tube et soumis à une rotation à une vitesse et pendant une durée qui force les organites cellulaires tels que les noyaux à s'accumuler dans le fond du tube sous la forme d'un culot, les protéines solubles restent dans le surnageant. La fraction du surnageant est ensuite récupérée et peut être soumise à d'autres techniques de purification pour séparer les nombreuses protéines qu'elle contient (Lodish et *al.*, 2005).

#### Centrifugation zonale :

En raison de leurs différences de masse, les protéines peuvent être séparées par centrifugation à travers une solution de densité croissante appelée gradient de densité. Une solution concentrée de saccharose est également utilisée pour créer ces gradients de densité. Lorsqu'un mélange protéique est déposé en haut d'un gradient de saccharose dans un tube et soumis à une centrifugation, chaque protéine du mélange migre vers le fond du tube, à une vitesse contrôlée par les facteurs qui affectent la constante de sédimentation. Toutes les protéines se trouvent initialement dans une zone étroite en haut du tube et se séparent en bandes ou zone (en réalité des disques) de protéines de masses différentes (Lodish *et al.*, 2005).

De manière générale, après l'extraction des acides nucléiques, ces derniers doivent être amplifiés avant d'être analysés (figure 1). Les techniques de biologie moléculaire évoluent rapidement. Leurs principes et indications varient selon les applications. Bien que ces nombreuses techniques soient différentes, elles présentent toutes des avantages et des inconvénients communs (Lamoril *et al.*, 2007).

### **2.3 Amplification de séquence d'ADN**

#### **2.3.1 Principe général d'une amplification de l'ADN :**

La réaction PCR (*Polymerase Chain Reaction*) permet d'amplifier *in vitro* une région spécifique d'un acide nucléique donné afin d'en obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier.

Pour se faire, une série de réactions permettant la réplication d'une matrice d'ADN double brin est répétée en boucle. Ainsi, au cours de la réaction PCR, les produits obtenus à la fin de chaque cycle servent de matrice pour le cycle suivant, l'amplification est donc exponentielle (Borde, 2006).

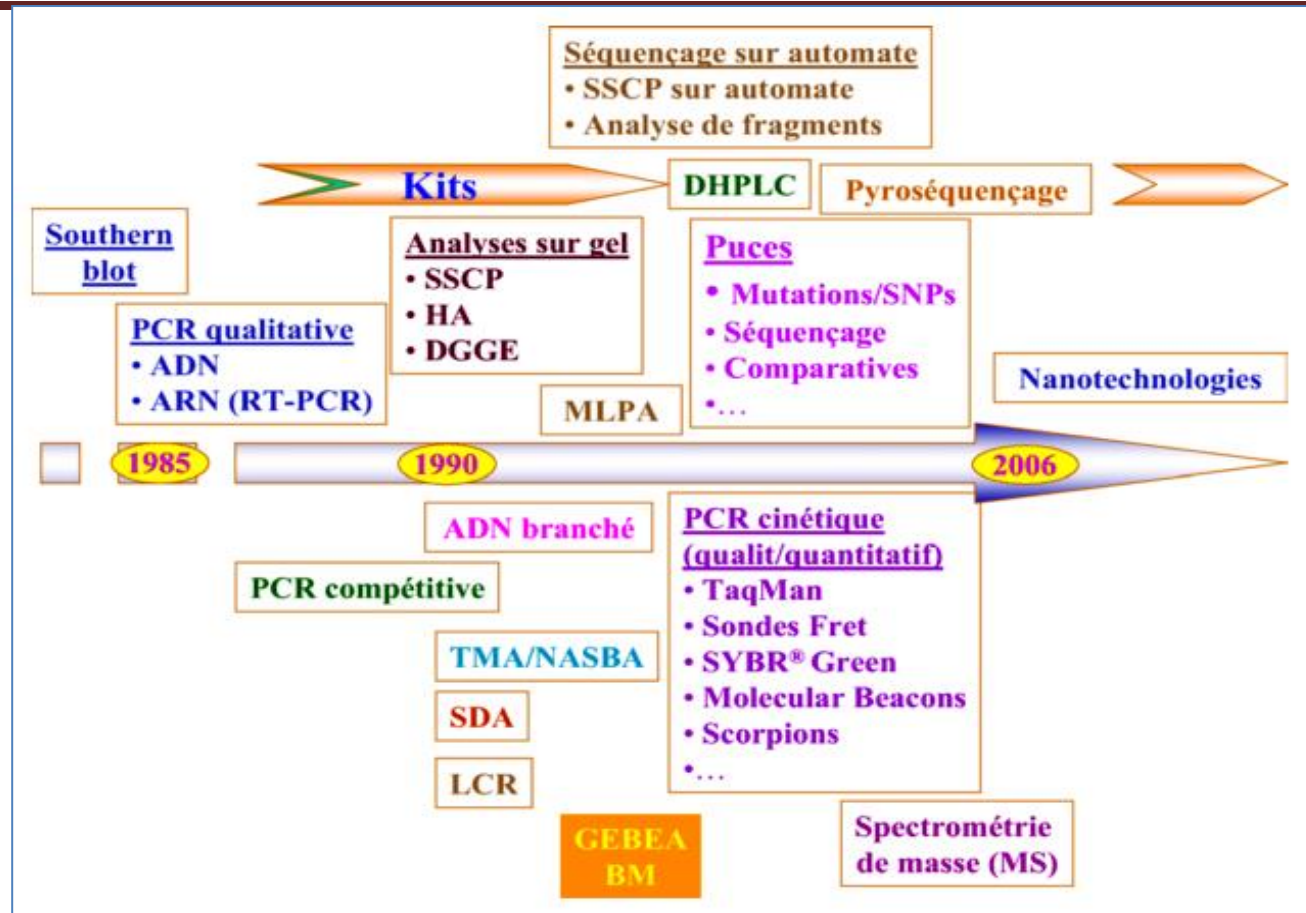


Figure1: Évolution des techniques de biologie moléculaire depuis la PCR (Lamoril et al., 2007) De puis l'apparition de la technique d'amplification PCR en 1985, plusieurs techniques sont évoluent comme l'analyse sur le gel par des différentes techniques (SSCP, DGGE...), les variantes de PCR plus des différentes méthodes de séquençage, on est arrivés jusqu'à l'apparition du séquençage d'une nouvelle génération (séquençage au débit) la technique la plus récente et la plus fiable.

Chaque cycle contient trois étapes :

- La dénaturation thermique de l'ADN: à 95°C, les liaisons d'hydrogènes sont rompues et les 2 brins de l'ADN se séparent. L'ADN passe sous forme simple brin dans le milieu.
- Hybridation des amorces: le milieu réactionnel contient 2 amorces, chacune complémentaire d'un des 2 brins. La température permettant la fixation des amorces sur les monobrins d'ADN est comprise entre 50°C et 65°C. Les amorces en larges excès, s'hybrident dès lors qu'elles rencontrent les séquences complémentaires.
- Extension des amorces: intervention de la Taq polymérase (ADN polymérase) qui allonge les amorces en y incorporant les désoxyribonucléiques complémentaires de la séquence de la matrice auquel elle est hybridée. Cette étape s'effectue à une température de 72°C (Somma *et al.*, 2006).

Le principe de la PCR est représenté dans la (figure 2).

### **2.3.2 Les variantes de la PCR :**

#### ***PCR point final :***

Dans le cas d'une PCR point final, après amplification, on effectue une migration par électrophorèse sur un gel d'agarose contenant du bromure d'éthidium. Ce dernier deviendra fluorescent en présence de nucléotides sous lumière UV et permettra de visualiser les différents fragments ayant migré. On obtient une lecture qualitative: il y a ou non présence du fragment de la longueur attendue. Une lecture semi-quantitative peut être effectuée par comparaison des intensités des signaux visualisés. En PCR point final on observe les résultats seulement à la fin de la totalité des cycles (Rampaud, 2009).

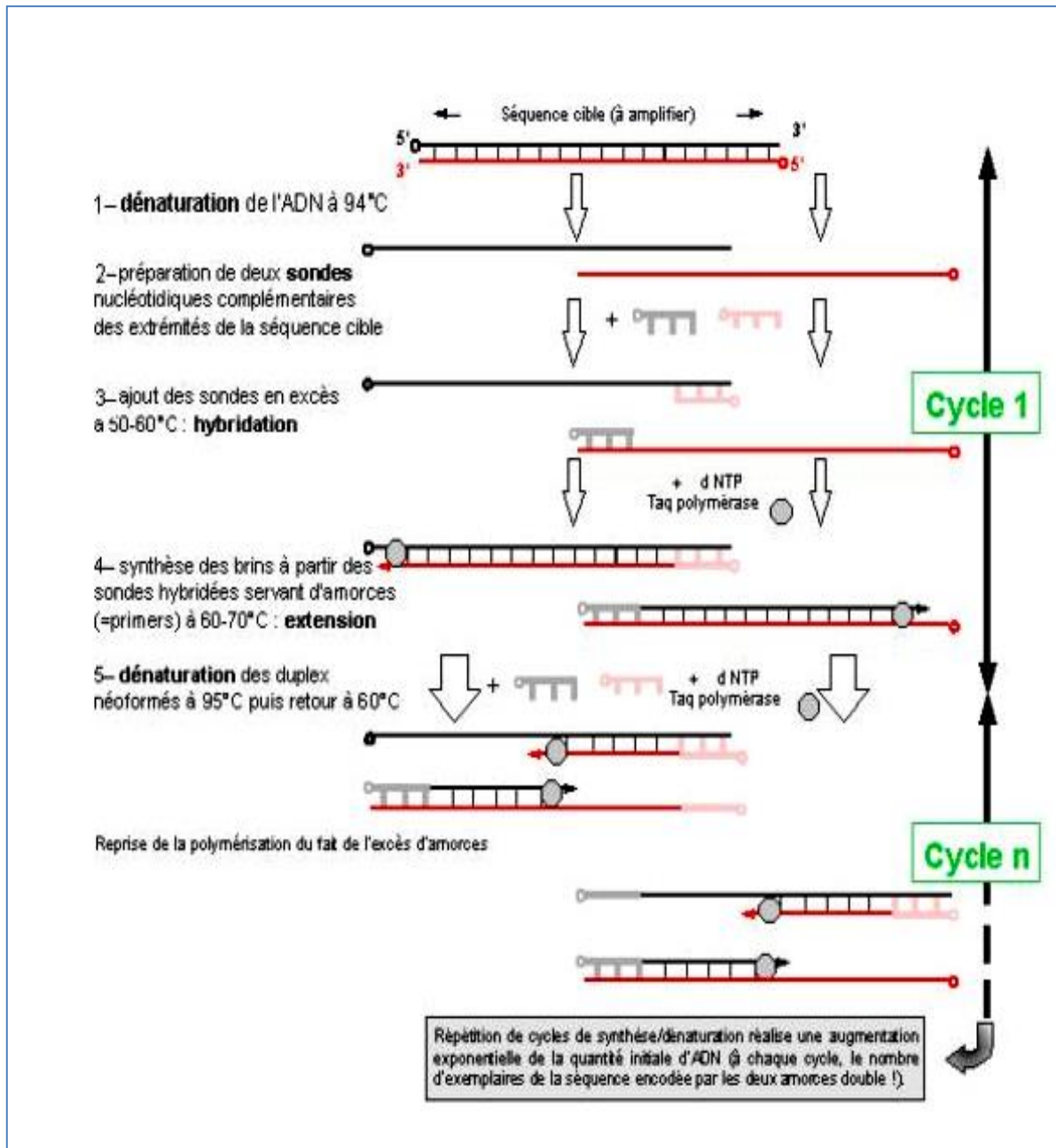


Figure 2 : Schéma de principe de la technique de PCR (Tella, 2013)

***PCR en temps réel :***

La technique de PCR en temps réel est directement inspirée de la PCR classique. Les cycles de PCR successifs induisent une augmentation exponentielle du produit d'amplification, et par conséquent de la fluorescence émise. Pour la détection des amplicons, cette PCR utilise soit l'agent intercalant SYBR®Green, soit elle fait appel à des amorces spécifiques du gène à amplifier associées à un système de sondes fluorescentes qui se fixent spécifiquement sur le brin amplifié. Le temps de détection du signal est directement proportionnel à la quantité d'ADN cible présente dans le mélange réactionnel. Durant les premiers cycles, la fluorescence reste à son niveau de base. Le " Threshold cycle" (Ct) correspond au cycle à partir duquel la courbe de fluorescence croise la droite correspondant au seuil de détection. Il est inversement proportionnel à la quantité d'ADN cible présente dans l'échantillon biologique avant la réaction. Dès lors, un Ct précoce correspond à une réaction très positive et une concentration initiale d'ADN élevée, un Ct tardif reflète une quantité d'ADN moindre, en fin un Ct égal au nombre de cycles réalisés correspond à une réaction négative, dans ce cas la fluorescence mesurée au cours de la réaction ne dépasse pas le seuil de détection. Cette possibilité de quantification est à la base des techniques développées en virologie qui permettent la détermination des charges virales (Tella, 2013).

