



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

Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la
Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Microbiologie

قسم : الميكروبيولوجيا

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biologie moléculaire des microorganismes

Intitulé :

**Techniques isothermes d'amplification des acides nucléiques :
méthodes, techniques et applications**

Présenté et soutenu par : BELDEZZAR Amina

Le : 02/07/2018

BOUAICHA Sabrina

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mlle ABDELAZIZ Wided (Maitre-Assistante A- UFM Constantine)
Rapporteur : Monsieur HADDI M. Laid (Professeur - UFM Constantine)
Examineur : Mlle ARABET Dallel (Maitre de Conférence B - UFM Constantine)

**Année universitaire
2017 – 2018**

Remerciements

On exprime toute notre gratitude à Monsieur le professeur HADDI M. Laid pour l'effort fourni, les conseils prodigués, sa patience et sa persévérance dans le suivi et l'élaboration de ce travail avec la compétence, la rigueur scientifique et l'extrême gentillesse qui vous caractérisent. Que ce travail, si modeste qu'il soit, puisse être message de nos sentiments les plus respectueux et de toute notre reconnaissance.

On remercie très sincèrement, les membres Mlle ABDELAZIZ Wided et Mlle ARABET Dallel d'avoir bien voulu accepter de faire partie du jury.

On remercie tous nos enseignants du département de biologie, en particulier : Mademoiselle ARABET Dallel ; Melle GASMI Meriem ; Madame BOUZREYB Latifa ; Monsieur Henniche Kamel et oncle Abderezzak pour leurs efforts scientifiques consentis à notre égard. On tient à remercier aussi l'ensemble des ingénieurs du laboratoire 11 et le laboratoire de biochimie, en particulier : ZOGHMAR Samia, Nadia et Nabil. On remercie à l'occasion le personnel du tronc commun surtout ZAATAR Fares et MEDJROUBI Mohamed. On remercie aussi nos familles pour leur soutien et pour avoir permis d'en arriver là où on est. On remercie enfin tous ceux qui, d'une manière ou d'une autre, ont contribué à la réussite de ce travail et qui n'ont pas pu être cités ici.

Dédicace

À Allah

Tout puissant

Qui m'a inspiré, qui m'a guidé dans le bon chemin
Je vous dois ce que je suis devenue, Louanges et remerciements
Pour votre clémence et miséricorde

À Mon Père

Le grand militant, qui a toujours été un exemple pour ses enfants, qui m'a toujours poussé à me surpasser dans tout ce que j'entreprends, qui m'a transmis cette rage de vaincre et la faim de savoir.

Celui qui a été ma source de motivation, le moteur de mes ambitions, qui m'a appris que le savoir est une richesse que nul ne peut voler.

Je te serai cher papa reconnaissante toute ma vie, pour tout le mal que tu t'es donné pour moi à chaque étape de ma vie, pour ta patience et ton amour.

J'espère être la fille que tu as voulu que je sois, et je m'efforcerai d'être digne de ce que tu aurais souhaité que je sois. Ce titre de MASTER II en microbiologie je le porterai fièrement et je te le dédie tout particulièrement.

À Ma très chère Mère

Pour l'affection, la tendresse et l'amour que tu m'as toujours donné, pour le sacrifice et le dévouement dont tu as toujours fait preuve, pour l'encouragement sans limites que tu ne cesses de manifester.

Que ce modeste travail soit un début de mes récompenses envers toi.

Puisse le grand puissant te donner bonne santé et longue vie...

À mes adorables sœurs Malek et Manel.

À mon précieux seul et unique petit frère Mohamed el Mehdi et mon beau frère ATHMENI Morad.

À ma très chère tante Nadia et son mari tonton Kamel pour son aide

À ma grand-mère paternelle,

Tes bénédictions et prières m'ont toujours accompagnée pendant ces années. Puisse le bon Dieu te donne longue vie auprès de nous.

À toute la famille surtout tante Naouel; Wassila; mes cousins et cousines

À mes chères amies Bina, Fatima, Islam et Hadia.

À tous mes enseignants tout au long de mes études

À toute ma promotion 2014/2018

À tous ceux qui me sont chères.

À tous ceux qui m'aiment.

À tous ceux que j'aime.

Je dédie ce travail

BELDJEZZAR Amina

Dédicace

À Allah

Tout puissant

Qui m'a inspiré, qui m'a guidé dans le bon chemin

Je vous dois ce que je suis devenue, Louanges et remerciements

Pour votre clémence et miséricorde

A ma chère mère

A la plus douce des mamans, qui, depuis mes premiers pas, me donne confiance en moi et me pousse à aller de l'avant. Je te dédie ce travail qui grâce à toi a pu voir le jour. Puisse dieu tout puissant te protéger, te procurer longue vie, santé et bonheur afin que je puisse te rendre un minimum de ce que je te dois.

A mon père

La personne sur laquelle je peux compter, mon protecteur et mon exemple à suivre dans la vie.

À mon cher petit frère Sofiane, à Merabia Choubeila et à tous mes cousins et cousines.

A mes tantes Malika, Houria, Fatima, Nora et Hanifa qui m'ont toujours encouragé et soutenu.

A mes amies Amina, LAOUAR Hadia, KASSAI Lina et Romeissa.

À tous mes enseignants tout au long de mes études

A toute ma promotion 2013/2018

À tous ceux qui me sont chères.

À tous ceux qui m'aiment.

À tous ceux que j'aime.

Je dédie ce travail.

BOUAICHA Sabrina

Table de matière

Liste des abréviations.....	I
Liste des tableaux.....	II
Liste des figures.....	III
Introduction générale.....	IV
Chapitre I : Techniques d'amplification thermiques	
1- La réaction de polymérisation en chaîne (PCR).....	1
1.1- Introduction.....	1
1.2- Définition de la PCR.....	1
1.3- Principe de la PCR.....	2
1.4- Protocole de réalisation de la PCR.....	2
1.4.1 Préparation des échantillons.....	2
1.4.2 Techniques de lyse bactérienne.....	3
1.4.3 Techniques d'extraction.....	4
1.5- Les éléments réactionnels de la PCR.....	5
1.6- Notion de la température de fusion.....	9
1.7- Étapes de la PCR.....	10
1.8- Migration et révélation des produits PCR.....	12
1.9- Cinétique de la PCR.....	13
1.10- Applications de la PCR.....	14
1.11- Avantages et inconvénients de la PCR	14
2- Variantes de la PCR.....	15
2.1- PCR nichée.....	15
2.2- PCR multiplex.....	16
2.3- RT-PCR.....	17
Chapitre II : Les techniques isothermes	
1- Introduction.....	24
2- Principe.....	24
3- Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA).....	24
3.1- Définition de la NASBA.....	24
3.2- Principe de la NASBA.....	24
3.3- Éléments réactionnel de la NASBA.....	24
3.4- Étapes de la NASBA.....	25
3.5- Détection des produits NASBA.....	27
3.6- Applications de la technique NASBA.....	28
3.7- Avantages de la technique NASBA.....	29
3.8- Inconvénients de la technique NASBA.....	29
4- Transcription mediated amplification (TMA).....	30
4.1- Définition de la TMA.....	30
4.2- Principe de la TMA.....	30
4.3- Éléments réactionnel de la TMA.....	30
4.4- Étapes de la TMA.....	31
4.5- Détection des produits TMA.....	32
4.6- Applications de la technique TMA	34
4.7- Avantages de la technique TMA.....	34
5- Strand displacement amplification (SDA).....	34
5.1- Définition de la SDA.....	34
5.2- Principe de la SDA.....	34
5.3- Éléments réactionnels de la SDA.....	35

5.4-	Étapes de la SDA.....	35
5.5-	Détection des produits SDA.....	37
5.6-	Applications de la technique SDA.....	38
5.7-	Avantages de la technique SDA.....	38
6-	Loop mediated isothermal amplification (LAMP).....	38
6.1-	Définition de la LAMP.....	38
6.2-	Principe de la LAMP.....	39
6.3-	Éléments réactionnels de la LAMP.....	40
6.4-	Étapes de la LAMP.....	41
6.5-	Révélation des produits LAMP.....	43
6.6-	Applications de la technique LAMP.....	44
6.7-	Avantages de la technique LAMP	44
6.8-	Inconvénients de la technique LAMP.....	45
Chapitre III : comparaison entre les techniques d'amplification		
1-	Introduction.....	46
2-	paramètres de comparaison.....	47
2.1-	Spécificité.....	47
2.2-	Température d'amplification.....	47
2.3-	Nombre d'amorces et d'enzymes.....	47
2.4-	Détection des produits.....	48
2.5-	Agent dénaturant.....	48
2.6-	Tolérance aux inhibiteurs.....	48
2.7-	Le coût.....	50
2.8-	Applications.....	51
2.9-	Législation et déontologie.....	52
Conclusion.....		VI
Annexe.....		VII
Liste des références.....		VIII
Résumé.....		IX

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

AN : acide nucléique

ARN : acide ribonucléique

AG : gel d'agarose

AMV-RT : Avian Myeloblastosis Retrotranscriptase

BET : Bromure d'Ethydium

Bst : Bacillus stearo thermophilus

CE: Conformité Européenne

DMSO : Di Méthyle Sulfoxyde

dNTP : Deoxyribonucleotide triphosphate

ELISA : Enzyme linked immuno sorbent assay

ECL : Electrochimiluminescence

FDA : Food and Drug Administration

HPA : Hybridization Protect Assay

LAMP : Loop-mediated isothermal amplification

M -M LV-RT : Moloney murine leukemia virus Reverse Transcriptase

NAT : Test d'acide nucléique

NASBA: Nucleic acid sequence based amplification

NEC : NASBA Enzyme Cocktail

OMS: Organisation mondiale de la santé

Pb : Paire de base

pH : Potentiel d'Hydrogène

rpm : rounds per minute

SDA : Strand Displacement Amplification

SRAS : Severe acute respirotary syndrome

Taq : Thermus aquaticus

TMA: transcription mediated amplification

TBE : Tris Borate EDTA

Tm : melting temperature

UV : Ultra-violet

3SR : Self sustained sequence replication

Liste des tableaux

Tableau 01. Principales découvertes et expériences en biologie moléculaire.

Tableau 02. Extraction automatique des AN à partir des bactéries [6].

Tableau 03. Caractéristiques de certaines ADN polymérase utilisées pour la PCR [10].

Tableau 04. Principales propriétés de diverses techniques d'amplification isothermes et PCR [30].

Tableau 05. Exemple de fabricants et de produits disponible dans le commerce utilisant la technologie d'amplification d'acides nucléique isothermes [30].

Tableau 06. Tarifs hors taxes en euros des analyses effectuées au niveau des laboratoires de biologie moléculaire applicable en octobre 2014.

Liste des figures

Figure 01 : recherche du mot clé « PCR » sur PubMed à la date du 18 mars 2018

Figure 02 : Principales étapes d'analyse d'un échantillon par PCR [6].

Figure 03 : structure et composition de la molécule d'ADN [8].

Figure 04 : structure et composition de la molécule d'ARN [9].

Figure 05 : Température de fusion moléculaire d'un fragment d'ADN [14].

Figure 06 : Les étapes de la PCR classique

Figure 07 : Bandes d'une migration électrophorétique sur gel d'agarose vu au cours d'un atelier de biologie moléculaire d'une partie de l'ADN d'*Arabidopsis thaliana* le 23/04/2018.

Figure 08 : le suivi en temps réel d'une réaction PCR [15].

Figure 09 : Principe de la PCR Nichée (Nested PCR) [11].

Figure 10 : PCR multiplex [16].

Figure 11 : Principe de la RT-PCR [11].

Figure 12 : Présentation schématique du principe de la (NASBA) [26] [29].

Figure 13 : Principe d'une sonde molecular beacon [29].

Figure 14 : Présentation schématique du principe de la technique transcription mediated amplification (TMA) [37].

Figure 15 : Présentation schématique du principe de la technique Strand displacement amplification (SDA) [35].

Figure 16 : Schéma montrant la position des amorces de l'ADN cible [39].

Figure 17 : Les différentes étapes d'amplification de l'ADN par la méthode LAMP [39].

Introduction générale

La biologie est une science purement expérimentale, elle a connu un énorme progrès grâce à l'élaboration et la création de nouveaux outils performants dont le génie génétique ou la technologie de l'ADN recombinant [1].

Parler de génie génétique fait référence à la biologie moléculaire, cette branche que les scientifiques ont des difficultés à lui donner une définition exacte, or il n'existe pas une mais plusieurs. Une comme étant l'étude à l'échelle moléculaire des organismes vivants, qui inclue la biochimie et la chimie physiologique, et une autre, identifiant la biologie moléculaire à la génétique, comme l'étude de la structure des gènes et de leur fonctionnement au niveau moléculaire. De ce fait, la biologie moléculaire inclue les 2 branches : la génétique et la biochimie [2].