L'évolution de cette amplification peut être représentée par une courbe dont l'allure est celle d'une sigmoïde. Cette courbe peut être divisée en trois phases (Figure 3)

- Phase d'initiation : La quantité de fragment amplifié est insuffisante pour générer un signal fluorescent supérieur au bruit de fond (et donc la fluorescence générée).
- Phase exponentielle : La quantité de fragment amplifié génère un signal fluorescent supérieur au seuil de détection de l'appareil, puis le nombre de produits amplifiés double à chaque cycle. En coordonnées logarithmiques, cette phase est représentée par une droite.
- Phase de plateau (ou de saturation) : certains composants de la réaction (et en particulier le nombre de molécules de Taq disponibles) deviennent limitants. Le système ne permet plus une amplification exponentielle. La droite standard va représenter les valeurs de Ct obtenues expérimentalement en fonction du logarithme des concentrations en molécules cibles fixées, issues de séries de dilutions d'un échantillon standard. La valeur de Ct est inversement proportionnelle au logarithme base 10 de la concentration initiale en molécules cibles. Le Ct obtenu à partir d'un

échantillon de concentration inconnue va ainsi être traduit en concentration en molécules cibles grâce à la droite standard (Tellaa, 2013).

**RT-PCR :**

La PCR repose sur des cycles successifs de réplication d'une séquence spécifique d'ADN matrice par une ADN polymérase. Les ADN polymérases thermostables utilisées pour la PCR sont ADN dépendantes. Lorsqu'on recherche à amplifier des ARN messagers, il est impératif d'introduire une étape préalable de transcription inverse (reverse transcription ou RT). On parle alors de la RT-PCR. L'étape de RT consiste à synthétiser le brin complémentaire (ADN) des ARN à partir d'une amorce oligonucléotidique, grâce à une enzyme à activité ADN polymérase ARN dépendante, la transcriptase inverse (reverse transcriptase ou RTase) (Tellaa, 2013).

**PCR–Elisa**

Le produit amplifié est marqué au cours de la PCR grâce à une des deux amorces marquées (par exemple, par un résidu de digoxigénine). Après fixation en microplaque à l'aide d'une sonde capture, la révélation est effectuée à l'aide d'un anticorps spécifique (par exemple, antidigoxigénine) (Lamoril et *al.*, 2007).

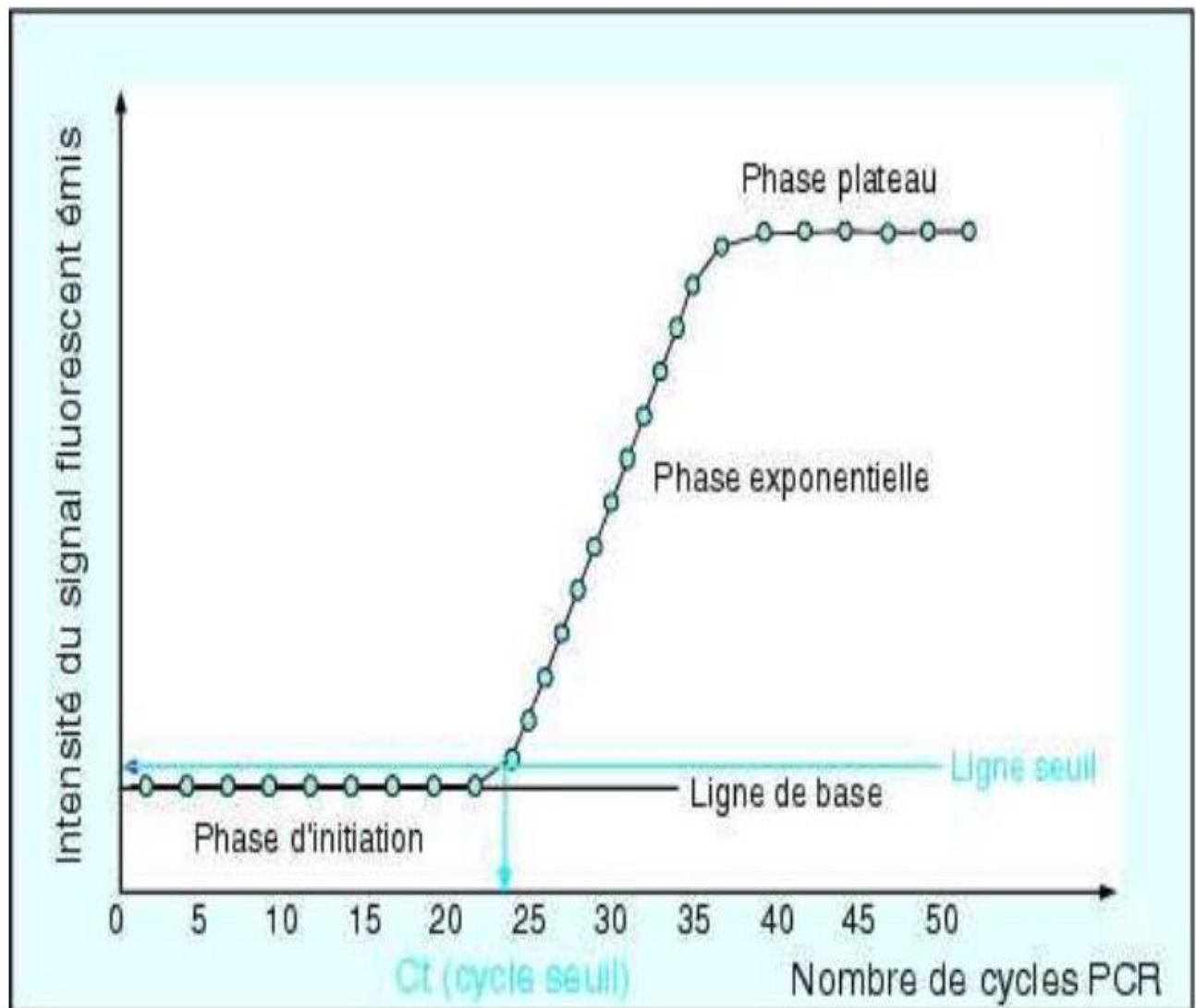


Figure3 : Le suivi en temps réel d'une réaction PCR (Tellaa, 2013)

**PCR nichée (ou nested PCR) :**

Pour obtenir une plus grande sensibilité lors de la PCR, il est possible d'effectuer deux PCR successives. La « nested PCR » une meilleure spécificité: le produit issu de la première PCR est de nouveau amplifié au cours d'une deuxième PCR. Dans cette technique, deux couples d'amorces différents sont successivement utilisés:

- un couple d'amorces externes : Ce couple d'amorces permet tout d'abord d'obtenir un premier fragment d'ADN amplifié, selon une PCR classique. Les fragments d'ADN obtenus servent alors de matrice pour une seconde PCR.
- un couple d'amorces internes : Ce couple d'amorces délimite borne une région située à l'intérieur (ou nichée) du fragment nucléotidique obtenu avec le 1er couple d'amorces, et donnera des fragments de taille inférieure à ceux obtenus avec la 1ère. Cette méthode est très sensible : après une première PCR de 30 cycles, on obtient théoriquement  $2^{30}$  cibles amplifiées (pour un rendement de 100%). La deuxième PCR de 30 cycles permettra d'obtenir  $[2^{30}]^{30}$  soit  $[2^{60}]$  cibles en théorie. Deux couples d'amorces étant utilisés, la spécificité de la réaction est accrue.

Cependant, les résultats de cette PCR sont à interpréter avec prudence dans la mesure où cette méthode associe deux PCR classiques successives et permet certes d'augmenter la sensibilité et la spécificité; cependant elle est difficilement utilisable pour un usage de routine sur des grandes séries car elle nécessite beaucoup de temps de manipulation. Cette technique reste très exposée aux risques de contaminations (du fait des deux PCR successives) (Tellaa, 2013).

**2.4 Détermination des séquences nucléiques et protéiques****Marquage des sondes**

Le marquage est l'étape qui permet d'introduire des fluorochromes dans un fragment d'ADN. Au début des années 80, on utilisait des nucléotides, le plus souvent le dUTP, couplé aux haptènes que sont la digoxigénine et la biotine. Les sondes étaient alors révélées grâce à des anticorps antidigoxigénine ou de la streptavidine (substance se fixant spécifiquement sur la biotine) couplés à des fluorochromes. Aujourd'hui, les fluorochromes sont directement fixés sur les nucléotides. Différents procédés sont utilisés pour incorporer un fluorochrome dans un fragment d'ADN. Les plus connues sont le Random-priming et la Nick-translation (Romana et Malan, 2010).

**L'hybridation moléculaire**

Il s'agit de la propriété que présente une molécule d'ADN monobrin de s'associer spontanément, de façon spécifique et réversible à une autre molécule monobrin si celle-ci lui est complémentaire. L'hybridation moléculaire est permise par les liaisons hydrogènes (liaisons faibles) que peuvent établir les bases puriques et pyrimidiques constituant l'ADN. Quand on chauffe un ADN bicaténaire à une température supérieure à la température de fusion ( $T_m$ ), les deux brins de la molécule se séparent suite à la rupture des liaisons hydrogènes qui les maintenaient appariés. Une ré-association des deux brins peut s'observer dans des conditions expérimentales bien définies (température, concentration en sels, pH). La longueur des fragments et la complexité des séquences sont des facteurs qui influencent aussi le temps nécessaire à la réaction (Maurel, 2008).

La propriété des chaînes d'ADN (ou d'ARN) de s'apparier avec leur réplique complémentaire fournit un moyen de détection très spécifique. Il suffit de disposer d'une copie fidèle et pure d'un segment d'ADN, pour pouvoir repérer toute séquence complémentaire dans une préparation d'ADN (par exemple l'ADN génomique extrait de cellules d'un organisme donné). Cette copie pure et que l'on peut marquer (par exemple par du phosphore radioactif) porte le nom de sonde : - elle ne peut s'hybrider qu'avec le segment dont elle est complémentaire (spécificité de l'hybridation), - puisque c'est une molécule marquée, elle est facile à repérer et à quantifier (sensibilité de la réaction) (Maurel, 2008).

**Southern Blot**

Le Southern blot est une technique mise au point pour rechercher des fragments de DNA sur une électrophorèse en les hybridant avec une sonde complémentaire. Après avoir digéré le DNA par une enzyme de restriction, on obtient un mélange de très nombreux fragments de restriction. On soumet ces fragments à une électrophorèse pour les faire migrer dans un gel de haut en bas en fonction inverse de leur taille. On fait un montage pour faire passer les fragments grâce à une montée de tampon imprégnant le gel puis une membrane de nylon où le DNA va se fixer par des liaisons stables. La membrane de nylon avec le DNA fixé est alors mise à incuber dans un sac contenant une solution d'une sonde radioactive complémentaire du fragment de DNA qu'on recherche, à une température assez basse pour que l'hybride se forme mais assez élevée pour que cet hybride soit parfaitement complémentaire. On lave la membrane des molécules de la sonde qui ne sont pas fixées à leur DNA complémentaire, puis on la met en présence d'un film radiographique vierge dans une enceinte opaque pour que la

sonde radioactive fixée sur les fragments de DNA complémentaires impressionne le film. On révèle le film où des taches noires (sur le négatif) correspondent aux emplacements où ont migré les fragments d'ADN complémentaires de la sonde. On compare les distances de migration avec des fragments de DNA radioactifs de tailles connues qui servent (Raisonnier, 2006).

### **Northern Blot**

Une technique qui permet de détecter la présence d'ARN messagers (ARNm) spécifiques mais également des ARN non codants comme les petits ARN et les ARN ribosomiaux à l'aide de sondes marquées. Les ARN messagers d'un échantillon sont séparés par électrophorèse. La mise en présence du résultat de l'électrophorèse avec une sonde radioactive d'ADN complémentaire (ADNc) de l'ARNm recherché entraîne la détection ou non d'un ARN. La présence de l'ARN est révélée par autoradiographie. Cette technique permet de mesurer l'expression relative d'au plus 20 gènes à la fois (Carpentier, 2006).

### **Western Blot**

Western Blot est une technique d'analyse développée à l'origine dans les années 1970 pour déterminer la présence ou l'absence d'une protéine d'intérêt dans un échantillon biologique complexe, comme un homogénat de tissu communément.

L'immunoblot des protéines est basée sur une réaction anticorps-antigène. La méthode consiste en cinq étapes distinctes: 1) la séparation électrophorétique des protéines par leur point isoélectrique; 2) le transfert à une nitrocellulose ou polyfluorure de vinylidène (PVDF); 3) le marquage en utilisant un anticorps primaire spécifique à la protéine d'intérêt; 4) incubation avec un anticorps secondaire dirigé contre l'anticorps primaire; et 5) la visualisation (Eaton et *al.*, 2014).

### **Le séquençage**

Le séquençage est la procédure qui permet de déterminer la séquence nucléotidique d'un acide nucléique (principalement l'ADN) afin d'obtenir l'information génétique qu'il supporte.

Étant donné l'unicité et la spécificité de la structure de l'ADN chez chaque individu, la séquence de l'ADN permet de nombreuses applications dans le domaine de la médecine, comme, par exemple, le diagnostic, les études génétiques, l'étude de paternité, la

criminologie, la compréhension de mécanismes physiopathologiques, la synthèse de médicaments, les enquêtes épidémiologiques (Lamoril et *al.*, 2008).

Techniquement, le séquençage nécessite l'amplification préalable de la région à séquencer. Ensuite, la région amplifiée subit la réaction de séquençage proprement dite. En général, le fragment sert de matrice à une synthèse d'ADN complémentaire, arrêtée au hasard par incorporation de didésoxyribonucléotides (ddNTP) marqués (Figure 4). L'analyse de la taille et du marquage des fragments avortés permet la détermination de la séquence nucléotidique. Après vérification, cette séquence est en général comparée à des séquences de références, d'une part pour réaliser une identification ou l'étude d'une filiation génétique, et d'autre part pour mettre en évidence des mutations d'intérêt diagnostique ou thérapeutique (Mackiewicz, 2007).

Les techniques de séquençage évoluent et leurs applications s'élargissent (Tableau I). Par ailleurs, le séquençage a pu «se démocratiser» dans de nombreux laboratoires, en partie depuis la description de la polymérase chain reaction (PCR) en 1985, suivie de sa diffusion très large dans les laboratoires de biologie moléculaire. Depuis 2000, outre la PCR que nous ne décrivons pas, de nouvelles techniques de séquençage se sont développées (Lamoril et *al.*, 2008).

Tableau I : Quelques applications du séquençage (Lamoril et *al.*, 2008).

Quelques applications du séquençage
Diagnostic et traitement de nombreuses maladies humaines (exemples: cancers, maladies infectieuses, maladies héréditaires...)
Informations sur le génome (structure, fonction, évolution) et étude des variations du génome (polymorphismes bialléliques, insertions, délétions, insertions/délétions (appelées aussi indéls), réarrangement de gènes, variation du nombre de copies de gènes, duplication (ou plus)
Variantes génétiques associés à une pathologie (par exemple, le diabète)
Analyse de méthylation du génome (études épigénétiques et méthylome)
Analyse microbiologique (identification d'espèces, taxonomie, études épidémiologiques, génotypage à but pronostique et/ou thérapeutique)
Tests de paternité et médecine légale
Police scientifique
Pharmacogénétique
Études anthropologiques

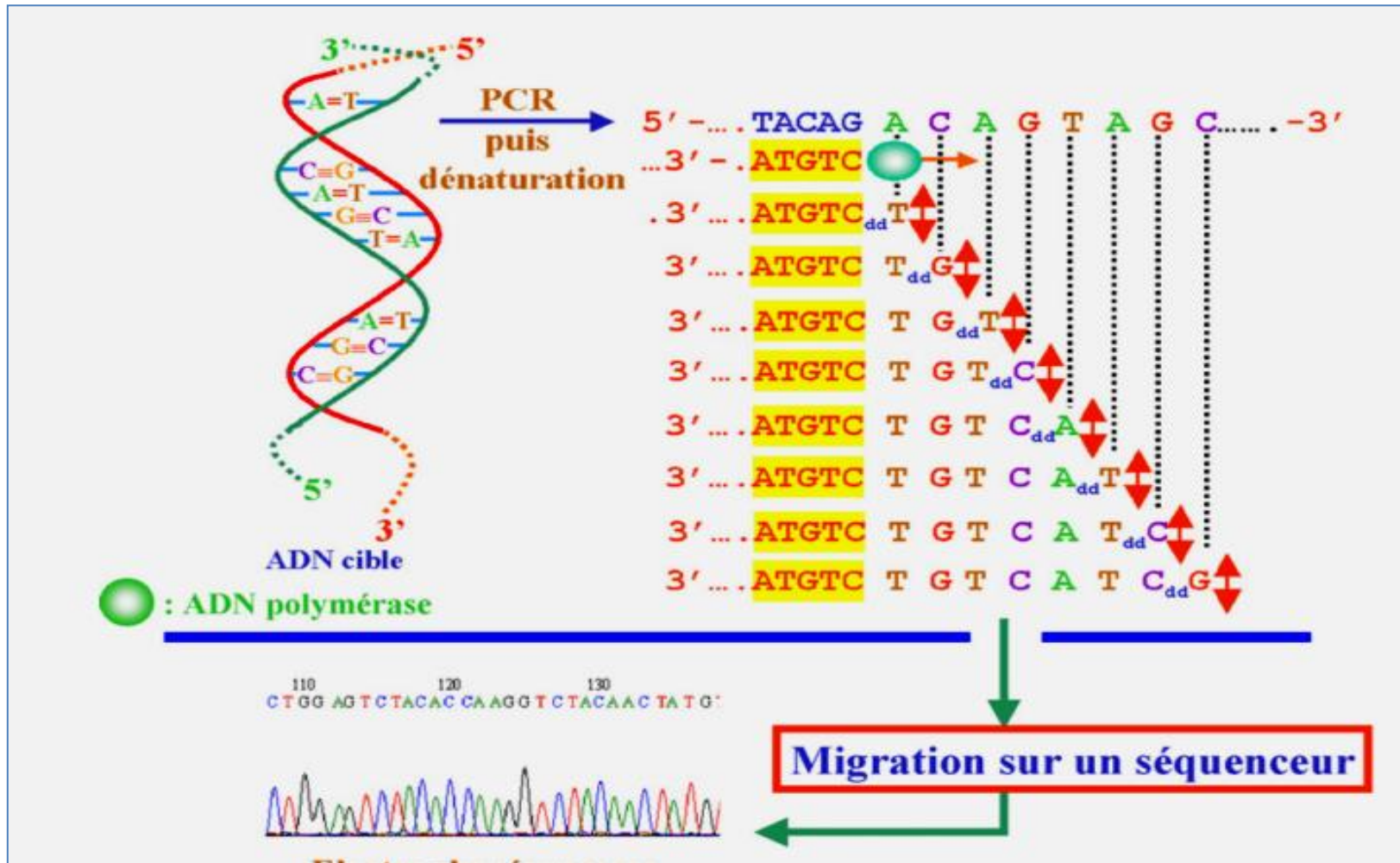


Figure4: Principes du séquençage selon la méthode de Sanger (Lamoril et al., 2008)

### *Séquençage par la méthode de Sanger*

Le recopiage d'un brin matrice par une ADN polymérase ADN dépendante est initiée par la fixation d'un oligonucléotide spécifique (amorce), complémentaire du brin matrice. Cette ADN polymérase va permettre l'élongation d'un nouveau brin complémentaire du brin matrice dans le sens 5'--3' (Figure 4).

L'ADN polymérase permet l'incorporation de nucléotides (dNTP: déoxynucléotides) libres présents dans le milieu réactionnel par la formation d'un pont phosphodiester entre le 3'-OH de la chaîne et le 5'-phosphate du dNTP suivant. La réaction de Sanger repose sur l'incorporation alléatoire par cette ADN polymérase de didéoxynucléotides interrupteurs de chaîne (ddNTP) eux aussi présents dans le milieu réactionnel.

Ces ddNTP diffèrent des dNTP par leur extrémité 3'. L'extrémité 3'OH des dNTP est remplacée par une extrémité 3'H. Cette modification empêche la formation de la liaison phosphodiester entre le ddNTP incorporé dans la chaîne et le nucléotide suivant. L'allongement de la chaîne est alors interrompu.

Dans le milieu réactionnel il y a compétition entre les dNTP et les ddNTP. Le rapport spécifique ddNTP/dNTP et l'affinité de la taq pour chaque nucléotide sont optimisés de telle façon qu'un ddNTP soit statistiquement incorporé à toutes les positions possibles.

Une migration électrophorétique du produit de cette réaction de séquence sur un gel très résolutif (polyacrylamide) va séparer tous les fragments présents en fonction de leur masse moléculaire (taille). Les plus petits fragments vont migrer plus rapidement que les grands. La grande résolution de ce gel permet de distinguer des fragments différents entre eux d'une paire de base. L'identification du ddNTP présent à l'extrémité 3' de chaque fragment déterminera la séquence nucléotidique du brin matrice initial (Mauger, 2012).

## **2.5 Construction des banques**

### *Construction d'une banque d'ADN génomique*

L'obtention d'une banque génomique est nécessaire lorsqu'on veut par exemple caractériser une séquence génomique particulière, établir la carte physique d'un génome ou séquencer à grande échelle des portions ou la totalité d'un génome...

Une banque d'ADN génomique est un ensemble de vecteurs recombinants contenant chacun un morceau différent du génome de l'espèce étudiée. Le principe consiste à (i) isoler l'ADN

génomique de l'espèce d'intérêt, (ii) digérer cet ADN par une enzyme de restriction permettant de libérer des fragments de restriction de taille compatible avec le vecteur choisi, (iii) cloner ces fragments dans un vecteur de clonage, (iv) intégrer ces vecteurs recombinants dans un clonage d'une séquence génomique particulière alors que les cosmides et les YACs et les BACs seront choisis dans un but de caractérisation d'un génome. La banque obtenue est ainsi constituée de millions de clones recombinants (Tagu et Moussard, 2003).

### ***Construction d'une banque d'ADNc***

La construction d'une banque d'ADNc nécessite de nombreuses étapes. Le principe repose sur : (i) l'extraction d'ARN et parfois la purification des ARNm polyadénylés de l'organe (par exemple par chromatographie d'affinité sur une colonne de polyT), (ii) la copie de ces ARNm en ADN complémentaires par l'action d'une transcriptase inverse ; (iii) l'élimination spécifique des ARNm par l'ARNase H ou la soude, (iv) la synthèse du second brin d'ADN par une ADN polymérase, (v) la ligature d'oligonucléotide (adaptateur) pour créer des sites de restriction, (vi) la ligature dans un vecteur de clonage (plasmide ou phage), (vii) l'intégration des vecteurs recombinants dans une bactérie. Les vecteurs de clonage utilisés par la construction des banques d'ADNc sont soit les plasmides, soit les phages. Les étapes de synthèse de second brin d'ADN et de ligature d'adaptateur sont de plus en plus souvent réalisées à l'aide de la PCR (Tagu et Moussard, 2003).

## **4. Biologie moléculaire dans l'étude des agents infectieux**

### **3.1 Etude des agents infectieux**

#### ***Bordetella pertussis***

##### **Description :**

La coqueluche est une toxi-infection bactérienne due à *Bordetella pertussis* ou bacille de Bordet (accessoirement *Bordetella parapertussis*), bacille Gram négatif qui touche l'homme, du nouveau-né à l'adulte. Cette infection respiratoire contagieuse est transmise par voie aérienne à partir du réservoir humain. Elle atteint 60 millions de personnes et provoque 400000 décès par an dans le monde, en particulier dans les pays en voie de développement. Dans les pays où la vaccination est généralisée, l'incidence est faible (0,1 à 3 %) et la mortalité très réduite, mais non nulle. L'immunité vaccinale est excellente mais ne dépasse

pas une dizaine d'années. Ainsi, l'éradication de la maladie est probablement illusoire, la vaccination visant à contrôler la maladie, avec une incidence acceptable (Grimprel, 2006).

**Diagnostic :**

La culture nécessite une incubation de 3 à 7 jours. La sensibilité de cette méthode est d'environ 50% au début de la maladie et elle diminue rapidement avec le temps. Actuellement elle est remplacée par la technique d'amplification génique (PCR), dont la sensibilité est nettement supérieure avec une excellente spécificité. Cet examen se fait sur les aspirations, sur les expectorations ou sur frottis nasopharyngés (écouvillons secs).

Seule la toxine pertussique (PT) est spécifique de *B. pertussis*.

La sérologie est également disponible avec des méthodes quantitatives (immunofluorescence ou ELISA) à la recherche d'IgG, d'IgM et d'IgA spécifiques. Un sérum précoce (gardé en réserve) suivi d'un 2ème dans la phase paroxysmique permet d'établir le diagnostic par une augmentation significative des taux d'IgG et présence d'IgA ou d'IgM. Des taux élevés d'IgG, accompagnés d'IgA ou d'IgM anti- *B. pertussis* sont indicateurs d'une infection active. La sérologie peut se révéler utile en cas de PCR non conclusive (Tissières et *al.*, 2009).

PCR et/ou culture chez les nouveau-nés et jeunes enfants, association PCR et IgG anti-PT entre 2 et 3 semaines de toux.

*Bordetella pertussis*, ainsi que les espèces apparentées est détectée par PCR sur les échantillons nasopharyngés, de même que les espèces apparentées.

Seulement *B. pertussis* est prise en considération dans le cadre de la définition européenne de la coqueluche (ECDC). L'infection par *B. parapertussis* qui peut aussi causer une forme moins grave de la maladie, est également enregistrée par l'ISP, mais ne rentre pas dans la définition de l'ECDC.