D'ailleurs, ce n'est pas le manque d'innovation ou d'imagination qui empêchaient les chercheurs des années 1960 d'atteindre leurs objectifs en ce qui concerne l'étude des gènes, mais l'impossibilité d'isoler en quantité suffisante un gène cellulaire et de déterminer sa séquence nucléotidique [1].

En effet, un bon résultat dépend de la quantité de l'ADN ou de l'ARN à analyser qui est de l'ordre de 10^5 à 10^6 molécules pour chaque test [3].

Parmi les techniques de la biologie moléculaire, les plus utilisées sont l'hybridation moléculaire sur filtre (le Southern blot), le clonage d'ADN et son séquençage. Et pour avoir un nombre considérable de copies d'ADN, les chercheurs se tournaient vers le clonage moléculaire. Néanmoins, en plus des risques de contaminations, sa réalisation est lourde et lente, ce qui présentait un réel problème lors des diagnostics nécessitant des résultats rapides [1].

C'est le besoin d'avoir des résultats fiables et plus rapides surtout en médecine qui a poussé les scientifiques à développer d'autres méthodes et à utiliser de nouvelles technologies d'amplification des acides nucléiques afin de réaliser les différentes analyses avec plus de précision et en quantités suffisantes, et c'est là que le monde scientifique a connu la naissance d'un type de clonage acellulaire: la PCR ou la réaction de polymérisation en chaîne [4].

Cette nouvelle approche inventée en 1985 permet d'obtenir rapidement et facilement un grand nombre de copies d'ADN nécessaires à l'étude, et aujourd'hui, elle est devenue la méthode clé sur laquelle repose la majorité des tests en biologie moléculaire.

Malgré les avantages que procure la PCR, d'autres techniques dérivées sont mises au point afin de contourner les problèmes posés par cette dernière, améliorer les résultats et donner plus de précision et fiabilité aux analyses de l'ADN et même de l'ARN. En plus de la PCR classique, on trouve quelques variantes telles que la PCR nichée, la PCR multiplex, la RT-PCR, et aussi des techniques récentes qui sont les méthodes d'amplification isothermes qui sont venues pour élargir le champ de l'amplification. C'est méthodes sont la Nucleic acid sequence based amplification (NASBA), la Strand Displacement Amplification (SDA), la Transcription Mediated Amplification (TMA) et la Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP).

C'est dans ce but que nous nous sommes données comme objectif au cours de ce mémoire de décrire ces différentes techniques, de donner leurs caractéristiques et de les comparer.

L'évolution des techniques utilisées dans les laboratoires est passée par de nombreuses étapes au cours de plusieurs années de recherches, de découvertes et d'expériences.

Tableau 01. Principales découvertes et expériences en biologie moléculaire.

Année	Découvertes et expériences
1953	La découverte de la double hélice de l'ADN par James Watson et Francis Crick
1956	La découverte de l'ARN par Severo Ochoa La découverte de l'ADN polymérase par Arthur Komboy
1960	La découverte de l'ARN messenger par Monod
1970	La découverte de l'ADN polymérase ARN dépendante par Temin HM et Baltimore
1972	Le début du génie génétique grâce à la recombinaison de l'ADN in vitro par Jackson et al.
1973	La première réalisation de l'électrophorèse de l'ADN sur gel d'agarose
1974	La réalisation d'un clonage d'ADN
1977	Le séquençage de l'ADN par Sanger
1983	La première amplification spécifique de l'ADN PCR par Kary Mullis
1986	La première publication sur la PCR par K. Mullis
1988	La réalisation de la première PCR avec une ADN polymérase thermostable la Taq-polymérase par Saiki R.K.
1991	Le développement des méthodes d'amplification isotherme

Chapitre I

Techniques d'amplification thermiques

1- La réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

1.1- Introduction

La PCR est une technique qui a révolutionné la biologie moléculaire et qui a pris rapidement sa place dans les laboratoires. Son énorme succès apparaît par le nombre d'articles publiés sur le site PubMed (**figure 01**) : 438134 articles depuis sa découverte (pubMed, mars 2018) ce qui donne une idée assez claire de l'importance de celle-ci dans le monde scientifique.

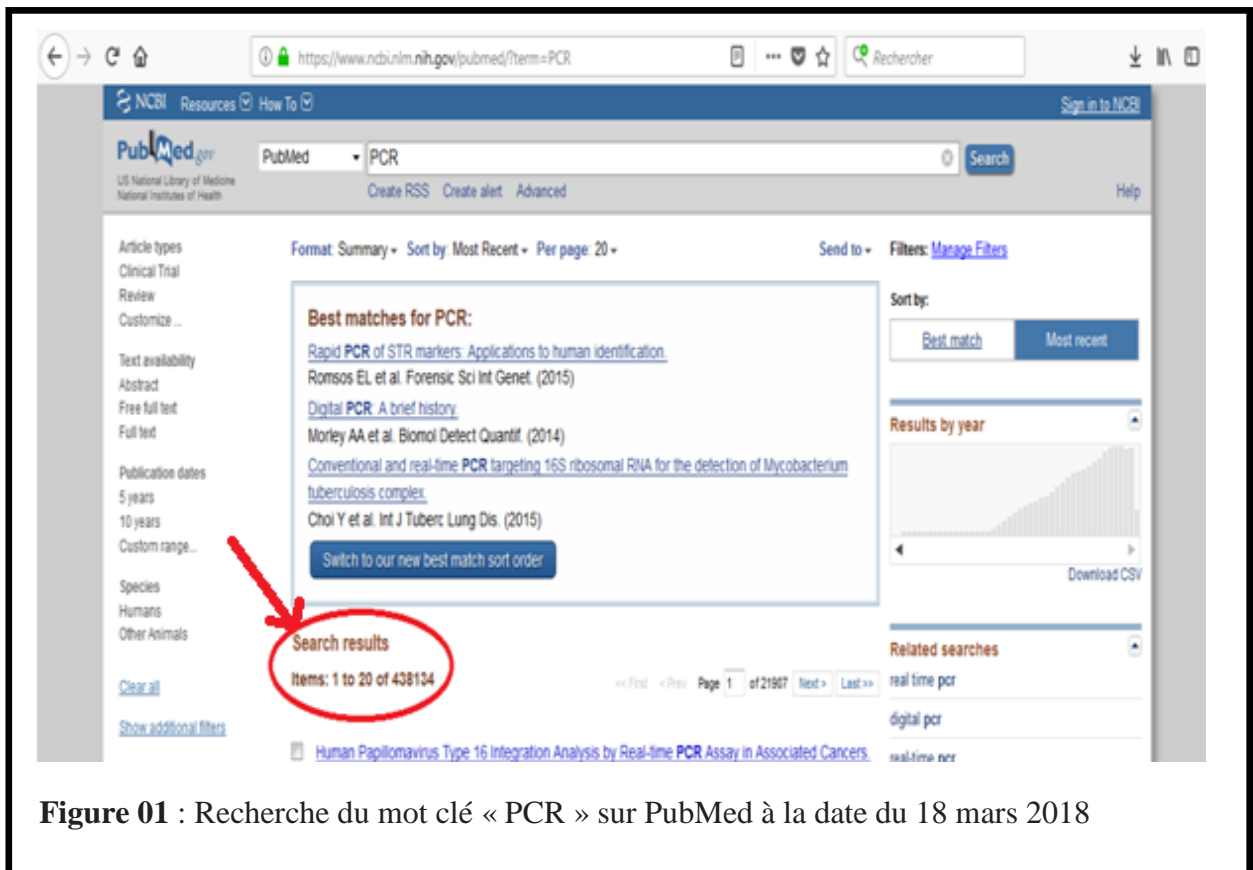


Figure 01 : Recherche du mot clé « PCR » sur PubMed à la date du 18 mars 2018

Dans cette partie nous allons nous intéresser tout d'abord à la PCR, à son principe, à ses avantages et inconvénients, à son protocole de réalisation et l'instrumentation utilisée.

1.2- Définition de la PCR

La PCR est une technique qui permet la réplique moléculaire des séquences d'acides nucléiques ciblées de façon exponentielle et in vitro. Inventée par K. Mullis en 1985 (Prix Nobel en 1993), la technique connaît une diffusion rapide grâce à la commercialisation d'une ADN polymérase résistante aux températures élevées (la Taq-polymérase) vers 1988, qui permet une automatisation de la technique car auparavant, la

polymérase devait être rajoutée à chaque cycle sinon elle sera détruite lors de l'étape de dénaturation de l'ADN [6].

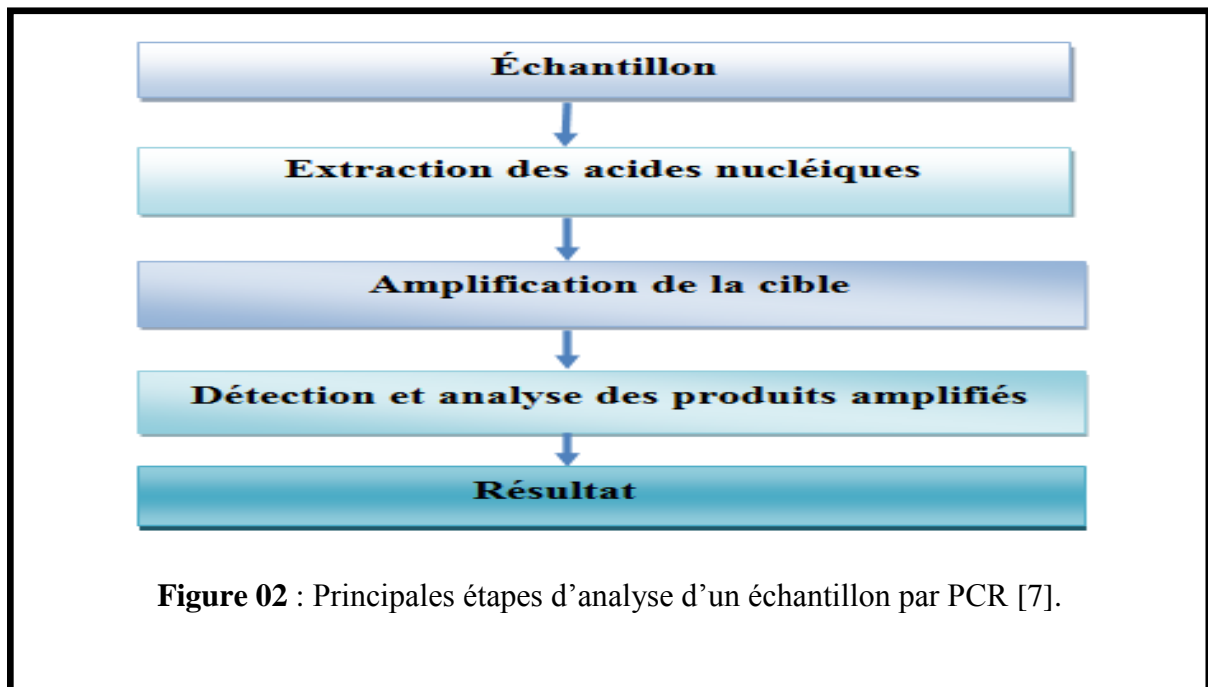
1.3- Principe de la PCR

Le principe consiste à amplifier un fragment d'ADN ou d'ARN servant de matrice, obtenu après extraction à partir de prélèvements de nature diverses (sang, biopsies, liquide céphalo-rachidien...), délimité par des amorces spécifiques (ou primer). Celles-ci sont constituées d'un segment d'environ 20 paires de bases. Leur association à l'ADN cible est suivie d'une élongation par la Taq-polymérase, aboutissant à la synthèse d'un ADN double brin de longueur habituelle d'environ 1000 pb.

Cette amplification est répétée un certain nombre de fois afin d'obtenir une quantité d'ADN suffisante pour être détectée et analysée [6].

1.4- Protocole de réalisation de la PCR

De manière générale, avant l'analyse des acides nucléiques ces derniers doivent être extraits, puis amplifiés. Nous allons donc brièvement rappeler les principales étapes d'analyse d'un échantillon par PCR (**figure 02**).



1.4.1- Préparation des échantillons

D'abord, avant toute analyse, les acides nucléiques de diverses sources doivent être extraits et purifiés. Leur extraction se fait généralement de manière simple mais avec précaution pour éviter leur destruction par des inhibiteurs, des enzymes de restriction ou par la lyse mécanique lors de la lyse cellulaire.

Le volume et la concentration de l'échantillon jouent un rôle important selon la sensibilité de la technique utilisée ainsi que le nombre d'acides nucléiques s'il est connu.

Les sources à partir desquelles on peut prélever un échantillon sont nombreuses telles que prélèvements sanguins, urines, liquide céphalo-rachidien (LCR), selles, prélèvements respiratoires, biopsies, pus, abcès, ulcères...etc. Ces sources peuvent contenir des ADN polymérase [7].

1.4.2- Techniques de lyse bactérienne

Lors de cette étape de lyse cellulaire, il faut prendre en considération la nature de la bactérie (les mycobactéries et certaines bactéries Gram positif sont plus résistantes que les bactéries Gram négatif et donc nécessitent des techniques spécifiques) et la nature de l'acide nucléique cible (ADN ou ARN).

Pour cela, il faut employer des techniques d'extraction adaptées aux acides nucléiques afin d'éviter les réactions non spécifiques entre ces derniers surtout lors de la lyse mécanique, car elle provoque la formation d'ADN simple brin susceptible de s'hybrider de manière non spécifique dans des conditions de basse température [7].

Il existe différentes méthodes de lyse cellulaire :

a) Méthodes physiques

Majoritairement, c'est le choc thermique qui est utilisé. D'autres techniques existent comme les ultra-sons, les billes de verre ; le broyage en gel d'alumine, four à micro-ondes mais leur utilisation reste limitée.

b) Méthodes chimiques

Ces méthodes utilisent la lyse alcaline, elles visent à lyser des bactéries résistantes. Elle repose sur l'utilisation de la soude à basse molarité à des températures élevées.

c) Méthodes enzymatiques

Ces méthodes reposent sur l'utilisation de plusieurs enzymes telles que la protéinase k, le lysozyme, l'achromopeptidase, la pronase et la lysostaphine.

d) Méthodes utilisant les tensioactifs

Les tensio-actifs les plus utilisés sont le sodium-dodécyl-sulfate (SDS) à 0,5%, le Tween 20 et le Nonidet P40, ils servent à déstabiliser les édifices lipido-protéiques des enveloppes bactériennes et à sensibiliser les cellules aux traitements lytiques.

1.4.3- Techniques d'extraction

L'extraction des acides nucléiques est une étape primordiale pour pratiquer un test en biologie moléculaire ; leur nature, qualité et volume doivent être compatibles avec l'analyse désirée car la sensibilité de la méthode en dépend.

Cette sensibilité est l'élément majeur permettant la détection des acides nucléiques de faible concentration dans un échantillon surtout en bactériologie et en virologie. Cependant, elle peut être limitée à cause de certains facteurs particulièrement les inhibiteurs d'enzymes (inhibiteurs de la Taq-polymérase) et les nucléases (pouvant dégrader les AN surtout l'ARN qui est plus sensible) [7].

Deux méthodes d'extraction sont employées :

a- Méthodes manuelles

L'extraction de l'ADN est une technique permettant l'isolement de l'ADN à partir d'une cellule en qualité et en quantité suffisante afin de pouvoir l'analyser.

Classiquement l'extraction de l'ADN se déroule en 3 principales étapes :

- Lyse cellulaire afin de libérer l'ADN
- Élimination des protéines et peptides
- Précipitation de l'ADN et purification

La méthode manuelle la plus utilisée en laboratoire est celle au phénol-chloroforme, avec ou sans digestion par la protéinase K, et l'alcool pour la précipitation. Ces méthodes posent quelques problèmes en pratique car elles sont lentes, leur manipulation est plutôt difficile et présentent des risques élevés de contamination (suite au nombre de manipulation sur l'échantillon) ainsi que des risques sur la santé humaine causés par des réactifs dangereux employés lors de l'extraction comme le phénol-chloroforme.

Concernant l'ARN, les protocoles d'extraction manuels sont plus difficiles à réaliser et c'est pour cela qu'ils sont remplacés par des méthodes automatisées avec des kits commerciaux.

Les méthodes les plus utilisées aux laboratoires sont [7] :

- i) L'extraction au guanidinium-thiocyanate-phénol-chloroforme
- ii) L'extraction alcaline
- iii) L'extraction à l'ethidium(EtBr)-Césium chloride (CsCl)
- iv) La Purification du Poly (A) plus l'ARN par chromatographie à l'Oligp (dt)-cellulose

b- Méthodes automatisées

Ces méthodes sont plus simples et plus rapides que les méthodes manuelles et nécessitent des kits commerciaux. Contrairement aux méthodes classiques, elles permettent de gagner du temps, d'éviter la contamination lié à la pratique et l'emploi des réactifs toxiques dangereux. Malgré cela, les plateformes d'extraction automatisées peuvent rencontrer quelques problèmes notamment la contamination par les aérosols, la robotique défectueuse, les erreurs robotiques (problèmes mécaniques), ces derniers peuvent être évités grâce aux conditions fermées dans lesquelles se déroulent les manipulations [7].

Sur le tableau 02 figurent quelques exemples d'automates d'extraction des acides nucléiques à partir des bactéries :

Tableau 02. Extraction automatique des acides nucléiques à partir des bactéries [7].

Fabricant	Appareil	Modèle	Méthode de capture	Nombre maximum des échantillons	Délai du travail pour le maximum d'échantillons	Coût approximatif en Dollar américain
Applied biosystems	ABI Prism	6100	Silice/filtration	96	0,5 h	150.000
		6700	Silice/filtration	96	1,5 h	154.500
Autogen	AutoGenPrep	245	Centrifugation	24	3,5 h	---
		965	Centrifugation	384	4-6 h	---
		3000	Centrifugation	40	5 h	---
Biomérieux	NucliSens	Extractor	Silice/filtration	10	45 min	80.000
		Mini-Mag	Silice/magnétique	12	< 1 h	12.000
Qiagen	BioRobot	EZ-1	Silice/magnétique	6	0,33 h	29.000
		M48	Silice/magnétique	48	3,5 h	73.450
		M96	Silice/magnétique	96	3,5 h	93.150
		MDx	Silice/filtration	96	2,5 h-4 h	170.000
		9604	Silice/filtration	96	2 h	70.000
Roche	MagNA Pure	LC	Billes en verre magnétiques	32	1,5 h	84.500
		Compact	Billes en verre magnétiques	8	35 min	35.000

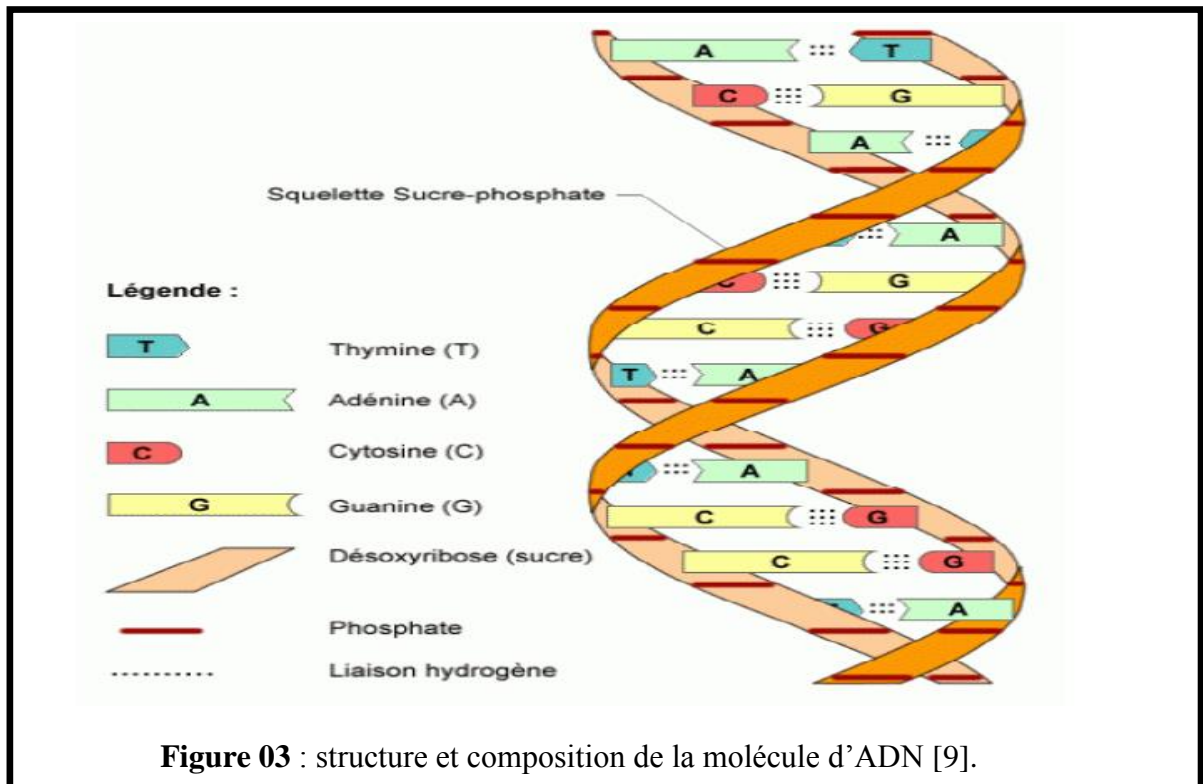
1.5- Les éléments réactionnels de la PCR

a) Les acides nucléiques

○ L'ADN : l'acide désoxyribonucléique

L'ADN, appelé également le support de l'information génétique, est présent dans chaque cellule vivante. Sa structure restait une énigme jusqu'à sa découverte par Rosalind Franklin. Elle est publiée par Watson et Crick en 1953.

La molécule d'ADN est composée de deux brins, chacun présente une succession de nucléotides, et chaque nucléotide est formé de l'association d'un sucre (le désoxyribose), d'un acide (l'acide phosphorique) et d'une base azotée : adénine, thymine, cytosine ou guanine. L'association des deux brins se fait grâce à la présence de liaisons hydrogènes formée entre les bases (deux liaisons entre « A » et « T » et trois liaisons entre « G » et « C ») en position antiparallèle d'où sa forme hélicoïdale. Il est important de préciser que l'ordre de succession est spécifique à chaque organisme [8].



○ L'ARN : l'acide ribonucléique

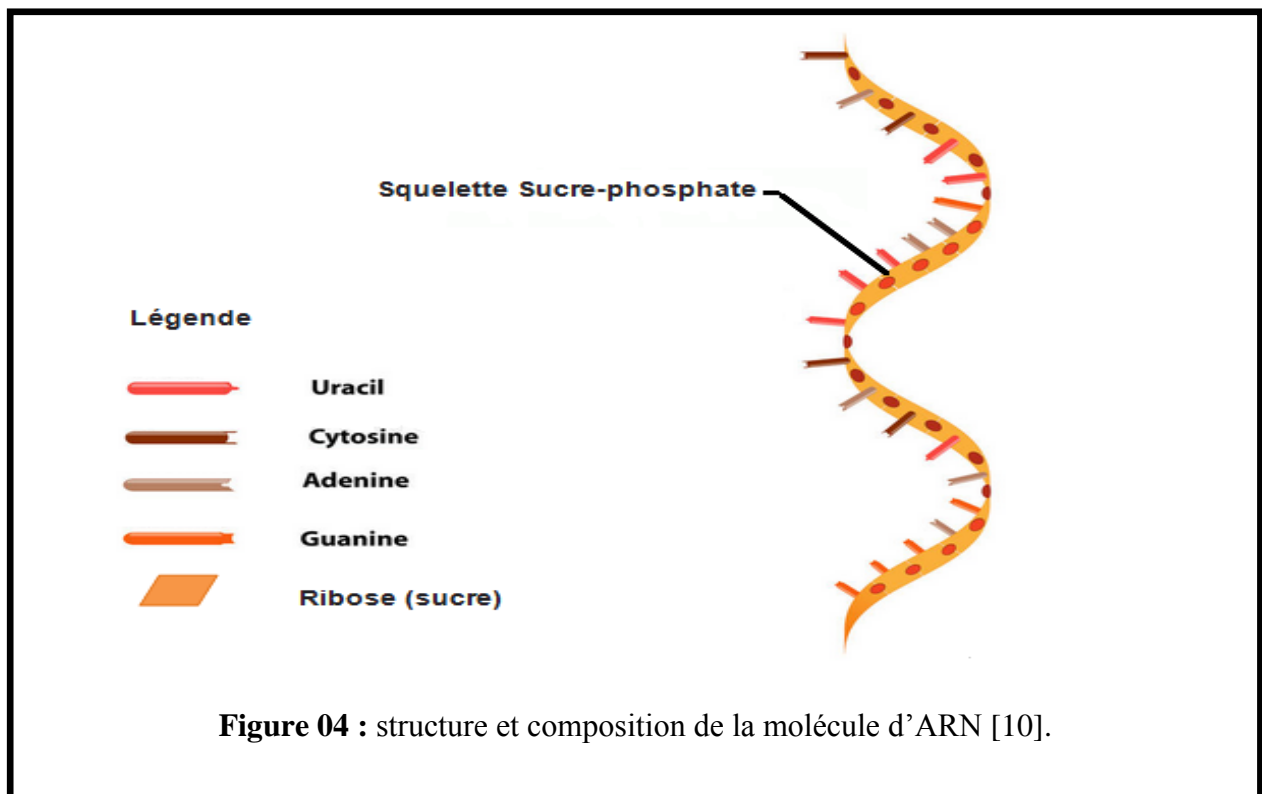
L'acide ribonucléique est, le plus souvent, formé d'un simple brin (à l'exception de quelques virus) constitué d'une succession de nucléotides. En le comparant à l'ADN, la

différence réside au niveau du sucre qui est remplacé par le ribose et d'une base azotée : l'uracile à la place de la thymine [7].