Des PCR pour IS481, IS1001, IS1002 et *recA* sont utilisées pour démontrer la présence de *Bordetella pertussis* et des autres espèces de *Bordetella* spp.

La PCR pour IS481 est très sensible pour la recherche de *B. pertussis*, mais pas tout à fait spécifique de l'espèce ; de 50 à 100 copies de cette séquence d'insertion sont présentes dans le génome de *B. pertussis*, mais aussi 8 à 10 copies chez *B. holmesii* et un petit nombre chez certaines souches de *B. bronchiseptica*. Le même problème existe pour la détection de *B.*

parapertussis par l'IS1001, dont une vingtaine de copies sont présentes dans cette espèce, mais aussi 1 à 7 copies chez certaines souches de *B. bronchiseptica*.

La PCR pour le gène *recA* est spécifique de *B. holmesii* et signera une réaction croisée avec cette espèce qui peut également coloniser les voies aériennes supérieures. La PCR pour IS1002 confirme la présence de *B. pertussis* ou *B. parapertussis*, mais n'est pas non plus tout à fait spécifique de ces espèces, puisqu'elle peut aussi être présente chez certaines souches de *B. bronchiseptica*. Ces deux dernières réactions sont clairement moins sensibles.

En fonction des résultats de ces quatre réactions, la présence de *B. pertussis* ou *B. parapertussis* pourra être confirmée avec un haut degré de certitude ou il sera seulement possible d'affirmer la présence d'une *Bordetella* sp. et mentionner quelle espèce est la plus probablement présente.

Finalement, quand une réaction positive n'est pas reproductible, nous rapportons que la réaction donne un résultat indéterminé car il n'est pas possible de distinguer la présence d'une concentration faible d'une *Bordetella* sp., d'une contamination ou d'une réaction aspécifique.

Seulement les échantillons positifs en PCR sont cultivés sur un milieu spécifique. La sensibilité de la culture est faible (< 50 %) et un résultat négatif ne contribue pas au diagnostic (Muyldermans, 2014).

#### **Traitement :**

Le vaccin contre la coqueluche doit être administré à l'âge de 2 mois, à l'âge 3 mois et à l'âge de 4 mois et les rappels pratiqués vers l'âge de 18 mois et entre 11 et 13 ans.

En cas de coqueluche, les antibiotiques modifient très peu l'évolution de la coqueluche sauf s'ils sont donnés durant la phase catarrhale. Le traitement par antibiotique est utile pour la prévention d'une transmission de l'infection. Un traitement doit être envisagé en cas de diagnostic de coqueluche confirmé chez un patient dont les symptômes ne sont pas présents depuis plus de 3 à 4 semaines. Après un traitement de 5 jours le *B. pertussis* est, dans la majorité des cas, éliminé des voies respiratoires du patient. Les nourrissons de moins de 3 mois atteints de coqueluche doivent être hospitalisés pour surveillance (Schoun, 2011).

**Les Entérovirus****Description :**

Les virus sont généralement divisés en ceux qui utilisent l'ADN (acide désoxyribonucléique) ou d'ARN comme matériel génétique; tous les entérovirus sont des virus à ARN. Ils se trouvent dans le monde entier, mais l'infection est plus fréquente dans les zones de mauvaise hygiène et la surpopulation.

La maladie à entérovirus est plus fréquente chez les très jeunes. Bien qu'il existe près de 70 souches différentes d'entérovirus, plus de 70% des infections sont causées par seulement 10 types.

La période d'incubation pour la plupart entérovirus varie de deux à 14 jours. Dans les zones de climat tempéré, les infections se produisent principalement dans l'été et l'automne.

Il y a quatre groupes de entérovirus: Coxsackie, échovirus, dissociées entérovirus, et Y Poliovirus.

Le virus est le plus souvent transmis par la voie fécale-orale (contamination des doigts ou des objets par des déchets humains); dans certains cas, la transmission se fait par la nourriture ou l'eau contaminée. Passage de certaines souches du virus par voie de gouttelettes d'air peut conduire à des maladies respiratoires. Infection des fœtus par l'intermédiaire du placenta a également été documentée. Le lait maternel contient des anticorps qui peuvent protéger les nouveau-nés (Tucker, 2003).

**Pouvoir pathogène :**

- Infections inapparentes
- Méningites lymphocytaires à liquide clair, encéphalites, Guillain Barré, poliomyélite (exceptionnelle)
- Infections respiratoires
- Infections néonatales (sévères)
- Autres : herpangine, péricardites, myocardites, conjonctivites...

**Diagnostic :**

PCR pour le diagnostic des infections à entérovirus exige beaucoup de ressources, mais est de plus en plus utilisé en raison de la grande disponibilité. Enzyme-linked immuno-essais

(ELISA) qui permettent de détecter les anticorps contre l'entérovirus hétérotypique immunoglobuline M (IgM), IgA et IgG ont été comparés à une transcription inverse-PCR en utilisant des amorces spécifiques des régions non traduites en 5' des 60 espèces d'entérovirus. Les tests ELISA ont été moins sensibles que la PCR, et que le test ELISA pour les IgM était hautement spécifique. Lorsque le diagnostic rétrospectif est important ou lorsque les spécimens ne sont pas adaptés pour la PCR, le test ELISA a un rôle limité si PCR ne sont pas disponibles (Craig *et al.*, 2003).

La technique la plus répandue et la plus utilisée actuellement en France est la RT-PCR en temps réel. Elle est basée sur l'amplification d'une région conservée à l'extrémité 5' non codante du virus, avec une hybridation spécifique des produits d'amplification par hybridation moléculaire permettant de rendre un résultat qualitatif (positif ou négatif) ou un résultat quantitatif lorsqu'une gamme de plasmide standardisée est utilisée. Cette technique permet la détection des principaux sérotypes d'entérovirus humain actuellement répertoriés (68/110 sérotypes). Ainsi, dans la suite de ce rapport sera utiliser le terme « PCR EV » pour signifier un le test de détection du gé- nome de entérovirus par amplification génique (HAS, 2014).

#### **Traitement :**

Moins d'une personne infectée par un entérovirus sur 1 000 contracte une méningite. Les symptômes sont d'intensité très variable. Ils peuvent être très bénins et consister en une fièvre et un mal de tête. Ces présentations ont peu de chances d'être observées par un médecin et d'être diagnostiquées. Dans les cas graves, les symptômes comprennent des éruptions cutanées, une raideur de la nuque, un mal de gorge, des nausées et des vomissements. Ils peuvent également consister en douleurs abdominales ou musculaires et articulaires, sourdes ou vives. La méningite virale provoque parfois une confusion et une altération de la conscience. Les personnes qui présentent des symptômes graves doivent consulter un médecin (Segondy, 2007).

Dès l'annonce de la maladie, les personnes qui ont été en contact proche avec le malade reçoivent un traitement préventif qui repose sur la prise d'antibiotiques : rifampicine pendant deux jours ou spiramycine pendant cinq jours en cas de contre-indication à la rifampicine. Dans certains cas (méningocoque du groupe A ou C), une vaccination des sujets ayant eu des contacts fréquents avec le malade peut être proposée (Segondy, 2007).

**Les *Herpèsviridae*****Description :**

La famille des Herpesviridae comporte une centaine d'espèces virales dont 8 sont responsables d'infections strictement humaines : HSV-1 et -2, VZV, CMV, HHV6, EBV, HHV7 et HHV8.

Ce sont des virus enveloppés à capsidie icosaédrique dont le génome est constitué d'ADN comportant plusieurs dizaines de gènes. L'expression des gènes viraux est régulée en 3 « cascades » produisant les protéines très précoces (Immediate Early), puis les protéines précoces (Early) destinées à la réplication du génome viral (ADN polymérase virale) et enfin les protéines tardives (Late) comprenant la plupart des protéines structurales. L'enveloppe virale est formée par bourgeonnement de la membrane nucléaire et/ou de la membrane d'une vésicule intracytoplasmique avec insertion de glycoprotéines virales. Ce sont des virus fragiles, rapidement inactivés dans le milieu extérieur et dans le tube digestif. Les Herpesvirus sont transmis par contacts interhumains intimes, oraux ou sexuels, à l'exception du VZV qui a également une transmission aérienne. A la suite de la primo-infection ces virus établissent une infection latente à vie dans l'organisme.

L'ADN du virus ne se réplique pas, persiste dans le noyau cellulaire sous forme d'épisome, n'exprime que les quelques gènes de latence, réduisant les autres au silence. La latence permet au virus de se camoufler et d'échapper au système immunitaire ainsi qu'aux antiviraux, inhibiteurs de la réplication. L'éradication de l'infection latente est impossible. (Willey et *al.*, 2008).

**Diagnostic :** (Mazeron, 2014)

**CMV**

Diagnostic sérologique = diagnostic indirect

On met en évidence des anticorps de type IgG et IgM et on mesure leur avidité.

L'avidité des anticorps de type IgG permet d'évaluer la date de survenue de la primo-infection

(important chez la femme enceinte++).

Les anticorps de type IgG synthétisés au cours de la primo-infection ont une faible affinité pour l'Ag viral mais l'affinité va augmenter au cours du temps.

On mesure l'affinité Ag-Ac : plus elle est faible moins l'avidité est forte : plus la primo-infection a eu lieu récemment.

Diagnostic direct

On met en évidence le virus ou ses structures :

Dans le sang : détection et quantification du virus dans le sang circulant (virémie)

Type de prélèvement : prise de sang

Mise en évidence d'antigènes viraux dans les polynucléaires du sang périphérique : antigénémie pp65 (phosphoprotéine de 65KDa)

L'antigène viral pp65 a un fort tropisme pour le noyau des cellules.

Détection de l'ADN viral par PCR en temps réel (++)

On réalise une détection qualitative ou quantitative de l'ADN viral.

On atteint une très grande sensibilité et on diminue le risque de faux positifs par contamination.

Les résultats sont exprimés en nombre de copies de génome / ml de :

- sang total

- plasma

-  $10^6$  cellules dans un tissu (quantification en parallèle d'un gène cellulaire).

### ***EBV***

#### **Diagnostic sérologique: diagnostic indirect**

*Recherche d'anticorps hétérophiles :*

Ce sont des anticorps de type IgM apparaissant vers le 8ème jour de la MNI et persistant quelques semaines à quelques mois.

Ils reconnaissent des antigènes présents sur des hématies chez l'homme et chez différentes espèces animales (mouton, cheval, bœuf...): anticorps hétérophiles

On détecte ces anticorps par des techniques rapides d'agglutination sur lame (MNI test, mono spot..) ou par immunocartographie (MNItop).

Cette méthode diagnostic est peu utilisée pour le diagnostic de la MNI chez l'enfant (anticorps souvent absents).

*Recherche d'anticorps spécifiques :*

Anticorps dirigés contre 3 classes d'antigènes viraux :

- VCA : viral capsid antigen
- EA : early antigen protéines du cycle viral
- EBNA : epstein-barr nuclear antigen, protéines exprimés lors de la latence

On détecte ces anticorps par immunofluorescence indirecte (utilisation de lignées cellulaires exprimant selon les cas les différentes classes d'antigènes : EBNA, EVA, EA) ou par la technique

ELISA (utilisation d'extraits cellulaires, de peptides de synthèse...)

### **Diagnostic direct**

Il peut se faire par :

- PCR qualitative mais surtout quantitative (PCR en temps réel)
- Immunohistochimie

Recherche d'antigènes spécifiques sur des cellules ou des tissus à l'aide d'anticorps monoclonaux.

Recherche des ARN transcrits EBER : ARN produits en quantité importante dans les cellules infectées.

### **Diagnostic de la mononucléose infectieuse**

On réalise un hémogramme, on observe :

Une leucocytose

Une hyperlymphocytose

Des lymphocytes atypiques

On réalise un diagnostic sérologique :

Non spécifique : recherche d'anticorps hétérophiles par tests rapides

Spécifique : recherche d'anticorps spécifiques

- présence d'IgM anti VCA et d'IgG anti VCA
- absence d'anticorps anti EBNA

### ***HSV1/ HSV2***

Sérologie : diagnostic indirect

Mise en évidence des anticorps de type IgG et IgM :

- anticorps spécifiques de HSV1 et HSV2
- anticorps spécifiques de HSV1 ou de HSV2

Diagnostic direct

- par culture (de moins en moins pratiqué)
- par PCR en temps réel ++
- par différenciation des types 1 et 2

Les outils diagnostiques sont différents en fonction des situations cliniques :

- Lésions cutané-muqueuses: prélèvement local à l'aide d'un écouvillon et culture cellulaire ou PCR. La sérologie n'a pas d'intérêt sauf si suspicion de primo-infection.
- Atteinte du SNC : biopsie cérébrale ou de LCR et PCR
- Forme systémique: PCR dans le plasma
- Etudes épidémiologiques: sérologie

**Traitement :**

Les antiviraux utilisés sont tous des agents virostatiques, limitant la phase de prolifération. Ils sont tous dirigés contre l'ADN polymérase virale avec une sélectivité très importante (donc sans altérer les ADN polymérases cellulaires humaines). L'aciclovir, le valaciclovir, le ganciclovir, le valganciclovir et le famciclovir doivent être tri-phosphorylés, la première phosphorylation étant assurée par une thymidine kinase virale (pour HSV et VZV) ou par une phosphotransférase (CMV) ; seules les cellules infectées contiennent le métabolite actif. Le foscarnet (principalement indiqué dans les infections à CMV) bloque la réplication de l'ADN viral en agissant sur un site proche du site de fixation des nucléosides naturels. Enfin, le cidofovir (principalement indiqué dans infections à CMV) est biphosphorylé par une phosphatase cellulaire. Tous ces antiviraux sont éliminés par voie urinaire quasiment sous forme inchangée et sont tous plus ou moins néphrotoxiques. Les posologies doivent donc être adaptées en prenant en compte la fonction rénale. De plus, une hydratation efficace doit être impérativement prescrite en parallèle du traitement anti-herpesviridae. En conséquence, toute co-prescription avec un autre médicament néphrotoxique doit être soigneusement réfléchie (Willey et *al.*, 2008).