Il existe trois types d'acide ribonucléique :

- Les ARNr (ARN ribosomiaux) : responsables de la synthèse des protéines
- Les ARNt (ARN de transfert) : responsables du transfert des acides aminés lors de la synthèse des polypeptides
- Les ARNm (ARN messagers) : sont traduits en protéines au niveau des ribosomes selon un code génétique. Comme leur nom l'indique, ils permettent le passage de l'information génétique se trouvant dans l'ADN aux protéines telles qu'elles

Ces derniers sont les plus étudiés en raison de leur implication directe dans l'étude des gènes.



b) Les amorces : sens et anti sens

Appelés aussi primers, ce sont des oligonucléotides de synthèse composés de 17 à 30 paires de base, s'hybrident aux brins d'ADN cibles par complémentarité [11] [12].

Les amorces doivent répondre à certaines conditions :

- Le coefficient de Chargaff doit être égal à 50%

- Ne doivent pas contenir de suites de séquences de poly bases ou de motifs répétitifs (afin d'éviter l'hybridation non spécifique avec la matrice)
- Ne doivent pas s'hybrider entre elles-mêmes (auto-hybridation) et entre elles (les dimer d'amorce)
- Ne doivent pas contenir des séquences inversées répétées (empêcher la formation de structures secondaires dans l'amorce « structure en épingle à cheveu »)
- Les températures de fusion des amorces doivent être voisines et de préférences élevées (éviter le risque d'hybridation non spécifiques)
- Les amorces sont utilisées à une concentration de 1 μ M (une concentration plus élevée entraîne l'amplification de séquences non cibles, et une concentration trop faible donne un résultat insignifiant)
- Ne doivent pas former de structures secondaires

c) Les déoxyNucléotides triphosphates (dNTPs)

Les quatre déoxyNucléotides triphosphates : les déoxyguanosines triphosphates, les déoxyadénosines triphosphate, les déoxythymidines triphosphates et les déoxycytidines triphosphates, seront assemblés par la Taq-polymérase et formeront le brin d'ADN complémentaire [12].

d) Le Magnésium

Les ions Mg⁺⁺ se trouvent souvent dans une solution de MgCl₂, ce sont des cofacteurs de l'enzyme. Ils permettent son bon fonctionnement et l'incorporation des précurseurs pendant la polymérisation [12].

La concentration en MgCl₂ dans le mélange réactionnel doit être précise et comprise généralement entre 0.5 et 5 mM, et la concentration optimale est déterminée empiriquement.

e) L'ADN polymérase et ses inhibiteurs

La Taq-polymérase est une enzyme qui a été isolée à partir d'une bactérie : *Thermus aquaticus*, qui vit dans une source thermale dans le parc national Yellowstone aux États Unis. C'est une ADN polymérase, ADN dépendante possédant une activité exonucléase (5'-3') mais sans activité correctrice 3'-5' (moins fidèle que l'ADN polymérase I).

La propriété thermorésistante que possède cette enzyme est le secret de sa large utilisation dans les applications de la PCR, et lui permet d'assurer l'élongation du brin complémentaire à une température optimale comprise entre 70°et 75°C [12].

La Taq-polymérase peut être inhibée par plusieurs substances telles que : l'hème, l'héparine, le SDS (sodium dodécyl sulfate), le phénol, les polyamines, le DMSO, les DNAses [13].

Plusieurs autres ADN polymérases sont commercialisées. Le Tableau 1 indique les propriétés de certains ADN polymérases thermostables actuellement utilisées dans la PCR.

Tableau 3. Caractéristiques de certaines ADN polymérases utilisées pour la PCR [11]

	Taq/ AmpliTaq®	Vent™	Deep- Vent™	Pfu	Tth	UITma™
Source	<i>Thermus aquaticus</i>	<i>Thermococcus litoralis</i>	<i>Pyrococcus GB-D</i>	<i>Pyrococcus Furiosus</i>	<i>Thermus thermophilus</i>	<i>Thermotoga maritima</i>
Application	Taq: AmpliTaq naturelle: pour génie génétique	Pour génie génétique	Pour génie génétique	Naturelle	Pour génie génétique	Pour génie génétique
T_{1/2} d'activité à 95 °C (mn)	40	1380	400	>120	20	>50 ^a
Activité exonucléase 5'→3'	Oui	Non	Non	Non	Oui	Non
Activité exonucléase 3'→5'	Non	Oui	Oui	Oui	Non	Oui
Processivité	50-60	?	7	?	30-40	?
Vitesse d'extension (nt/s)	75	?	>80	60	>33	?
Extrémités d'ADN résultantes	3'A	>95 % franches	>95 % franches	?	3'A	franches
PM en kDa	94	?	?	92	94	70

1.6- Notion de température de fusion ou Tm

Lorsqu'un ADN double brin subit un chauffage au-delà d'une certaine température, les deux brins d'ADN se séparent par rupture des liaisons hydrogènes. L'ADN devient simple brin. La valeur de la température correspondant à ce phénomène s'appelle la température de fusion ou Tm (melting temperature). En pratique, le Tm correspond à la température de dissociation de 50 % de l'ADN en solution (c'est-à-dire 50 % de l'ADN est sous forme simple brin et 50 % de l'ADN sous forme double brin). Ce Tm dépend de plusieurs facteurs [14] :

- La composition en bases de l'ADN analysé : Les appariements AT (deux liaisons hydrogènes) sont moins stables que les appariements GC (trois liaisons hydrogène) en milieu salin (NaCl)
- La composition en sels du milieu : Une diminution de la concentration en sels du milieu diminue la force ionique et par conséquent diminue le T_m et inversement. Par convention, on parle de solution stringente quand la concentration en sels est faible (le T_m diminue alors)
- Le nombre de mésappariements (ou mismatches) : On considère qu'il y a une diminution du T_m de 1°C pour 1 % de mismatch dans l'ADN
- La longueur du fragment d'ADN : Cet effet est minime quand la taille des fragments hybridés est supérieure à 500 pb
- La présence d'agents "déstabilisants" (par exemple la formamide et l'urée)

Le T_m est calculé par des logiciels informatiques (bioinformatique) ou approché par une formule plus pratique : 2°C par base nucléotidique A ou T + 4°C par base G ou C [14].

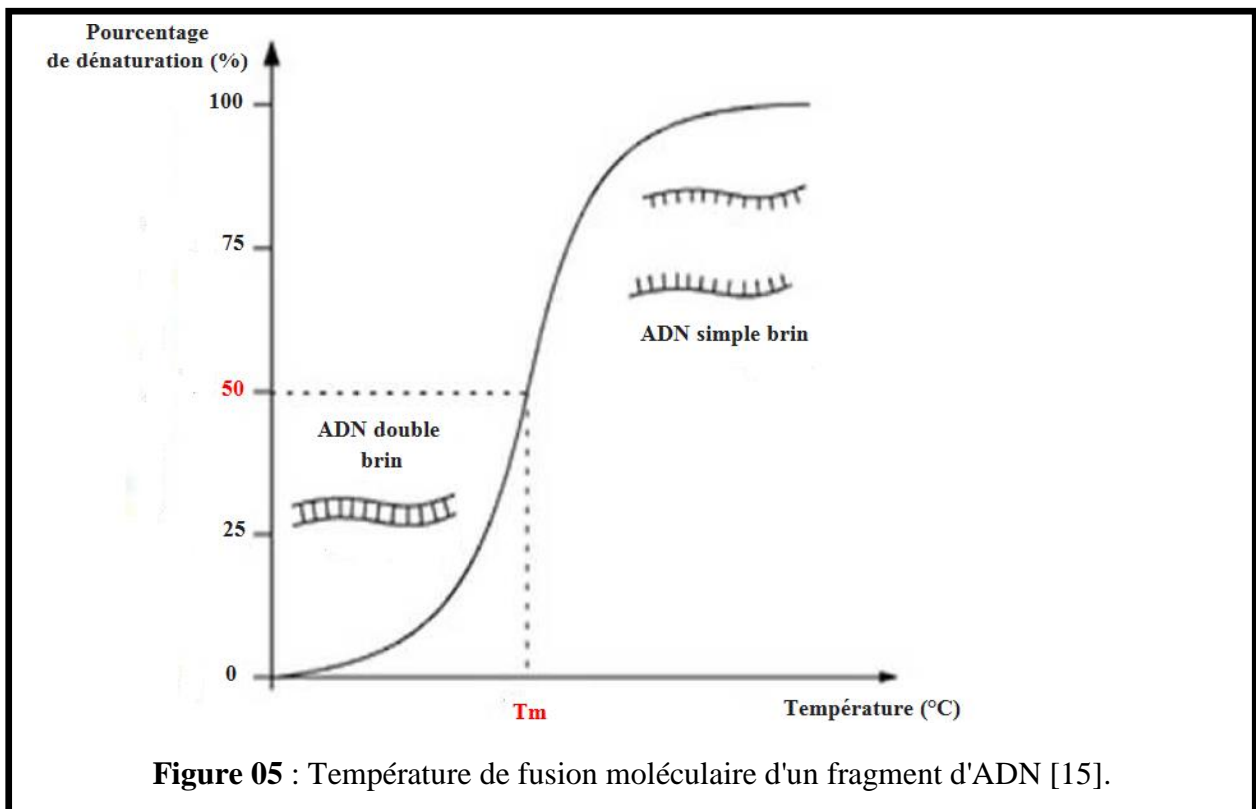


Figure 05 : Température de fusion moléculaire d'un fragment d'ADN [15].

1.7- Les étapes de la PCR

La réaction de PCR se déroule selon trois principales étapes cycliques :

a) La dénaturation

La première étape s'effectue à une température élevée de 94°C, dite température de dénaturation. À cette température, l'ADN qui sert de matrice au cours de la réplication est dénaturé : les liaisons hydrogènes reliant les 2 brins sont rompues par la chaleur, et de ce fait l'ADN double-brin devient un ADN simple-brin (ADN monocaténaire). Chacun servira de matrice pour l'amplification [8].

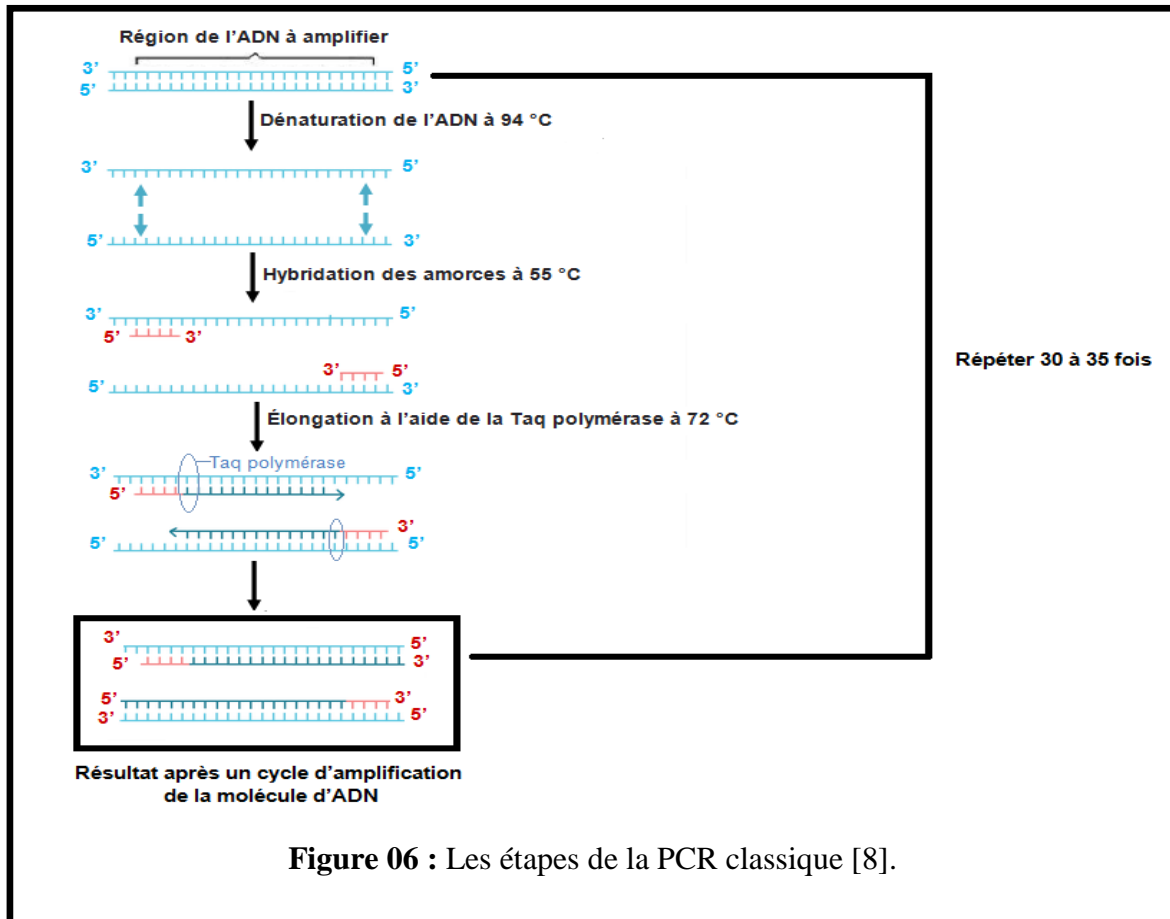
b) L'hybridation des amorces

La deuxième étape s'effectue à une température généralement comprise entre 50 °C et 65°C, dite température d'hybridation des amorces. Pendant cette étape la température est diminuée ce qui permet la formation des liaisons hydrogènes entre la matrice et les amorces complémentaires. Plus la température d'hybridation est élevée, plus l'hybridation est sélective, et plus elle est spécifique [8].

c) L'élongation

La troisième étape s'effectue à une température de 72°C, dite température d'élongation ou d'extension. La Taq-polymérase (ou autres) incorpore les désoxynucléotides complémentaires du brin d'ADN cible à partir de l'extrémité 3'OH dans le sens 5'-3' [8].
A la fin de ce cycle, 2 copies de l'ADN cible sont obtenues.