**3.2 Principales techniques de biologie moléculaire utilisées dans l'étude des agents infectieux**

L'identification des bactéries, isolées à partir de prélèvements biologiques, pendant des années, a été basée uniquement sur des critères morphologiques et biochimiques. Le développement des techniques de biologie moléculaire a permis d'introduire ces approches au sein des laboratoires d'analyse biologique (Roux et Rolain, 2014).

En plus des techniques traditionnelles de la microbiologie (examen direct, culture bactérienne, sérologie, tests biochimiques) la biologie moléculaire et grâce à ses outils a permis l'étude directe et plus rapide dans les analyses microbiologiques. Leurs principes et indications varient selon les applications (Lamoril et *al.*, 2007).

Les techniques de base de la biologie moléculaire consistent le plus souvent à tirer parti des caractéristiques propres du matériel biologique sur lequel on travaille et à exploiter des organismes, surtout des microorganismes, du monde vivant (Riquet et Pitel, 2000).

**Extraction d'ADN :**

L'extraction et la purification des acides nucléiques sont les premières étapes dans la plupart des études de biologie moléculaire. L'objectif des méthodes d'extraction des acides nucléiques est d'obtenir des acides nucléiques purifiés (Somma, 2004).

L'extraction peut se faire à partir de divers liquides ou matériels biologiques : sang, liquide céphalo-rachidien, liquide pleural, prélèvement bronchique, biopsie....

De manière générale, après l'extraction des acides nucléiques, ces derniers doivent être amplifiés avant d'être analysés (Somma, 2004).

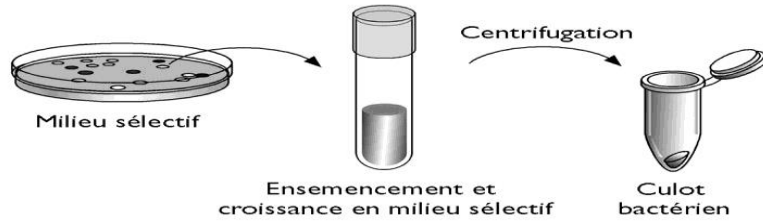
*Extraction d'ADN bactérien*

Il existe différents protocoles pour extraire l'ADN, qui suivent approximativement le même schéma de principe (figure 5) (Tefrit, 2010).

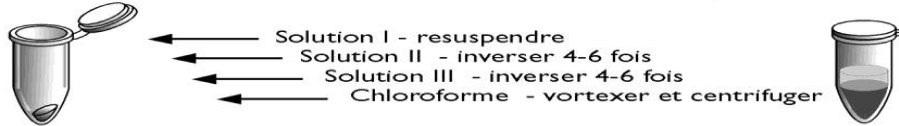
*Extraction d'ADN viral*

La manipulation d'ADN est relativement simple. En milieu adéquat, la résistance de la molécule d'ADN permet de la manipuler sans précautions strictes, rendant les protocoles abordables. La clarification et l'extraction font appel à la faiblesse des liaisons hydrogène liant

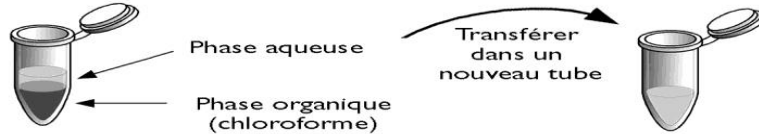
A) Ensemencement et récolte de bactéries



B) Lyse des cellules, destruction des membranes et des protéines



C) Récupération de la phase aqueuse



D) Précipitation à l'isopropanol



E) Lavage et resuspension du culot d'ADN plasmidique

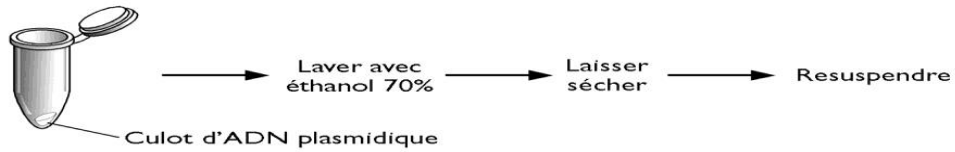


Figure5 : Principe d'extraction d'ADN bactérien (Tefrit, 2010).

les deux brins de l'ADN et aux forces ioniques existant au sein de cette molécule (Riou ,2006).

#### Préparation des échantillons et extraction

Provenant de divers tissus biologiques, l'ADN viral à étudier nécessite en premier lieu d'être extrait et un minimum clarifié. Par des techniques de broyage et de chauffage, l'ADN total est grossièrement extrait des échantillons, avec plus ou moins de facilité selon la nature des tissus. Une première clarification permet de dissocier les gros fragments résiduels broyés des cellules isolées et des molécules d'ADN libérées (Riou ,2006).

#### *Purification*

Une étape de clarification de l'ADN précédée de l'étape d'extraction permet, selon les tissus concernés, d'augmenter le signal associé à l'ADN lors de l'analyse qualitative comme quantitative. Elle est effectuée par l'emploi d'un kit de d'extraction et de purification qui a pour principe de libérer le maximum d'ADN présent dans l'échantillon considéré puis de séparer l'ADN de tous les résidus non acides nucléiques pouvant masquer l'ADN lors de l'analyse (Riou ,2006).

#### **PCR en temps réel :**

La PCR en temps réel permet la détection qualitative et quantitative de diverses catégories d'agents pathogènes.

La bactériologie est l'un des domaines où les techniques de PCR en temps réel ont trouvées leurs meilleures indications, particulièrement :

- Pour la mise en évidence de bactéries de culture lente et difficile comme *Mycobacterium tuberculosis* , *Bordetella pertussis* (agent responsable de la coqueluche), *Legionella sp.*, *Mycoplasma sp.* et *Chlamydia trachomatis* .

Pour les germes non cultivables par les techniques classiques comme *Bartonella henselae*, agent responsable de la maladie des griffes du chat.

- Dans certaines situations particulières qui nécessitent une détection rapide de l'agent pathogène comme la recherche de germes responsables de la méningite (*Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*).

Dans le domaine de la virologie médicale, la sensibilité et la spécificité accrue de la PCR en temps réel ont été mises à profit pour la détection et la quantification d'agents pathogènes viraux comme le virus de l'hépatite B (VHB), le cytomegalovirus (CMV), le virus de l'hépatite C (VHC) et de l'immunodéficience humaine (VIH). La sensibilité aux traitements antiviraux a été également évaluée en quantifiant ces derniers dans le sang, le plasma et divers liquides biologiques (mesure de la charge virale) (Ameziane et *al.*, 2005).

### ***Avantages***

Les techniques de PCR en temps réel, permettent une détection spécifique et immédiate de l'amplicon au cours de la réaction de PCR et ce pour des temps qui varient en fonction des appareils entre 30 et 120 minutes (Régliez et *al.*, 2003).

La PCR en temps réel présente l'avantage considérable de pouvoir quantifier la cible détectée dans l'échantillon biologique. En effet, le temps de détection du signal est directement proportionnel à la quantité d'ADN cible présente dans le mélange réactionnel. Durant les premiers cycles, la fluorescence reste à son niveau de base. Le cycle à partir duquel la courbe de fluorescence croise la droite correspondant au seuil de détection, représente le Ct (Threshold cycle). Celui-ci est inversement proportionnel à la quantité d'ADN cible présente dans l'échantillon biologique avant la réaction (Régliez et *al.*, 2003).

### ***Inconvénients***

- Faux négatif : Paramètres d'amplification inappropriés ; Quantité d'ADN cible inadéquate ; Présence d'un inhibiteur de la Taq polymérase
- Faux positif : Dus à la contamination des échantillons ; constituent le problème majeur de cette technique qui impose des mesures expérimentales draconiennes (Sailleau, 2012).
- Dans le domaine de la virologie, la détection d'agents pathogènes viraux par PCR en temps réel ne prouve pas forcément le caractère infectieux du virus.
- L'inconvénient majeur réside dans l'achat d'un équipement coûteux, qui dans un contexte d'analyse de routine ne sera amorti que sur un grand nombre d'échantillons. Le développement de plateformes d'analyses biomédicales polyvalentes permettant une mutualisation des appareils devrait permettre l'essor de ces nouvelles technologies (Régliez et *al.*, 2003).

### **PCR en point final:**

Présentent les mêmes indications que pour la PCR en temps réel.

Le contrôle des produits PCR se base sur le principe de la séparation et l'identification des fragments d'ADN amplifié des éventuels fragments non spécifiques en fonction de leur taille

et leur purification des restes des réactifs d'amplification dans un champ électrique homogène (Lassoued, 2007).

### ***Avantages***

Amplification de plusieurs échantillons au même temps (Terranti, 2013)

### ***Inconvénients***

- Différence de rendement de PCR d'un tube à l'autre.
- Risque de contamination plus élevé que pour la PCR en temps réel.
- Possibilité de la présence d'inhibiteur de la TaqPoly dans le tube du patient (Terranti, 2013).

### **Séquençage :**

#### ***Indications***

La technique de séquençage la plus utilisée en microbiologie est le « Multi Locus Sequens Typing » ou MLST.

La technique de « Multi Locus Sequens Typing » MLST permet l'étude de l'évolution phylogénétique de nombreuses espèce bactériennes comme *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* ou encore *Staphylococcus aureus*. C'est une nouvelle approche moléculaire dérivée de l'électrophorèse (Cholley, 2010).

Le MLST est basé sur le séquençage de 5 à 10 gènes de ménage « house keeping genes », importants dans le métabolisme de la bactérie. Ces gènes de ménage sont stables dans le temps, le taux de mutation est faible et les allèles sont caractéristiques de chaque espèce (Cholley, 2010).

#### ***Avantages***

- Donne des informations sur la divergence nucléotidique des gènes des noyaux à partir d'un grand échantillonnage d'une population.
- Permet de déterminer l'origine clonale d'un groupe de souches donné. Estime le taux de recombinaison homologues. Permet d'établir une analyse phylogénétique.
- Permet d'établir une structure de la population qui pourra être utilisée pour le séquençage de nouveaux génomes ou pour l'analyse des données de microarrays (Blanc, 2007).

#### ***Inconvénients***

- Echantillon seulement une fraction du noyau du génome.

- Ne procure pas d'information sur le contenu en gènes ou sur les réarrangements structuraux (Blanc, 2007).

### **3.3 Choix des automates et des kits commerciaux pour la microbiologie**

Le choix des techniques en biologie moléculaire est vaste et ne cesse d'évoluer. En microbiologie néanmoins, de nombreux kits et automates sont disponibles facilitant ainsi la mise en place de ces techniques (tableaux II, III). Certains critères peuvent aider au choix technique. Le plus souvent, l'utilisation d'un kit commercial validé facilite la mise en place d'une technique. Le choix du kit dépend de l'habitude de l'utilisateur, de son expérience, des possibilités financières. Au niveau national ou international, aucun consensus n'existe. Beaucoup de kits sont par ailleurs équivalents, même si les techniques utilisées diffèrent. Il n'existe pas de règle spécifique. Le choix d'une technique est donc affaire d'expérience personnelle ou d'équipe (Lamoril et *al.*, 2007).

Tableau II : Quelques gammes de kits commercialisées pour la microbiologie clinique (Lamoril et *al.*, 2007)

Agent pathogène	Kits	Société
Virus		
CMV	Recherche de l'ADN viral (amplification)	
	NucliSens CMV pp67 (NASBA + Molecular Beacon)	BioMérieux
	Amplicor CMV (PCR)	
	CMV Hybrid capture	Roche
	CMV Trender (PCR en temps réel)	Digène
Autres virus		Affigene
	NucliSens EasyQ Enterovirus (NASBA + Molecular Beacon)	BioMérieux
	RealArt Artus Enterovirus (RT-PCR en temps réel)	
	ReSSQ EBV Assay	Qiagen
	RealArt Artus EBV	LightUp
	EBV Trender	Technologies
	BKV Trender (sang total ou urines)	Qiagen
	HSV 1 et 2 Tracer (LCR, vésicules)	Affigene
	VZV (varicelle zona) [LCR, vésicules]	Affigene
		Détection après amplification (Cobas) Amplicor
Bactéries		
Chlamydia trachomatis (CT)	CT/NG (PCR)	
	(Cobas) TaqMan CT (PCR en temps réel)	Roche
Neisseria gonorrhoea (NG)	Détection sur culture(HPA)	Roche
		BioMérieux

Tableau III : Principaux automates dédiés spécifiquement aux kits de biologie moléculaire pour la microbiologie (Lamoril et *al.*, 2007).

Principe de la technique	Sociétés	Automates	Exemples d'application
Amplification génique	Roche	Cobas AmpliPrep	Gamme Amplicor et Amplicor Monitor (VHC, VIH) VHC, VIH, VHB
		Cobas AMPLICOR	
		Cobas AmpliPrep	
		Cobas TaqMan Analyzer	
	Gen-Probe	LightCycler	Gamme LightCycler
		Procleix Semi-automated	Procleix VIH/VHC
	BioMérieux	TIGRIS DTS	Aptima Combo 2
		NucliSens EasyQ	Gamme NucliSens
	Abott	LCx	HCV RNA quantitative assay
		Abbott m2000	Abbott RealTime HCV et VIH-1
Beckton Dickinson	BD ProbeTec	Gamme BD ProbeTec	
Bayer	Système 340	Gamme Versant® (VHB, VHC et VIH)	
	TMA component system	Versant® HCV qualitative assay	
Qiagen	Thermocycleurs pour PCR temps réel (RG3000, LightCycler, ABI 7000 et suivants)	Gamme RealArt	
Séquençage	Bayer	OpenGene	Gamme TruGene (VHB, VHC, VIH-1)
	Celera	ABI Prism 3100 et 3700	GammeViroSeq (VHC, VIH-1)
	Biotage	PyroMark ID	Gamme PyroMark (bactéries et champignons)

L'objectif de ce travail est d'appliquer la biologie moléculaire dans le diagnostic moléculaire des infections (*Bordetella pertussis*, *Entérovirus* et *Herpècevirdae*), plus précisément par la technique d'amplification la PCR en temps réel.

## 1. Matériel

### Patients étudiés

Au cadre de cette étude 28 patients ont été soumis à un diagnostic moléculaire pour la recherche de l'un des germes responsables des infections citées (tableau IV).

Tableau IV : le diagnostic moléculaire des patients étudiés

Patients	Nombre de patients	Suspections	Germes recherchés	Symptômes
Nourrisson ou chez un sujet non immunisé.	7	la coqueluche	<i>Boredetella pertissus</i>	toux persistante de plus de 7 jours
Immunodéprimés	16	post-greffe rénale ou fièvre persistante non documentée	<i>Herpesviridiae</i> : CMV, EBV, HSV1/HASV2.	Refus des greffes
nourrisson avec prédominance de lymphocytes à l'examen cytologique du LCR	5	Méningite virale	Entérovirus	-une forte fièvre, -une sensibilité exacerbée à la lumière, -une raideur de la nuque, de violents maux de tête, -des nausées et des vomissements.

### Matériels biologiques

Les différentes infections ont été recherchées à partir des différents liquides biologiques :

- Le sang total prélevé sur tube EDTA
- Le liquide céphalo-rachidien (LCR).
- Aspiration naso-pharyngée.

Ces prélèvements ont été récoltés chez des enfants ou des adultes hospitalisés au niveau des différents services du CHU Hussein-Dey et présentant une symptomatologie évocatrice de l'une des pathologies causées par les germes recherchés.

L'appareillage et les réactifs sont présentés en annexes 1 et 2.

## **2. Méthodologie**

### **2.1 Extraction d'ADN**

L'ADN du germe recherché a été extrait par utilisation de Kit (Argene).

#### **a. *La lyse***

Elle se fait principalement par le mélange de 200 µl de tampon AL avec 200 µl d'échantillon biologique et 20 µl de protéase (permet la libération de l'ADN par digestion des protéines associées). Le mélange est ensuite incubé à 56°C pendant 10min (pour activer la fonction enzymatique et lyser les cellules) et centrifugé pendant quelques secondes. 200µl d'éthanol absolu ont été ajoutés dans chaque tube et centrifugés brièvement. Le contenu des tubes est transféré dans des colonnes pourvues de filtres en silice et Centrifugé ensuite pendant 1min à 9000 rpm. L'éluât est ensuite éliminé et le filtre est placé sur un nouveau tube vide.

#### **b. *Lavages***

Deux lavages sont réalisés:

Le premier sert à éliminer les protéines, se fait par 500µl de tampon AW1 et centrifugation pendant 1min à 9000rpm. L'éluât est éliminé et le filtre est placé sur un nouveau tube.

Le deuxième lavage sert à éliminer les lipides par addition de 500µl de tampon AW2 puis centrifugation pendant 3min à 12000 rpm. L'éluât est éliminé et le filtre est placé sur un

nouveau tube et centrifugé à sec pendant 1min à 12000rpm pour sécher la colonne. Le filtre est de nouveau placé sur un tube vide.

### *c. Elution*

Pour l'élution, 100µl de tampon AE (elution buffer) ont été ajoutés à chaque tube, suivi d'une incubation à température ambiante pendant 5 min et d'une centrifugation (1min, 9000rpm). L'ADN extrait est contenu dans l'éluât et les filtres sont éliminés. L'ADN récupéré peut être utilisé ou conservé à -20°C pour une utilisation ultérieure.

## **2.2 Recherche des germes**

### **2.2.1 Amplification par PCR en temps réel**

Cette technique a été utilisée pour la recherche de *B. pertussis* et des entérovirus et des *Herpesviridae*.

*Kits d'amplification pour PCR en temps réel ( BioMérieux, 1963. France)*

**Bordetella Rgene:** Constitué de :

- Mix réactionnel (prémix) : Contient du tampon, MgCl<sub>2</sub>, les nucléotides (dNTP), les amorces (Forward et Reverse), l'enzyme (taq polymérase) et de l'eau.
- Contrôle positif : contient l'ADN bactérien de l'espèce *Bordetella pertussis*
- Contrôle négatif : nuclease-free water.

**CMV Rgene:**

- Mix réactionnel: H<sub>2</sub>O, le tampon, MgCl<sub>2</sub>, les dNTP, les amorces (Forward et Reverse), l'enzyme (taq polymerase)
- Contrôle positif : contient l'ADN CMV
- Contrôle négatif : eau distillée.
- Les standards : pour pouvoir quantifier le nombre de copies du virus dans le prélèvement si le résultat est positif.
  - ✓ QS1 : 5000 copies/µl d'ADN CMV
  - ✓ QS2 : 500 copies/µl d'ADN CMV
  - ✓ QS3 : 50 copies/µl d'ADN CMV
  - ✓ QS4 : 5 copies/µl d'ADN CMV

**EBV Rgene:**

- Mix réactionnel: H<sub>2</sub>O, le tampon, MgCl<sub>2</sub>, les dNTP, les amorces sens et anti-sens, l'enzyme (taq polymerase)
- Contrôle positif: Contient l'ADN EBV
- Contrôle négatif: eau distillée.
- Standards :
  - ✓ QS1 : 10000 copies/μl d'ADN EBV
  - ✓ QS2 : 1000 copies/μl d'ADN EBV
  - ✓ QS3 : 100 copies/μl d'ADN EBV
  - ✓ QS4 : 10 copies/μl d'ADN EBV

**HSV1/HSV2 Rgene:**

- Mix réactionnel : H<sub>2</sub>O, le tampon, MgCl<sub>2</sub>, les dNtp, les amorces sens et anti-sens, l'enzyme (taq polymerase)
- Contrôle positif : contient l'ADN HSV1/HSV2
- Contrôle négatif : eau distillée.
- Standards:
  - ✓ QS1 : 2000 copies/μl d'ADN HSV1/HSV2
  - ✓ QS2 : 200 copies/μl d'ADN HSV1/HSV2
  - ✓ QS3 : 20 copies/μl d'ADN HSV1/HSV2
  - ✓ QS4 : 2 copies/μl d'ADN HSV1/HSV2

**Entérovirus Rgene :**

- Mix réactionnel : H<sub>2</sub>O, le tampon, MgCl<sub>2</sub>, les dNtp, les amorces sens et anti-sens, l'enzyme (taq polymerase)
- Reverse Transcriptase (car les Entérovirus sont des virus à ARN)
- Contrôle positif : contient l'ADN Entérovirus
- Contrôle négatif : eau distillée.

Cette technique est réalisée par deux méthodes:

**2.2.a PCR en temps réel qualitative****Recherche de *Bordetella pertussis* dans les aspirations naso-pharyngées**

- Le diagnostic se fait par PCR en temps réel qualitative, on utilisant le kit *Bordetella pertussis*. Cette recherche a été réalisée sur 7 patients.
- En plus des échantillons de patients, 2 tubes pour les contrôles (contrôle positif et négatif) ont été également utilisés. (annexe 3)
- Les mélanges réactionnels ont été répartis à raison de 15µl par tube en plus de 10µl d'une solution d'ADN de patients.

L'amplification a été réalisée dans le thermocycleur CFX96- Biorad (Bio-rad, 1952. USA) et les conditions d'amplification sont résumées dans le tableau V.

Tableau V: Conditions d'amplification de la PCR en temps réel qualitative pour la détection de *Bordetella pertussis* à partir d'aspiration naso-pharyngé

Etapes	Température	Durée	
1 <sup>ère</sup> étape dénaturation	95°C	15 :00 min	45 cycles
2 <sup>ème</sup> étape pré-incubation	95°C	00 :10 sec	
3 <sup>ème</sup> amplification	60°C	00 :40 se	

**Recherche des Entérovirus dans le liquide céphalo-rachidien (LCR)**

Le diagnostic se fait par PCR en temps réel qualitative chez 5 patients.

En plus des échantillons de patients, 2 tubes pour les contrôles (contrôles positif et négatif) ont été également utilisés.

Cette PCR nécessite la réparation de la reverse transcriptase (RT). L'enzyme est diluée au 1/10<sup>ème</sup> dans de l'eau distillée stérile. La RT diluée est ajouté à 150µl de mélange réactionnel à raison de 1,5µl.

Le mélange réactionnel est réparti à raison de 15µl par tube PCR contenant 10µl d'une solution d'ADN de patients et de contrôle.

L'amplification a été réalisée dans le thermocycleur CFX96- Biorad et les conditions d'amplification sont résumées dans le tableau VI.

Tableau VI : Conditions d'amplification de la PCR en temps réel qualitative pour la détection des entérovirus à partir du LCR.

Etapas		Durée	Température	Cycles
Réverse transcription		5min	50°C	1
Activation Taq polymérase		15min	95°C	1
Amplification	Dénaturation	10sec	95°C	45
	Hybridation	40sec	60°C	
	Elongation	25sec	72°C	

### 2.2.b PCR en temps réel quantitative

Cette technique est appliquée pour la recherche de CMV, EBV, HSV1 et HSV2 dans le sang total

Le diagnostic se fait en utilisant le kit CMV Rgene, EBV Rgene ou HSV1/HSV2 Rgene sur Lightcycler 480 II (Roche,1996. Allemagne).

Les mélanges réactionnels se font sur des plaques de PCR spécifiques pour le thermocycleur utilisé (système de code à barres) (annexe 4).

Un volume de 15µl de mix réactionnel est ajouté à 10µl d'ADN des patients. Parallèlement, une série de standards (10µl) est utilisée pour la quantification: QS1, QS2 et QS3. Un contrôle positif et un contrôle négatif ont été également utilisés.

Les conditions d'amplification sont résumées dans le tableau VII.

Tableau VII: Conditions d'amplification de la PCR en temps réel quantitative pour la détection des CMV, EBV, HSV1, HSV2 à partir du sang total

Etape	Température	Durée	Cycle
-------	-------------	-------	-------

Dénaturation	95°C	15 min	
Pré-incubation	95°C	10sec	1
Amplification	60°C	40sec	45

## 1. Résultats

### 1.1 Détection de *Bordetella pertussis* à partir des aspirations naso-pharyngées

Au cours de cette recherche, 07 aspirations naso-pharyngées provenant de nourrissons suspects de coqueluche ont été reçues au laboratoire en vue de la réalisation d'une PCR.

Les PCR *Bordetella pertussis* ont été réalisées par PCR en temps réel qualitative comme précédemment décrit.

Les résultats ne peuvent être interprétés qu'après validation du contrôle positif, du contrôle négatif et du contrôle interne.

Le résultat est exprimé par : Absence ou présence d'ADN de *Bordetella pertussis* dans le prélèvement.

Dans les 7 échantillons aucun résultat positif n'a été suspecté, les résultats obtenus sont représentés dans la figure 5.