A la fin du premier cycle, un deuxième cycle thermique comprenant les mêmes étapes est effectué, puis un troisième... etc. jusqu'au dernier cycle. Le nombre de cycles varie suivant la cible que l'on amplifie et le protocole choisi. En moyenne, 30 à 35 cycles sont effectués au cours d'une PCR classique [8].



1.8- Migration et révélation des produits PCR

Lorsque la quantité des produits d'amplification est suffisante, ceux-ci sont soumis à une électrophorèse en gel d'agarose, ce gel forme des mailles au sein desquelles les acides nucléiques sont piégés. À pH=7, leur migration se fait vers l'anode. En parallèle des fragments étudiés, on fait migrer un marqueur de poids moléculaire contenant des fragments de taille connue.

Pour visualiser le front de migration, le produit amplifié est mélangé à un colorant, le bleu de bromophénol qui présente également l'avantage d'alourdir l'échantillon afin qu'il sédimente au fond des puits de dépôt creusés dans le gel.

La visualisation des acides nucléiques se fait après addition de bromure d'éthidium (BET), agent intercalant qui se glisse entre les bases des acides nucléiques (à manier avec précaution car cancérigène). Le BET contenu dans le gel, quand il est intercalé entre ces bases, va émettre une fluorescence orangée sous lumière ultraviolette de longueur d'onde de 312 nm [14].

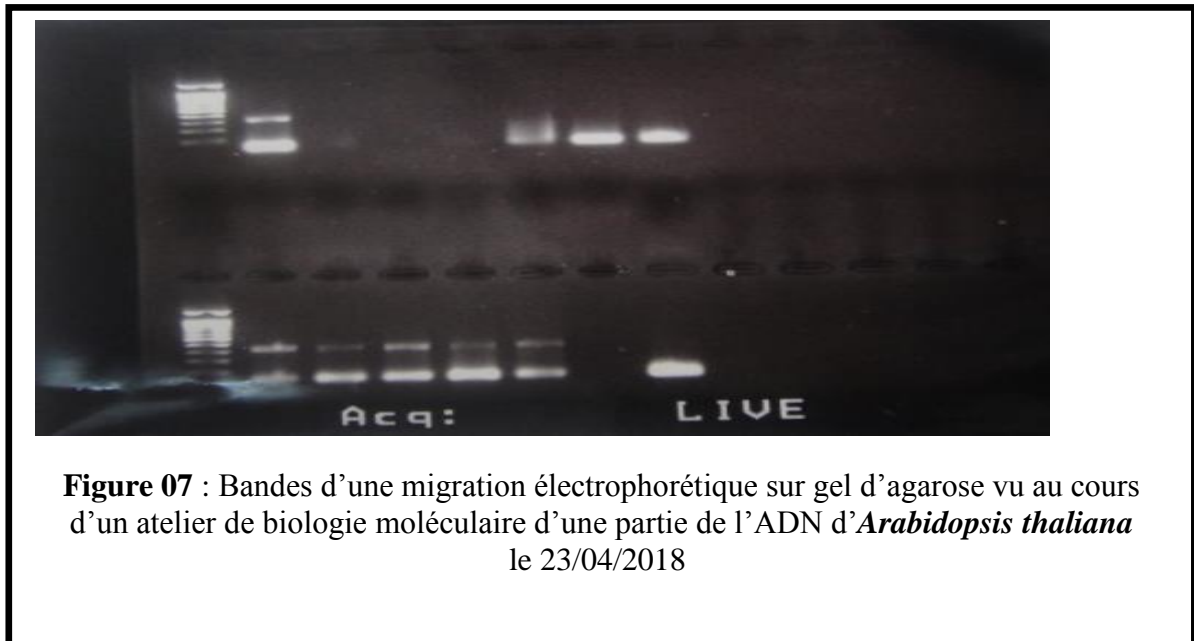


Figure 07 : Bandes d'une migration électrophorétique sur gel d'agarose vu au cours d'un atelier de biologie moléculaire d'une partie de l'ADN d'*Arabidopsis thaliana* le 23/04/2018

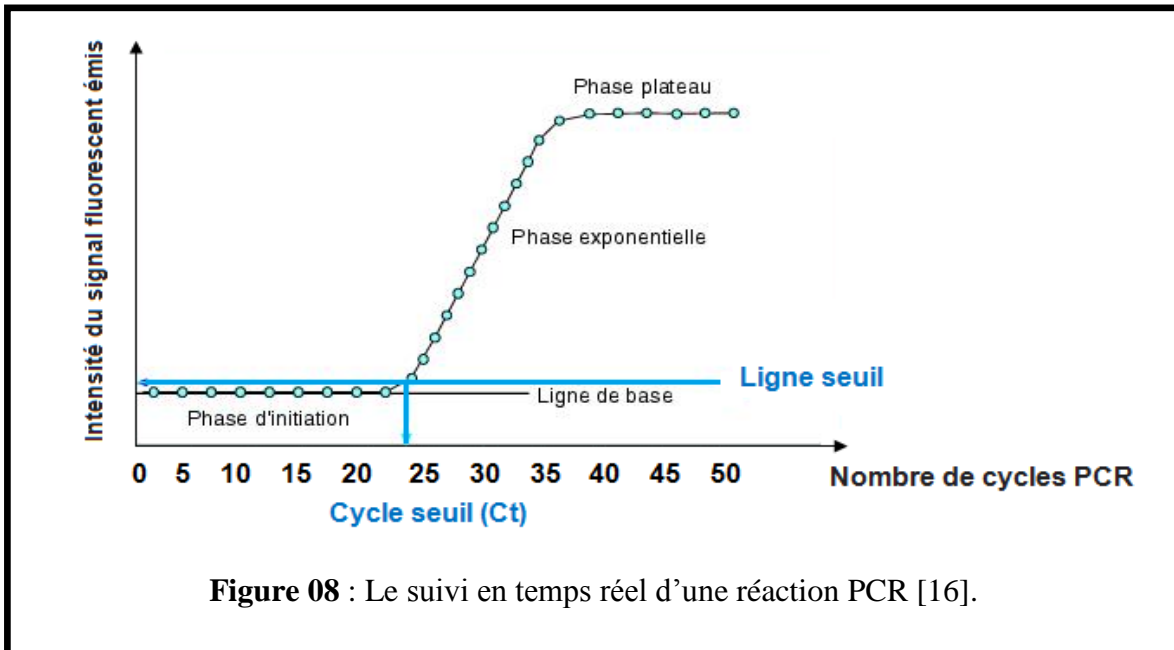
Un gel peut aussi être visualisé après coloration au nitrate d'argent ou à l'acridine orange ou après ajout de SYBR Green®, agent intercalant plus sensible que le BET. Ce colorant donnera une fluorescence vert-pomme. L'empreinte de la migration est ensuite obtenue par autoradiographie (fluorescence) [14].

1.9- Cinétique de la PCR

L'évolution de cette amplification peut être représentée par une courbe dont l'allure est sigmoïde [12].

Cette courbe peut être divisée en trois phases (**figure 08**) :

- Phase d'initiation
- Phase exponentielle : cette deuxième phase correspondant à une amplification exponentielle qui est modélisable
- Phase de plateau : elle correspond à un ralentissement de l'amplification qui peut être dû à l'épuisement des différents réactifs de la PCR comme les amorces



Plusieurs raisons expliquent l'existence de cet "effet plateau" [12] :

- L'épuisement des substrats (amorces, désoxyribonucléotides [dNTPs])
- L'apparition des sous-produits de réaction ayant un pouvoir d'inhibition (pyrophosphate)
- L'inactivation thermique progressive de l'ADN polymérase
- La réhybridation des produits formés gênant l'accès des différents réactifs aux séquences cibles
- La formation de dimères d'amorces
- La compétition entre les amorces et les fragments d'ADN amplifié qui peuvent s'hybrider entre eux plutôt qu'avec les amorces

1.10- Applications de la PCR

Les applications de la PCR sont nombreuses et sont citées dans les références [7] et [9] :

- a) En biologie cellulaire et moléculaire, la PCR est utilisée dans :
 - L'isolement et la purification des gènes
 - L'identification des espèces animales et végétales
 - L'identification des microorganismes dans des tests de qualités alimentaires

- Le clonage moléculaire
 - Les tests de paternité
 - L'identification des informations génétiques d'une personne (en criminologie par exemple)
 - La détection des organismes génétiquement modifiés (OMG)
- b) En diagnostic médical, la PCR peut être utilisée dans :
- La détection des maladies génétiques
 - La détection des mutations au niveau du génome, leur nature, leurs tailles et leurs positions
 - La détection des maladies infectieuses. exemples : SIDA, l'hépatite C, ou les infections à chlamydia
 - Le dépistage prénatal comme la trisomie par exemple
 - La détection des tumeurs

1.11- Avantages et inconvénients de la PCR

a) Avantages de la PCR

- Gain du temps et de mains d'œuvre (par rapport au clonage)
- Sensibilité à des concentrations infimes d'acides nucléiques
- Nombre élevé de copies (de l'ordre de milliard pour 30 cycles qui durent environ deux à quatre heures)
- Spécificité due aux amorces
- Automatisation de l'analyse

b) Inconvénients de la PCR

- Risque de contamination par des substances dans le mélange réactionnel ce qui donne des faux positifs
- Risque d'inhibition de la Taq-polymérase par des substances telles que les colorants, l'hème ou des substances d'origine biologiques comme l'urine ou le liquide céphalorachidien, ce qui donne des faux positifs
- Utilisation du bromure d'ethidium pour la révélation (agent cancérigène)
- Manipulation post-PCR : PCR et analyse sont deux étapes séparées
- Manque de fidélité de la Taq-polymérase (pas de fonction correctrice 3')

- Coût élevé (30-60 € par pathogène).

2- Les variantes de la PCR

2.1- La PCR nichée (nested PCR)

C'est une succession de réactions PCR effectuées afin d'amplifier spécifiquement une séquence, en réalisant deux PCR successives dont le produit issu de la première PCR est de nouveau amplifié au cours de la deuxième. L'intérêt majeur de cette deuxième amplification est d'augmenter la spécificité de cette technique [12].

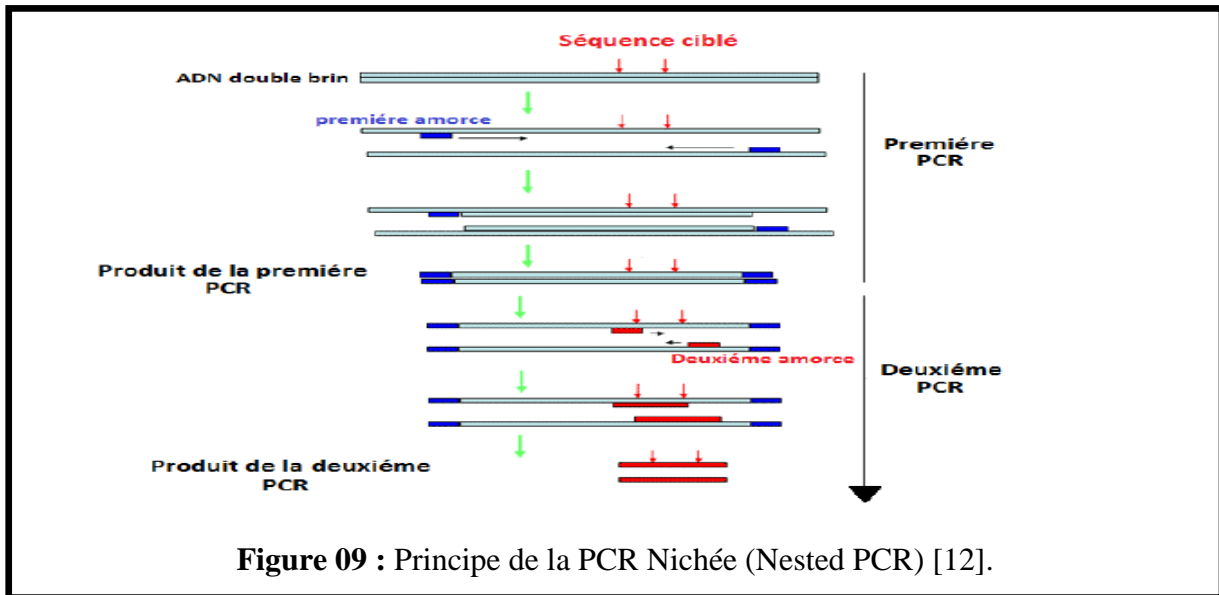
Deux couples d'amorces différents sont successivement utilisés dans cette technique :

- ✓ un couple d'amorces externes qui permettent en premier lieu l'amplification d'un fragment d'ADN cible, selon la méthode classique de la PCR.

Les fragments d'ADN obtenus servent alors de matrice pour une seconde PCR.

- ✓ un couple d'amorces internes qui servent à délimiter la région interne (ou nichée) du fragment nucléotidique issu de la première amplification avec le premier couple d'amorces, et donnera des fragments de taille inférieure à ceux obtenus avec la première amplification.

Les résultats de cette PCR doivent être interprétés avec précaution dans la mesure où cette méthode associe deux PCR classiques successives et permet certes d'augmenter la spécificité ; cependant elle est difficilement utilisable pour un usage de routine sur des grandes séries car elle nécessite beaucoup de temps de manipulation et présente d'énormes risques de contaminations [12].



2.2- La PCR multiplex

Cette variante de la PCR s'intéresse à l'amplification d'ADN de différentes origines (issu de plusieurs échantillons) dans un seul et même tube. Sa réalisation exige l'utilisation de plusieurs couples d'amorces avec des températures d'hybridation et des longueurs des produits amplifiés semblables ainsi que l'utilisation de la Taq polymérase. La PCR multiplex a pu régler en quelque sorte les problèmes de contamination de la PCR classique, mais cela ne l'a pas empêché d'en poser d'autres. En effet, elle favorise la formation de produits PCR non spécifiques tels que les dimères d'amorce. Cette technique peut également favoriser l'amplification de courts fragments d'ADN par rapport aux longs d'où les différences de rendement. Les produits de la PCR multiplex peuvent subir une hybridation supplémentaire avec une sonde spécifique du gène pour vérification [11].

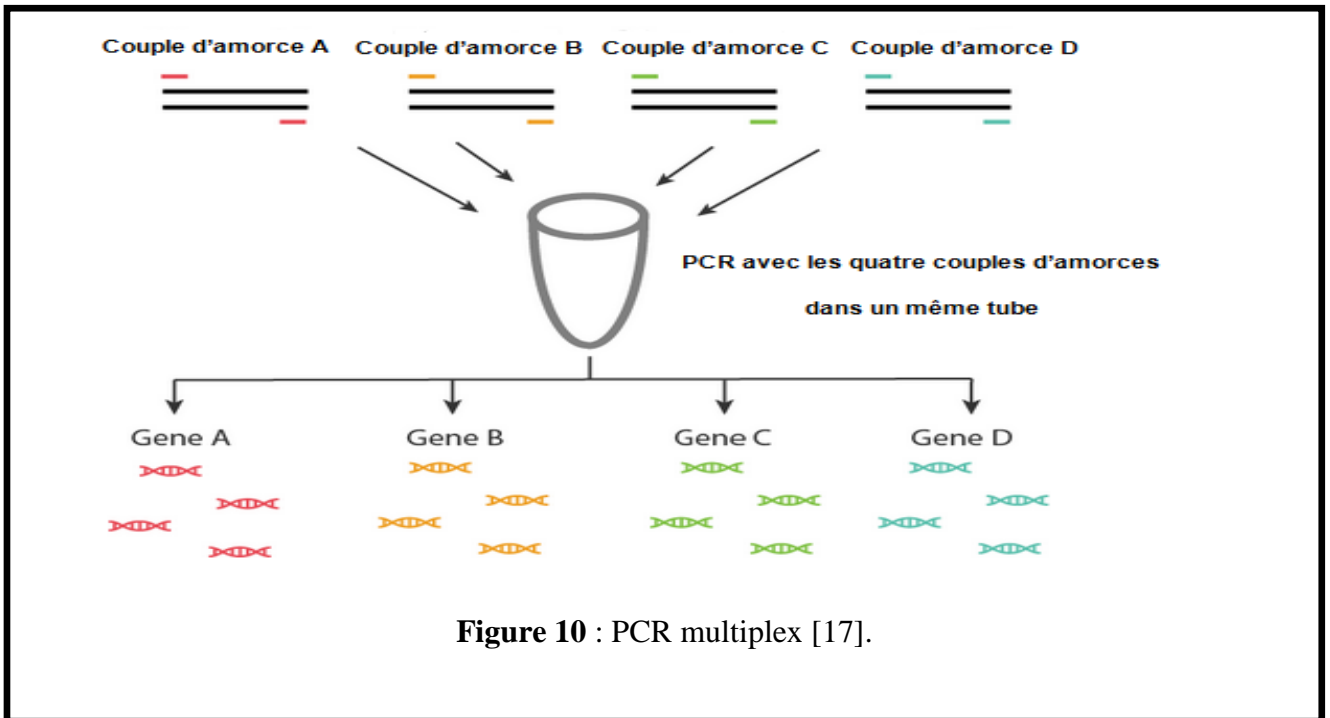


Figure 10 : PCR multiplex [17].

2.3- La RT-PCR

L'amplification in vitro ne concerne pas seulement l'ADN, l'ARN peut également faire l'objet d'amplification. Cette dernière est désormais possible grâce à une réaction appelée la RT-PCR, pour Reverse-transcriptase PCR, une technique permettant de réaliser une amplification à partir d'ARN. Ce dernier doit passer par une étape préliminaire de transcription inverse au cours de laquelle l'ARN sera transformé (transcrit) à partir d'une amorce en ADN complémentaire noté ADNc grâce à une enzyme recombinante ADN polymérase ARN dépendante, également appelée transcriptase inverse. Cette enzyme est thermostable et issue de la bactérie *Thermus thermophilus* [18].

Dans un second temps, l'ADNc synthétisé est amplifié par PCR classique.

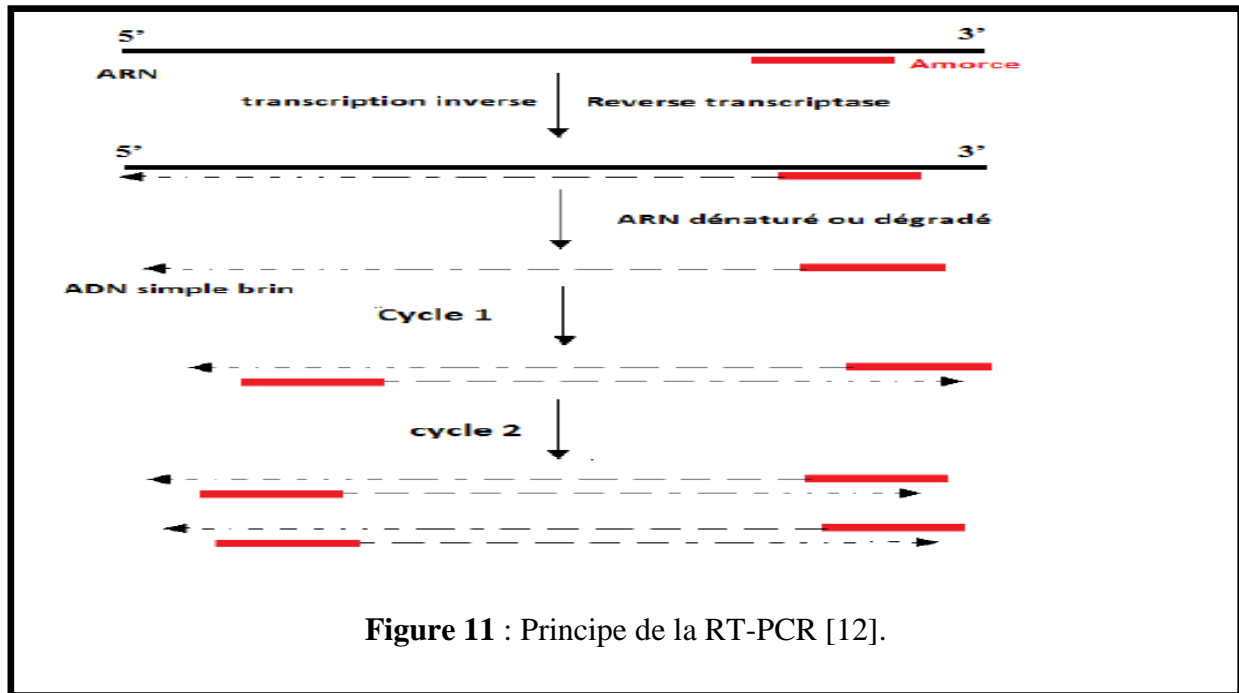


Figure 11 : Principe de la RT-PCR [12].

Si la technique de la RT-PCR ne présente pas de difficulté technique particulière, elle est, cependant, rendue délicate par le caractère extrêmement labile de l'ARN, ainsi que la contamination possible des échantillons d'ARN par de l'ADN, ce qui impose de prendre un certain nombre de précautions dans la réalisation de l'analyse, surtout lorsque l'on souhaite l'utiliser pour le diagnostic clinique [18].

2.3.1- Les éléments réactionnels de la RT PCR

a) L'ARN matrice

Deux types d'ARN matrice peuvent être utilisés en RT-PCR : l'ARN total ou les ARN messagers isolés :

➤ L'ARN total

L'ARN total est le mélange de tous les types d'ARN qui se trouvent dans la cellule : les ARN messagers (3 à 5 % seulement de l'ARN Total), les ARN de transfert (ARNt), et les ARN ribosomiaux (ARNr). Il faut noter aussi que la réaction de RT-PCR est limitée lorsqu'elle est réalisée à partir d'ARN total suite à l'inhibition de la RT par les ARNt, ce qui peut poser problème en cas de cible très minoritaire [18].

➤ Les ARN messagers

L'obtention de l'ARNm se fait soit par extraction directe soit par passage de l'échantillon sur une résine contenant des groupements polyT. Cette méthode permet d'augmenter la sensibilité de l'analyse et éviter la contamination de l'échantillon par de l'ADN. Elle présente également quelques inconvénients car nécessite un matériel coûteux et une pratique complexe pour un rendement relativement faible suite à l'élimination des ARNm dépourvus de polyA et partiellement dégradés [18].

b) L'enzyme : la transcriptase inverse

La majorité des RT commercialisées sont des RT recombinantes pour leur facilité de production industrielle ainsi que pour la possibilité de sélectionner des clones ayant des mutations qui diminuent leur activité enzymatique. Parmi les enzymes disponibles, les moins chères sont : M-MLV, AMV, M-MuLV. Néanmoins, si un résultat n'est pas satisfaisant un changement de l'enzyme est suggéré pour un meilleur rendement.

Propriétés de la Transcriptase reverse :

- Dépourvue d'activité RNaseH (RNaseH-) : elle dégrade le brin d'ARN au niveau des hétéroduplex ARN/ADN formés avec les amorces ou le brin d'ADNc en cours de synthèse
- Température élevée (> 42 °C et certaines peuvent attendre les 72°C) : cette température favorise la rétro transcription des séquences contenant des structures secondaires (cas de l'ARN viral). Exemple : C.therm polymérase de chez Roche MolecularBiochemical (elle a été isolée à partir de la bactérie *Carboxydotherrmus hydrogenoformans*)
- Haute affinité pour l'ARN : le substrat, dans ce cas l'ARN, doit présenter une affinité pour l'enzyme, de ce fait le choix est orienté vers des RT isolées à partir de virus car elles auraient une affinité supérieure par rapport aux autres RT. Par exemple, Qiagen conseille la RT Sensiscript® pour des quantités d'ARN inférieures à 50 ng, et l'Omniscript® pour des quantités d'ARN supérieures à 50 ng [18].

c) Les amorces**○ Amorces aléatoires**

Ce sont des séquences de 6 ou 8 nucléotides (généralement hexamère mais les heptomères sont utilisés dans le cas de rétro transcription à température élevée) synthétisées aléatoirement. Ces amorces se fixent sur les ARN matrices présents de façon aléatoire.

Vue la polyvalence que confère ce type d'amorçage, il est largement utilisé pour synthétiser l'ADNc à partir d'ARNm fragmentés, d'ARN riches en structures secondaires, et dans l'amplification de plusieurs cibles à partir de la même préparation d'ADNc.