### 1.2 Détection d'Entérovirus dans le LCR

Pour ce là, 05 LCR provenant de nourrissons suspects de méningite virale ont été reçus au laboratoire en vue de la réalisation d'une PCR.

Les PCR *Entérovirus* ont été réalisées par PCR en temps réel qualitative comme précédemment décrit.

Les résultats ne peuvent être interprétés qu'après validation du contrôle positif, du contrôle négatif et du contrôle interne.

Le résultat est exprimé par : Absence ou présence d'Entérovirus dans le prélèvement, dans notre cas un seul résultat positif a été obtenu.

Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 6.



Figure 6 : résultat de la PCR en temps réel qualitative sur la *Bordetella pertussis*. (1) : Début d'amplification. (2) : la courbe d'un résultat positif donnée par le contrôle positif. (3) : courbes des résultats négatifs.

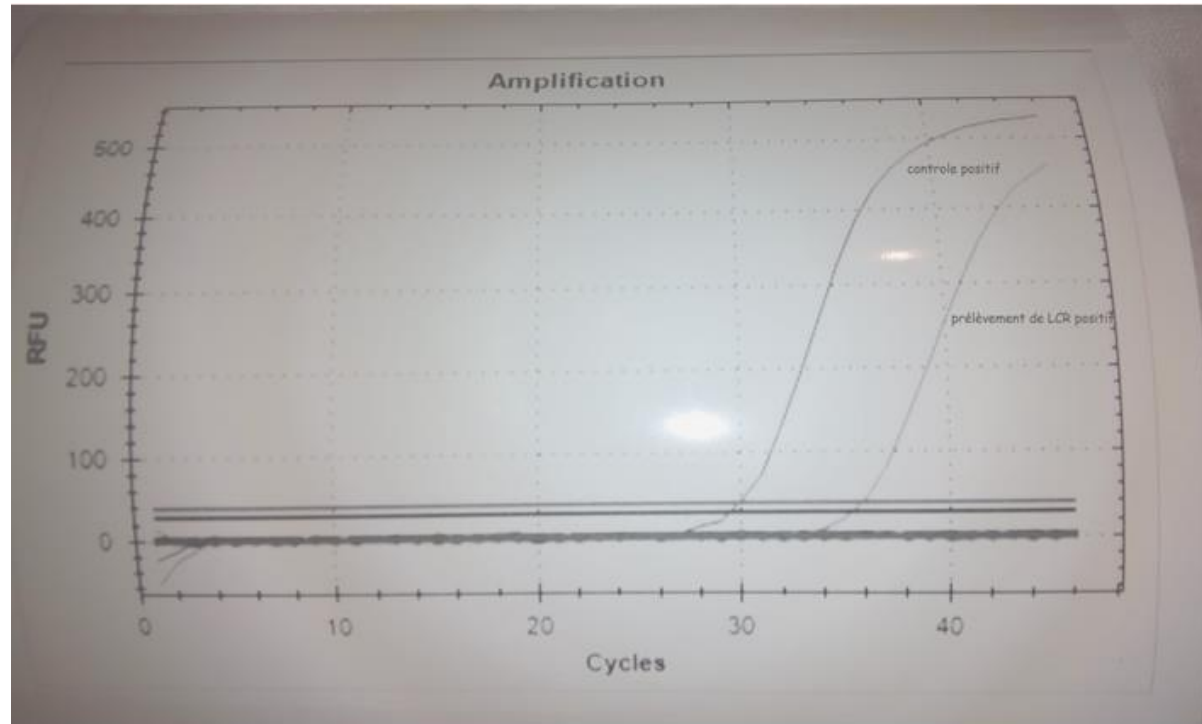


Figure 7 : Résultat de la PCR en temps réel qualitative sur les entérovirus à partir des LCR.

### 1.3 Détection d'Herpesviridae : CMV /EBV/HSV1/HSV2 à partir du sang total

Cette recherche représente le plus grand nombre d'échantillon, 16 prélèvements de sang total (tube EDTA) provenant de patients greffés hospitalisés en néphrologie et présentant des signes de rejet du greffon, ont été reçus au laboratoire en vue de la réalisation d'une PCR.

Les PCR *Herpesvirus* ont été réalisées par PCR en temps réel quantitative comme précédemment décrit.

Les résultats ne peuvent être interprétés qu'après :

Réalisation d'une courbe standard en utilisant des solutions standards de concentrations connues pour effectuer la quantification si le prélèvement est positif.

Validation du contrôle positif, du contrôle négatif et du contrôle interne.

Le résultat est exprimé par : Absence ou présence d'Herpesvirus dans le prélèvement et sa quantification en nombre de copies/ml si celui-ci est positif.

Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau VIII :

Tableau VIII : résultat de recherche de rétrovirus par PCR en temps réel quantitative.

Patient	CMV	EBV	HSV1	HSV2	Quantité
23	-	+	NR	NR	<b>1590 copies/ml</b>
24	-	+	-	-	<b>2050 copies/ml</b>
25	-	-	NR	NR	-
26	-	-	NR	NR	-
27	-	-	NR	NR	-
28	-	-	NR	NR	-
29	-	-	NR	NR	-
30	-	-	-	-	-
31	+	-	-	-	1400 copies/ml
32	-	-	-	-	-
33	+	-	-	-	17100 copies/ml
34	-	-	+	-	340000 copies/ml
06	-	-	-	-	-
07	-	-	-	-	-
08	-	-	-	-	-
09	-	-	-	-	-

NR : Non réalisé

## 2. Discussion :

Les techniques de biologie moléculaire et notamment les techniques de PCR en temps réel ont permis de mettre en évidence la présence de bactéries ou de virus dans divers types d'échantillons biologiques :

Les aspirations nasopharyngées sont revenues négatives durant la période de notre étude, néanmoins, d'autres échantillons sont revenus positifs auparavant, l'extension du nombre d'échantillon traités aurait mis en évidence certains échantillons positifs. Alors qu'une PCR positive signifie que le patient a probablement une coqueluche. Toutefois, la PCR peut également être positive avec les autres espèces de *Bordetella*. Un résultat PCR négatif signifie qu'il est peu probable que la personne ait la coqueluche, mais ne permet pas d'exclure le diagnostic avec certitude. Si un nombre insuffisant de bactéries est présent dans l'échantillon, alors il est possible de ne pas les détecter. La probabilité d'avoir un test positif (culture ou PCR) diminue au fur et à mesure que la maladie progresse.

Cette approche diagnostique obtenue directement sur produit pathologique est la meilleure comme en témoignent les résultats sur plusieurs années, les fréquences de positivité variant de 79 à 90%. Cependant, plusieurs techniques de PCR sont actuellement utilisées en France sans que toutes aient fait l'objet d'une validation de leur performance. Celle dont les amorces permettent d'amplifier le promoteur des gènes codant pour PT est la seule qui ait fait l'objet d'une validation.

Les LCR ont donné un résultat positif confirmé comme un cas de méningite virale à Entérovirus, ceci correspond approximativement au taux de positivité global observé au niveau des LCR reçus au niveau de l'hôpital (environ 20%). La confirmation d'un cas de méningite virale, permet d'étiqueter la nature de l'infection et d'arrêter l'antibiothérapie qui n'a aucun intérêt pour les méningites virales.

Il est couramment admis que 80 à 92 % des méningites lymphocytaires à liquide clair seraient provoquées par les entérovirus « non-polio ». Aux États-Unis, il y aurait 750 000 cas de méningites entérovirales par an dont à peine 10 % seraient recensés par le Center for Diseases Control (CDC) d'Atlanta (12). Les entérovirus se distribuent partout dans le monde. Ils circulent tout au long de l'année dans les régions tropicales. En France de 2008 à 2012, le réseau de surveillance des EV coordonné par le Centre national de référence des entérovirus et parechovirus (CNR EV) identifie en moyenne plus de 1 400 cas par an de méningites à EV.

- La recherche d'Herpesviridae à partir du sang total a permis de montrer :

- Pour la recherche du CMV : deux résultats positifs avec des charges virales respectives de 1400 copies/ml et 17100 copies/ml
- Pour la recherche de l'EBV : deux résultats positifs avec des charges virales respectives de 1590 copies/ml et 2050 copies/ml
- Pour la recherche de HSV1 : un seul résultat positif (340000 copies/ml)
- Aucun résultat positif n'a été rapporté pour le HSV2.

La détection des *Herpesviridae* dans le sang des patients greffés présentant des signes de rejet du greffon, permet d'instaurer un traitement antiviral adéquat (Aciclovir, Ganciclovir) afin d'éviter le rejet de greffe. La quantification permet le suivi de l'efficacité du traitement en mettant en évidence la diminution de la charge virale sur des prélèvements de contrôle réalisés deux semaines après le début du traitement.

L'utilisation de ces techniques en routine présente de nombreux avantages :

D'une part, elles permettent de diagnostiquer rapidement des infections graves afin d'instaurer le traitement adéquat, elles permettent également de diagnostiquer des infections après instauration d'un traitement antibiotique ou antiviral, le génome des germes étant détecté plusieurs jours après la destruction des bactéries ou des virus, permettant ainsi d'établir un diagnostic étiologique de l'infection.

D'autre part, elles permettent de suivre l'évolution du traitement par mesure de la charge virale notamment chez les patients immunodéprimés.

Néanmoins, les techniques de biologie moléculaire nécessitent des précautions particulières de manipulation : organisation des locaux, utilisation de contrôles (contrôle interne, contrôle positif, contrôle négatif) afin de valider les manipulations et d'éviter les résultats faussement positifs (contaminations lors des manipulations) ou faussement négatifs (inhibiteurs de la PCR).

### Conclusion

Les techniques de biologie moléculaire présentent un grand intérêt dans le diagnostic de routine des infections bactériennes et virales.

Cette étude est basée sur le diagnostic moléculaire des maladies infectieuses (la coqueluche et la méningite virale) causées par *Bordetella pertissus* et les *Entérovirus*, ainsi que les *Herpesviridae* au cours de rejet des greffes, par amplification de l'ADN extrait par la technique PCR en temps réel qualitative et quantitative.

Au terme de ce travail on a détecté rapidement par une PCR en temps réel qualitative la présence des *Entérovirus* d'ADN extrait à partir des LCR, alors qu'aucun résultat positif n'a été révélé pour la *Bordetella pertissus* à partir des aspirations naso-pharyngées.

Egalement, on a détecté dans un temps très court par une PCR en temps réel quantitative la présence des *Herpesviridae* d'ADN extrait à partir du sang total, on mesurant leur quantité dans chaque échantillon.

Cependant, il existe une corrélation entre la concentration de l'ADN et le nombre et la quantité ou le nombre de virus détecté, donc il est nécessaire d'utiliser un standard au cours de chaque réaction pour pouvoir quantifier le cible recherché.

En effet, la technique PCR en temps réel est la technique la plus fiable pour la détection des agents infectieux, pour plus d'information telle que la mesure de la charge virale, cette technique exige l'addition d'un contrôle interne ou notamment le standard pour pouvoir quantifier le cible recherché. De plus cette technique est très valable pour le suivi des traitements.

Comparant aux techniques classiques de la microbiologie dans le diagnostic des maladies infectieuses, les outils de la biologie moléculaire semblent être plus rapides, efficaces et plus fiables, donnant plus d'informations.

Et en fin, les techniques de la biologie moléculaire étaient réservées aux laboratoires spécialisés, de nos jours, elles trouvent de plus en plus leur place dans les laboratoires de diagnostic et deviennent des techniques de routine, néanmoins leur réalisation nécessite une organisation et des précautions particulières.

Par ailleurs, nous espérons que ces outils seront de plus en plus développés avec des couts commerciaux moins chers.