La concentration des amorces aléatoires dépend de la longueur du brin synthétisé, car cette dernière est inversement proportionnelle à la concentration des amorces. Par exemple ; On peut utiliser des quantités d'hexamères allant de 20 ng (ADNc longs) à plus de 5 µg (ADNc courts) pour une réaction de 20 µL.

Il faut noter que de fortes concentrations d'hexamères n'exercent pas d'action inhibitrice sur la RT [18].

○ OligoT

Les oligoT sont des amorces synthétisées à partir de 12- 18 nucléotides T, ont pour rôle l'hybridation avec la région polyA de l'ARNm.

Ce type d'amorçage présente quelques inconvénients tels que la possibilité d'obtention d'ADNc tronqué en région 5' si l'ARN est de grande taille, et l'impossibilité de la rétro transcription si l'ARN est dépourvu de queue polyadénillée ou partiellement dégradé.

○ Amorce 3' spécifique

Contrairement aux deux types d'amorçage précédents, celui-là est spécifique à l'ARN cible, et l'amorce est utilisée en région 3' de l'ARN d'intérêt. Il est surtout utilisé dans les analyses qualitatives car grâce à sa spécificité il permet la rétro transcription d'un seul transcrit.

Les amorces 3' spécifiques sont utilisées majoritairement pour le séquençage de l'ADNc et l'amplification de l'ARNm se trouvant en faible quantité dans une solution.

Pour un meilleur rendement, il est important de vérifier la quantité de l'ARN et de la RT pour pouvoir comparer le transcrit d'intérêt avec les témoins. De plus, ce type d'amorçage est peu reproductible en cas d'analyse quantitative [18].

d) Les inhibiteurs de RNAses

Pour protéger l'ARN de la dégradation, des inhibiteurs des enzymes RNases sont commercialisés et dont la composition est souvent inconnue, ce qui rend le choix plutôt

difficile. Tous les inhibiteurs disponibles ne présentent pas une protection contre toutes les RNases, donc ils ne sont pas indispensables mais sont ajoutés juste par précaution [18].

Exemples d'inhibiteurs commercialisés :

- Vanadyl-ribonucléoside (Ribonucleoside Vanadyl Complex®, New England Biolabs) : avec une faible spécificité, il est le premier inhibiteur décrit, c'est un inhibiteur de RNase de type A. Il peut également inhiber plusieurs enzymes tels que les systèmes de traduction in vitro (mais pas la transcription inverse).
- RNase inhibitor® de Qiagen, Eurobio, Ambion, USB et RNasin® de Promega : est une protéine recombinante de 50 kda isolée à partir du placenta humain (peut être utilisée sous sa forme purifiée), c'est la protéine inhibitrice la plus utilisée. Cette protéine provoque l'inhibition de l'ARNase A, B, C et l'ARNase placentaire, cependant, elle n'a pas d'activité inhibitrice des RNases H, des transcriptases inverses ou des polymérases.

Son activité exige au moins 1 mM de DTT, et est inhibée si la température dépasse les 50°C ou si des agents dénaturants se trouvent dans le milieu tel que l'urée et le SDS.

Pour son efficacité, cette protéine est ajoutée après l'étape de dénaturation de l'ARN et ne doit pas être introduite dans une RT avec une température élevée.

- RNaseOUT®, Invitrogen : une protéine d'origine porcine de 52 kda de poids moléculaire, utilisée recombinante ou purifiée. Son action se résume à l'inhibition des RNases A, B et C mais pas les RNases 1, T1, T2 et H.
- SUPERaseIN® : inhibiteur d'origine inconnue, il n'inhibe pas seulement les RNases A, B et C mais aussi les RNases 1 et T1. Contrairement à la protéine issue du placenta humain, cet inhibiteur n'exige pas de DTT et peut supporter jusqu'à 65°C.

e) Autres réactifs

- **Mélange de désoxynucléotides (dNTP)**

C'est le mélange de 4 types de nucléotides, dATP, dTTP, dCTP, dGTP (similaire à la PCR classique)

- **Dithiothréitol (DTT)**

Le DTT est un agent réducteur stabilisant de l'enzyme, généralement fournis avec elle, ou inclus dans le tampon. Pour une meilleure utilisation du DTT, ce dernier doit être aliquoté juste après sa réception à cause de son instabilité et sa sensibilité aux variations de la chaleur.

○ Tampon

Le tampon est utilisé pour stabiliser le pH (généralement fourni avec l'enzyme), il est généralement constitué de [19] :

- Tris.Cl avec une concentration de 100 à 670 mM et un pH égal à 8,3 : son rôle est de tamponner le milieu réactionnel pour une activité optimale de la Taq-polymérase
- MgCl₂ avec une concentration de 150 à 300 mM : les ions Mg²⁺ sont des cofacteurs de l'enzyme
- KCl avec une concentration de 500 mM ou (NH₄)₂ SO₄ avec une concentration de 160 mM : les cations K⁺ et NH₄⁺ interagissent avec la charge négative de l'ADN et peuvent interagir avec les liaisons hydrogènes pour défavoriser l'hybridation non spécifique entre les brins

○ L'eau

L'eau est traitée préalablement par diéthylpyricarbonate (DEPC) qui a pour rôle d'inhiber certaines RNAses (ceci ne gêne pas la réaction de la RT-PCR).

Aussi, malgré le surcout de l'eau dépourvue d'RNAses, elle ne présente aucun intérêt supplémentaire à la réaction [18].

2.3.2- La réaction de transcriptase inverse

Dans cette phase, la réaction pour obtenir un ADN complémentaire est catalysée par une enzyme : la reverse transcriptase. En effet, après l'isolement des ARNm, la transcriptase reverse commence à synthétiser les brins d'ADNc en utilisant les ARN comme matrice.

A la fin de cette étape les ARNm sont soumis à une hydrolyse par traitement alcalin, RNase ou température [20].

2.3.3- La réaction PCR

Selon le même principe de la PCR classique, l'amplification des ADNc se déroule dans un thermocycleur. Elle passe par plusieurs cycles de température pour donner des ADNc bicaténaire en grande quantité.

2.3.4- Applications de la RT-PCR

Parmi les applications de la RT-PCR nous pouvons noter [18] :

- La détection et quantification de la charge virale des virus à ARN
- La recherche de l'expression d'antigènes tumoraux pour mettre en place un traitement par immunothérapie de mélanomes métastatiques
- La recherche de mutations sur exons par séquençage d'ADNc, ce qui facilite énormément le travail dans le cas de gènes comportant de multiples exons
- La détection de transcrits anormaux : La détection de ces transcrits de fusion participe alors au diagnostic de la tumeur et permet d'évaluer la masse tumorale résiduelle au cours du traitement

2.3.5- Limites de la RT-PCR

Malgré sa grande spécificité la RT-PCR présente certaines limites [20] :

- La grande variabilité génétique des virus, nécessitant donc de développer des essais spécifiques à chaque sous-classe virale
- Le risque de faux positifs par contamination extérieure
- Le risque de vrais négatifs par inhibition de l'ADN polymérase. L'analyse en parallèle d'un contrôle interne positif permettrait d'y remédier (la PCR en temps réel est recommandée pour analyser les résultats en même temps que la réaction)
- Le rendement de la réaction n'atteint pas les 100%
- La taille du fragment à amplifier doit être de l'ordre de quelques kb, car une taille importante gêne la réaction de polymérisation en favorisant la formation des structures secondaires

Chapitre II

Techniques d'amplification isotherme

1- Introduction

Dans cette partie nous abordons cet ensemble de techniques isothermes.

2- Principe des techniques isothermes

C'est un ensemble de techniques permettant d'identifier un agent pathogène responsable d'une infection. Appelées également PCR isothermes car elles permettent l'amplification spécifique d'un ou plusieurs marqueurs moléculaires par une ADN/ARN polymérase. La présence d'un agent pathogène indique la présence de son matériel génétique. Ce matériel étant propre à chaque organisme, il va servir de cible pour l'amplification.

L'amplification isotherme permet d'identifier l'ADN ou l'ARN du virus, de la bactérie, du champignon ou du phytoplasme phytopathogène recherché. L'amplification spécifique d'un acide nucléique est qualifiée d'isotherme puisqu'elle se fait à une température constante.

Les méthodes d'amplification isotherme peuvent être utilisées en laboratoire ou déclinées sous forme de kits de détection utilisables directement sur le spécimen (échantillon) [21].

3- Nucleic acid sequence-based amplification(NASBA)

3.1- Définition de la NASBA

Nucleic Acid Sequence Based Amplification (NASBA), connue aussi sous le nom de "self sustained sequence replication" (3SR) [22], développée par J. Compton en 1991. C'est une technique qui se déroule dans des conditions isothermes à une température constante de 41°C, conçue principalement pour détecter et amplifier des séquences d'ARN. Comme elle peut aussi être utilisée pour amplifier l'ADN [23] [25] [26].

3.2- Principe de la NASBA

Il s'agit de réaliser à partir d'une cible ARN simple brin un ensemble de cycles continus de transcription inverse et de transcription par l'action conjointe de trois enzymes ; une transcriptase inverse, une RNase H et une T7 ARN polymérase générant à la fin de nombreux exemplaires d'ARN [26].

3.3- Éléments réactionnels de la NASBA

- Un tampon est utilisé avec le liquide NASBA Enzyme Cocktail (NEC-1-24) dans les réactions NASBA. Il nécessite l'ajout des nucléotides par l'utilisateur. Sa composition par réaction : (TrisHCl ; MgCl₂ KCl ; DTT et le Diméthyl Sulfoxyde) [28].
- Du magnésium sous forme de MgCl₂

- Des précurseurs ribonucleotidiques : ATP, CTP, GTP et UTP
- Des précurseurs désoxyribonucléotides : dATP, dCTP, dGTP et dTTP
- Deux amorces :
 - L'amorce (A) présente à son extrémité 5' une séquence non complémentaire de la cible et contient un site d'initiation de la transcription de l'ARN polymérase du phage T7
 - Une seconde amorce (B) spécifique à l'ADNc
- Trois enzymes :
 - Une AMV-RT (Avian Myeloblastosis Retrotranscriptase) : pour la synthèse de l'ADNc à partir de l'ARN
 - Une RNase H, une endonucléase responsable de la dégradation du brin d'ARN des hétéroduplexes ADN / ARN
 - Une ARN T7 polymérase : c'est une polymérase issue du bactériophage T7, qui catalyse la synthèse d'ARN dans le sens (5'→3') par transcription d'une molécule d'ADN bicaténaire.
- L'ARN cible

L'ensemble des éléments décrits ci-dessus constitue le milieu réactionnel dans lequel la réaction NASBA va se dérouler [26]. L'amplification a lieu dans un amplificateur Nuclisens EasyQ® (bioMérieux) ou un bain marie [29].

3.4- Étapes de la technique NASBA

Avant l'étape d'amplification, il est primordial d'extraire et d'isoler l'ARN par une des techniques d'extraction décrites précédemment (**chapitre I**).

La technique NASBA se déroule en deux étapes : une première étape linéaire et une deuxième étape d'amplification exponentielle (**Figure 12**).