# REFERENCÉS BIBLIOGRAPHIQUES

---

## Références bibliographiques :

1. Ameziane N, Bogard M, Lamoril J, (2005). Principes de biologie moléculaire en biologie clinique ; 281-283.
2. Borde I, (2006). Biologie moléculaire et Génétique, Université Pierre et Marie Curie Paris .
3. Bourgoïn S, (2000). Protocoles rapides pour la préparation d'ADN à partir d'échantillons caractéristiques de la biologie judiciaire, Université du Québec à trois rivières : 13-14.
4. Carpentier Anne-Sophie, (2006). Le transcriptome : un domaine d'application pour les statistiques, de nouveaux horizons pour la biologie, Thèse pour obtenir le grade de Docteur en Sciences de l'Université d'Evry, Spécialité : Biologie cellulaire et moléculaire, Université d'Evry, France : 10.
5. Cholley Pascal, (2010). Analyse génétique des souches multi résistantes de *Pseudomonas aeruginosa* dans l'Est de la France, apport prédictif potentiel sur le risque infectieux, Thèse pour obtenir le grade de Docteur l'Université de Franche-Comte, France : 59.
6. Craig M, Robertson P, Howard N, Silink M, Rawlinson D. 2003. Diagnosis of Enterovirus Infection by Genus-Specific PCR and Enzyme-Linked Immunosorbent Assays.
7. Donnars O, Vignon X, Daunay M C, (2005). La recherche l'actualité des sciences : le double jeu de chromosome X, revue N° 385 France ; 73.
8. Dr. Blanc Dominique, (2007). Génétique des populations bactériennes, Université de Lausanne, Faculté de Biologie et Médecine :3.
9. Eaton S L , Hurtado M L, Oldknow K J, Graham L C, Marchant T W, Gillingwater T H, Farquharson C, Wishart T M, (2014). Un guide moderne western blot fluorescente quantitative des stratégies de dépannage, Royaume-Uni : 2.
10. Grimpel E, 2006. La coqueluche en pratique en 2006; Pertussis in practice in 2006. Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique 46 (2006) : 548.
11. HAS : Haute Autorité de Santé, 2014. Détection du génome des entérovirus dans le liquide céphalorachidien par amplification génique dans les méningites : 10.
12. Huybens N, Mainil J, Marlier D. 2009. Les techniques de biologie moléculaire: 113.
13. Lamoril J, Bogard M, Ameziane N, Deybach J-C , Bouizegarène P, (2007). Biologie moléculaire et microbiologie clinique en 2007 : Molecular biology in clinical microbiology in 2007. Révue générale et analyse prospective : 6-17.

# REFERENCIBIBLIOGRAPHIQUES

---

14. Lamoril J, Bogard M, Ameziane N, Deybach J-C, (2008). Les techniques de séquençage de l'ADN:une révolution en marche. Première partie : DNA sequencing technologies: A revolution in motion. Part one, Révue générale et analyse prospective : 261- 263.
15. Lassoued M, (2007). Polymorphisme des antigènes plaquettaires humains dans la population tunisienne, Université de tunis El Manar, faculté des sciences : 28.
16. Lodish H, Baltimore D, Berk A, (2005). Biologie moléculaire de la cellule, 3<sup>e</sup> édition: traduction de la 5<sup>e</sup> édition américain : molecular cell biology :24 :87.
17. Mackiewicz V, (2007). Séquençage des acides nucléiques, assistant hospitalo-universitaire, service de microbiologie, hôpital Paul Brousse, France.
18. Mazon A, 2014. agents infectieux: 11-19.
19. Maurel Z C, (2008). Hybridation, TD de Biologie Moléculaire (hybridation 1). Grèce.
20. Medraoui L, (2014). Technique de séparation et d'analyse des acide nucléique : ADN, ARN et plasmide, Université Mohammed V Agdel, Faculté des sciences : 12.
21. Muyldermans G, 2014. Détection de Bordetella pertussis dans une aspiration ou un frottis nasopharyngé par PCR et culture.
22. Raisonier A, (2006). Biologie génique, Université Pierre et Marie Curie : 61:118.
23. Rampaud A E,(2009). L'intoxication héréditaire au cuivre dans la race canine Bedlington Terrier : mise au point d'un test de diagnostic moléculaire : 41.
24. Riou A, 2006. Amélioration du protocole de PCR Quantitative pour la détection de l'OsHV1 chez l'huître creuse, Crassostrea gigas, dans le cadre du projet TRIPLOFIMER et suivi d'individus lors du phénomène de mortalité estivale dans le cadre du projet AQUAFIRST : 14.
25. Réglier Poupet H, Prots L, Poyart C, (2003). la PCR en temps réel : principe et application en bactériologie médicale, France : 22-24.
26. Riquet J, Pitel F, (2000). Génétique moléculaire : principes et application aux populations animales : 29.
27. Romana S, Malan V, (2010).Cytogénétique moléculaire,Service d'Histo-Embryo-Cytogénétique, Hôpital Necker Enfants Malades, Paris : 7.
28. RouxV, Rolain J M, (2014).Identification des bactéries par biologie moléculaire, Professeur des Universités, praticien hospitalier : 11.
29. Sailleau C, (2012). L'AMPLIFICATION GÉNIQUE PAR PCR (Polymérase Chain Reaction), Agence Nationale de Sécurité Sanitaire,Laboratoire de Santé Animale de Maisons-Alfort, France :17.
30. Schoun A, 2011. La prévention de l'infection du nouveau-né par la coqueluche : 22.

# REFERENCIBIBLIOGRAPHIQUES

---

31. Segondy M, 2007. INFECTIONS VIRALES : GRANDS SYNDROMES ET VIRUS RESPONSABLES. France.
32. Somma M, (2004). Analyse d'échantillons alimentaires pour la présence d'organismes génétiquement modifiés: Extraction et purification de l'ADN, Organisation mondiale de la santé bureau régional de l'Europe: 4.
33. Somma M, Querci M, (2006). Analyse d'échantillons alimentaires pour la présence d'organismes génétiquement modifiés : La réaction de polymérisation en chaîne (PCR), Organisation mondiale de la santé bureau régional de l'Europe, module 6 :3/10-11.
34. Tagu D, Moussard C, (2003). principe des techniques de biologie moléculaire. 2 eme édition revue augmentée : 39-40.
35. Tefrit A, 2010. Extraction d'ADN bactérien : 2-3.
36. Tellaa Redouane, (2013). Apport de la biologie moléculaire dans le diagnostic des infections fongiques invasives. thèse du doctorat en pharmacie, Université Mohammed V -SOUISSI-, Faculté de médecine et de pharmacie Rabat : 18-39.
37. Terranti N, (2013). PCR : Polymerase chain reaction : classique et en temps réel, universitaire de constantine : 130/ 145.
38. Tissières L, Nanchen S, Péter O, Praz G. 2009. Diagnostic de la Coqueluche par méthode génétique (PCR Bordetella pertussis). Institut Central des Hôpitaux Valaisans, Sion.
39. Tucker M, 2003. "Enterovirus Infections Increase Risk of Type 1 Diabetes in High-Risk Children." Diabetes : 22.
40. Willey P, Sherwood H, Woolverton K. 2008. Microbiologie, 3<sup>e</sup> édition :933.

Annexe 1 :

## **Appareillage :**

**Thermocycleur CFX96 Real-Time System C1000 thermal cycler (BIO-RAD)** : appareil utilisé pour la réaction de PCR muni de 2 modules interchangeables:

- l'un utilisé pour la PCR en temps réel permettant l'amplification et la révélation simultanées de l'ADN.
- l'autre pour la PCR conventionnelle qui permet uniquement l'amplification de l'ADN tandis que la révélation se fait par électrophorèse sur gel.

**Thermocycleur Light Cycler LC480 (Roche)** pour PCR en temps réel qualitative et/ou quantitative.

Annexe 2 :

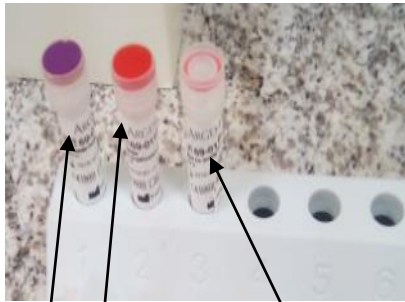
**Réactifs :**

Extraction d'ADN : kit d'extraction Argene constitué de : (Annexe : Composition du kit d'extraction d'ADN)

- Tampon de lyse (AL), AW1
- Solution de lavage 1 (AW1),
- Solution de lavage2 (AW2),
- Tampon d'éluion (AE)
- Protéase
- Ethanol

## Annexe 3 :

### PCR en temps réel qualitative : recherche de *B.pertissus*



Kit de PCR Bordetella  
Premix contrôle positif contrôle négatif

Ajouter 15 $\mu$ l du mix d'amplification, y ajouter 10 $\mu$ l d'échantillon ou de contrôle, mélanger.



Tube de PCR volume 2ml



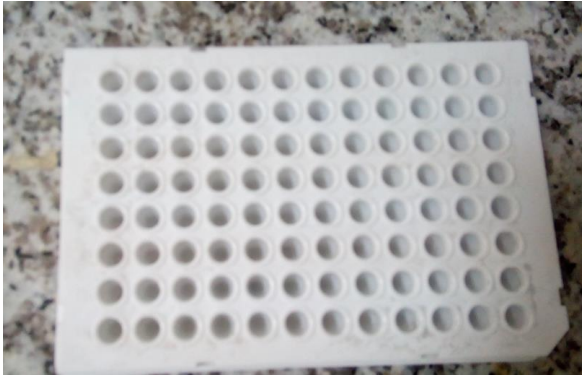
thermocycleur CFX96- Biorad pour la PCR en temps réel qualitative



Allumer le thermocycleur CFX96- Biorad et programmer

## Annexe 4 :

PCR en temps réel quantitative.

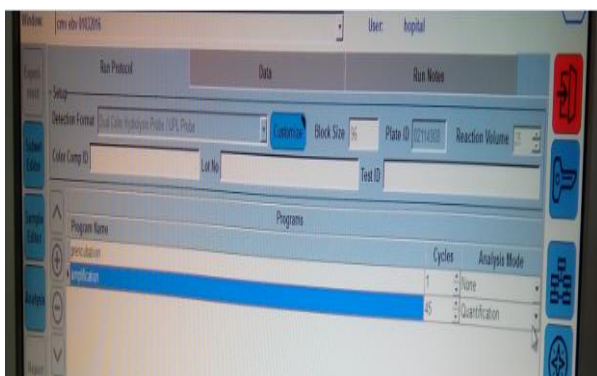


Déposer 15 $\mu$ l de mix réactionnel dans chaque cupule de la plaque en fonction du nombre de prélèvements.

Ajouter 10 $\mu$ l de l'ADN extrait, de standard, de contrôle positif ou de contrôle négatif dans chaque cupule correspondante.

Couvrir la plaque avec un film transparent pour éviter l'évaporation du mélange.

Mettre la plaque dans l'appareil (le light cycler 480 II).



Programmer le thermocycleur

## Résumé

Le développement des techniques de biologie moléculaire à partir des années 1990 a permis d'améliorer considérablement les moyens de diagnostic biologique d'une manière générale. Leur intérêt dans le diagnostic microbiologique s'est accru au fil des années, elles permettent d'obtenir des résultats rapides en cas d'urgence, de détecter des micro-organismes difficilement ou non cultivables par les techniques usuelles (bactéries intracellulaires, virus) et permettent même de suivre l'évolution de certaines infections virales par la mesure de la charge virale. De plus, la plupart des techniques utilisées aujourd'hui peuvent être automatisées pour traiter rapidement un grand nombre d'échantillons.

L'objectif de ce travail est de décrire les principales techniques de biologie moléculaire appliquées en Microbiologie médicale et plus précisément au niveau de l'unité de biologie moléculaire du laboratoire central du Centre Hospitalo Universitaire Nafissa Hammoud (Ex-Parnet) afin d'apprécier l'importance et l'intérêt dans le diagnostic des infections bactériennes et virales en pratique courante.

Les mots clés : Biologie moléculaire, Amplification, *Bordetella pertussis*, *Entérovirus*, *Herpèsviridae*.

## المخلص

ان تطور تقنيات البيولوجيا الجزيئية في بدايات 1990 قد سمح بتحسين و بشكل ملحوظ وسائل التشخيص البيولوجي بصفة عامة. و مع مرور الوقت زادت اهتماماتها في التشخيص الميكروبيولوجي, حيث سمحت بتحقيق نتائج سريعة في الحالات الطارئة, و الكشف عن الكائنات المجهرية الصعبة أو غير قابلة للزراعة بالتقنيات المعتادة ( بكتريا داخل الخلايا و الفيروسات) و سمحت ايضا بمتابعة بعض الالتهابات الفيروسية عن طريق قياس نسبة الفيروس. اضافة الى أن معظم التقنيات المستخدمة حاليا يمكن أن تصبح آلية لمعالجة أكبر عدد من العينات سريعاً.

الهدف من هذا العمل هو وصف اهم تقنيات البيولوجيا الجزيئية المطبقة على ميكروبيولوجيا الطبية و تحديدا على مستوى وحدة بيولوجيا الجزيئية في المخبر الجامعي للمنتشفى الجامعي حسين داي من أجل تقييم اهميتها و فائدتها في تشخيص الالتهابات البكتيرية و الفيروسية في الممارسة الشائعة.

## Abstract

The development of molecular biology's technics since 1990 allow to improve greatly the means of biologic diagnostic in a general way.

Their interest in the microbiological diagnosis has increased over the years, they allow to achieve fast results in emergency cas, to detect microorganisms hardly or not culturable by routine methods (intracellular bacteria, viruses) and allow even to follow the evolution of certain viral infection by mesuring viral load. Furthermore, most of techniques used today can be automated to quickly process a large number of samples.

The objective of this work is to describe the main molecular biology techniques applied in medical microbiology and more specifically at the molecular biology unit of the central laboratory of the Centre Universitaire Hospitalo HUSSEIN DEY in order to appreciate the importance and interest in the bacterial and viral infections diagnostic in ccurent practice.

Key words : Molecular Biology ; Amplification, *Bordetella pertussis*, *Enterovirus*, *Herpesviridae*.