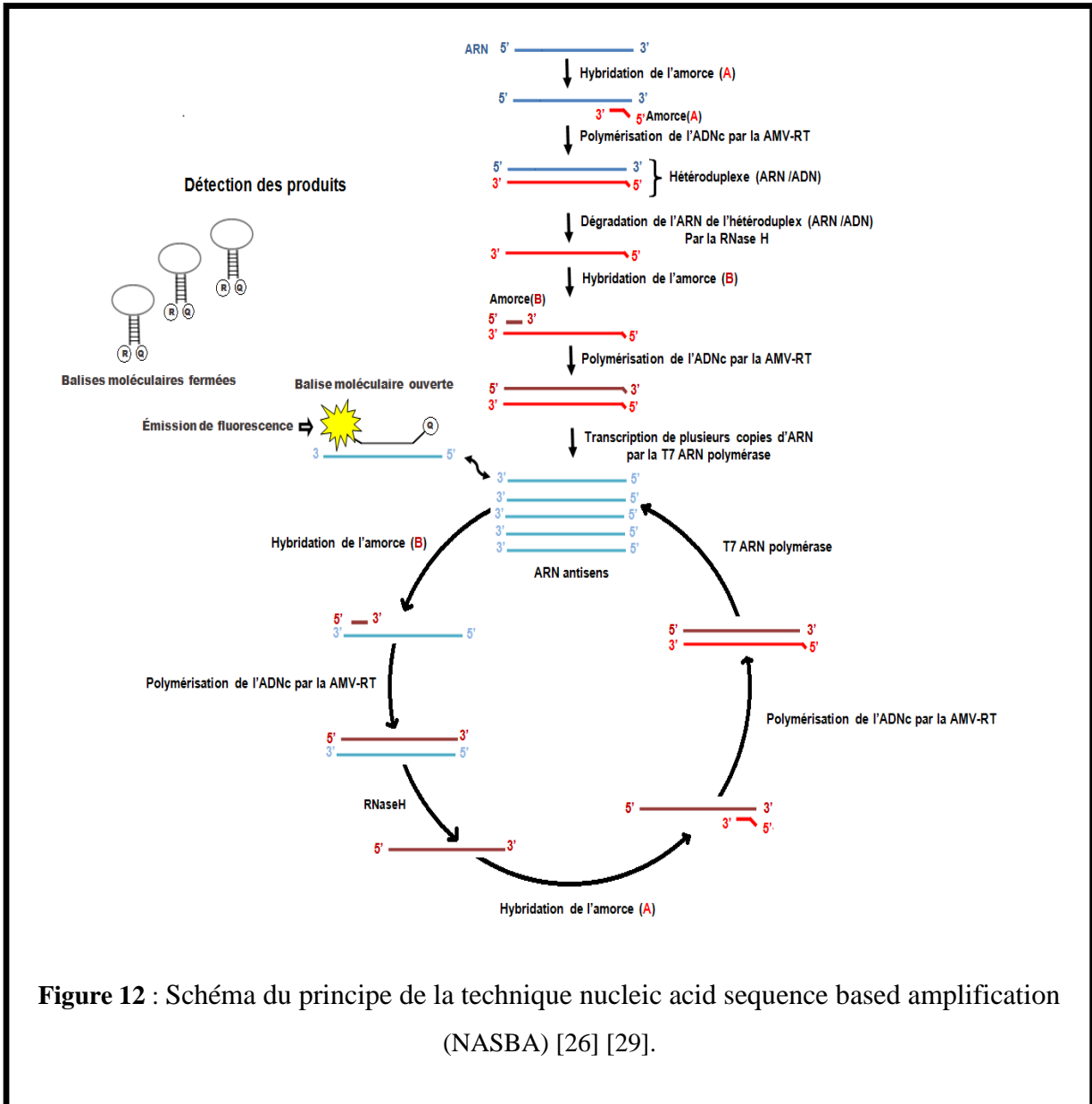


Figure 12 : Schéma du principe de la technique nucleic acid sequence based amplification (NASBA) [26] [29].

1) L'étape linéaire

L'amorce (A) incluant la séquence promotrice du phage T7 s'hybride à l'ARN cible par son extrémité 3' complémentaire. La transcriptase inverse réalise l'élongation de l'amorce (A). Un hétéroduplex ADN/ARN est formé. La ribonucléase H dégrade ensuite spécifiquement l'ARN des hétéroduplex ADN/ARN, car cette enzyme n'a pas d'action sur les ARN simples brins et libère un ADN simple brin. La seconde amorce (B) s'hybride sur le brin d'ADN libéré et la AMV-RT polymérise le brin complémentaire. Le produit est un ADN bicaténaire, comportant également la séquence promotrice de la polymérase d'ARN T7.

Au cours de cette première étape la réaction de transcription inverse au départ est linéaire c'est-à-dire la quantité d'ADN double brin produite est directement proportionnelle à la quantité d'ARN cible de départ [23] [28].

2) L'étape d'amplification exponentielle

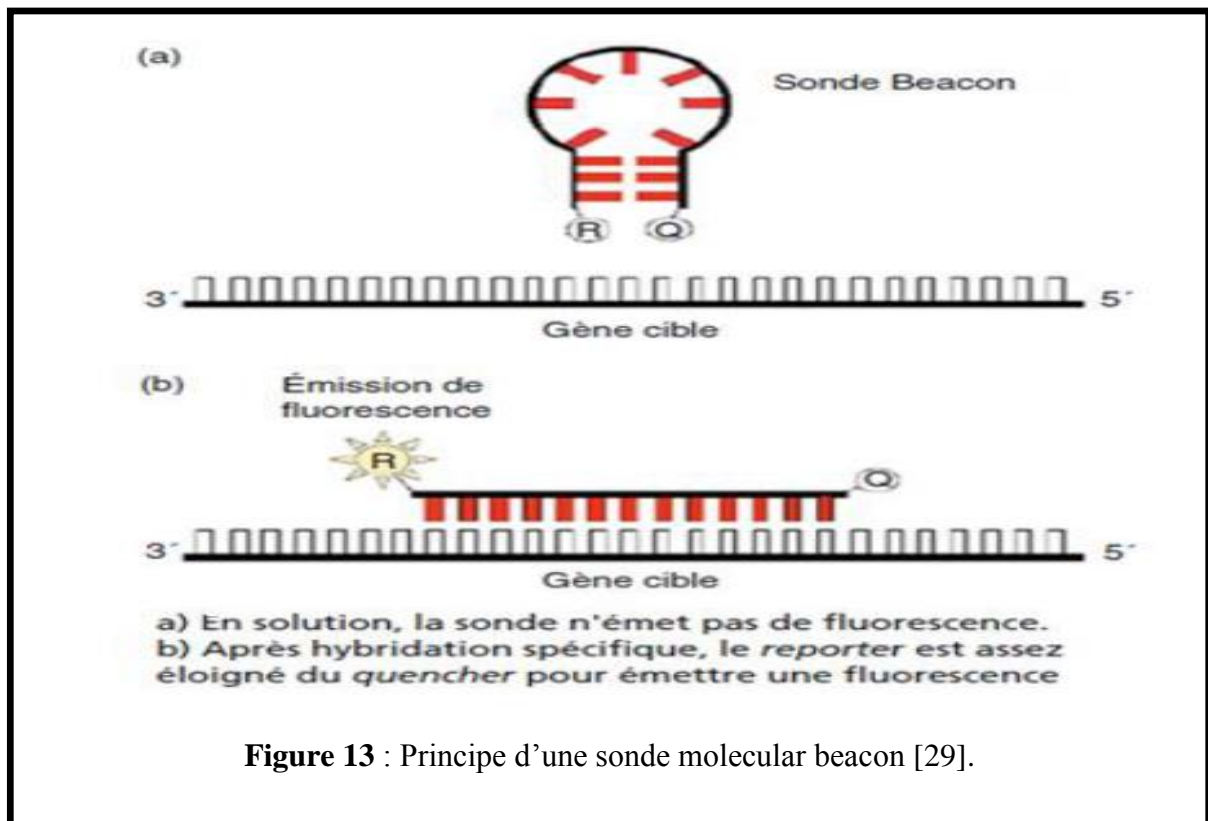
La troisième enzyme, l'ARN T7 polymérase transcrit plusieurs copies d'ARN antisens (complémentaires à celles d'origine) à partir de l'ADN généré dans l'étape précédente (l'étape linéaire). Chaque brin d'ARN nouvellement synthétisé servira alors de cible et suivra un processus d'amplification cyclique. D'abord, l'amorce (B) est hybridée avec l'ARN et un hétéroduplex ADN/ARN est formé grâce à l'action de l'enzyme AMV-RT qui synthétise le brin d'ADNc, puis, l'ARN est dégradé par la RNaseH. Ensuite, l'amorce (A) est hybridée avec l'ADNc, ce qui permet à l'AMV-RT la synthèse d'un ADN double brin incluant le promoteur T7. Enfin, la transcription de plusieurs copies d'ARN par la T7 polymérase est répétée. [23] [29].

3.5- Détection des produits NASBA

La détection des produits NASBA est fondée sur l'hybridation spécifique des sondes nucléotidiques fluorescentes de type balises moléculaires (molecular Beacons).

Les balises moléculaires sont des sondes d'hybridation possédant une structure de tige-boucle semblable à une épingle à cheveux. Elles contiennent un fluorochrome émetteur (reporter) à l'extrémité 5' et un répresseur (quencher) à l'extrémité 3'. La conformation tridimensionnelle de la sonde à l'état libre (l'émetteur et le répresseur se trouvent très près l'un de l'autre) inhibe l'émission de fluorescence. Par contre, lors de l'hybridation de la sonde avec sa séquence complémentaire, l'éloignement spatial supprime l'action inhibitrice du répresseur et entraîne l'émission de fluorescence par l'émetteur (**Figure 13**) [29].

La présence de l'ARN produit au cours de la réaction NASBA permet l'hybridation des sondes qui s'ouvrent et émettent de la fluorescence (**Figure 13**).



Les produits NASBA peuvent également être détectés par électrochimiluminescence (ECL), par électrophorèse sur gel d'agarose (AG) ou par un dosage de gel lié à une enzyme (ELGA) [29].

3.6- Applications de la technique NASBA

La technique NASBA a été utilisée pour développer des tests de diagnostic rapide pour plusieurs microorganismes, notamment en virologie et en bactériologie [28] :

- Elle est utilisée pour détecter des virus pathogènes avec des génomes à ARN monocaténaux, par exemple : le virus de l'Influenza A, le virus de la fièvre aphteuse [31], le coronavirus associé au syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS) [32], le bocavirus humain (HBV) [33].
- Elle est utilisée dans le diagnostic des infections bactériennes par l'utilisation du mix réactionnel Nuclisens Basic kit de bioMérieux, associé à des amorces et des sondes spécifiques, permet, par détection d'ARN 16S, une détection en multiplex des infections à *Neisseria gonorrhoeae* et *Chlamydia trachomatis* avec une excellente sensibilité : respectivement de 97,4% et 100%.
- Elle est utilisée dans la recherche des parasites tels que *Trypanosoma brucei*.

- Elle est utilisée pour détecter les agents non infectieux comme les cellules tumorales circulantes.

3.7- Avantages et inconvénients de la NASBA

NASBA est une technique avec des applications répandues dans le domaine de l'amplification et de la détection de l'ARN. Les avantages et les inconvénients de NASBA sont présents dans les paragraphes qui suivent.

a) Avantages de la NASBA

Cette technique présente plusieurs avantages [26] :

- Permet une amplification d'un milliard de fois de la séquence cible en seulement 90 minutes et à une température constante (41°C) ce qui évite l'acquisition d'un thermocycleur, un bain marie suffit
- Permet une amplification réalisable en une seule étape et qui ne nécessite aucun équipement spécialisé
- Permet la détection des cellules viables puisque la durée de vie des ARN est liée à la durée de vie de la bactérie
- Permet de mesurer la répllication des virus à ADN en détectant l'expression de l'ARN_m tardif
- Permet la détection des séquences d'ARN_m sans avoir le risque de contamination par l'ADN
- L'ARN produit par la technique NASBA peut être séquencé directement avec la méthode de didésoxyribonucléotide en utilisant une transcriptase inverse et une amorce marquée

b) Inconvénients de la NASBA

La NASBA présente aussi quelques inconvénients cités dans [25] :

- La principale cause de préoccupation pour la NASBA est l'intégrité de l'ARN, ainsi que pour la RT-PCR et d'autres procédures d'amplification de l'ARN.

- Bien que la réaction d'amplification elle-même soit isotherme à 41 ° C, une seule étape de fusion avant la réaction d'amplification est nécessaire pour permettre l'hybridation des amorces à la cible.
- En outre, comme la spécificité des réactions dépend des enzymes thermolabiles, la température de réaction ne peut dépasser 42 ° C sans la compromettre.
- Enfin, la longueur de la séquence cible de l'ARN amplifié doit être comprise entre 120 et 250 nucléotides, les séquences plus courtes ou plus longues étant amplifiées moins efficacement.

4- Transcription-mediated amplification (TMA)

4.1 Définition de la technique TMA

Transcription Mediated Amplification (TMA) ou amplification médiée par transcription, est une technique d'amplification isotherme (37- 42°C) des acides nucléiques. Elle a été utilisée pour amplifier les différents types d'ARN [33]. L'ADN aussi peut être directement amplifié par cette méthode [25].

La TMA étant très proche de la technique précédente (NASBA), elle partage avec elle plusieurs points communs notamment son principe. La différence entre les deux réside dans l'utilisation de deux enzymes au lieu de trois. Une transcriptase inverse (RT) possédant une activité RNase et une ARN polymérase [25].

4.2- Principe de la technique TMA

Le principe de cette technique se base sur la transcription d'ARN produit en de nombreuses copies en reposant sur l'action simultanée de deux enzymes une transcriptase inverse et une ARN polymérase.

4.3- Éléments réactionnels de la TMA

Le mélange réactionnel nécessaire pour la réalisation de la TMA est constitué de [35] :

- Un tampon
- Du magnésium sous forme de $MgCl_2$
- Des ribonucléotides : ATP, CTP, GTP et UTP
- Des désoxyribonucléotides : dATP, dCTP, dGTP et dTTP

- Deux amorces :
 - Une amorce (1) qui présente à son extrémité 5' une séquence non complémentaire de la cible et qui comporte un site d'initiation de la transcription de l'ARN polymérase du phage T7
 - Une seconde amorce (2) spécifique à l'ADN_c
- Deux enzymes avec trois activités enzymatiques :
 - L'ARN polymérase du phage T7
 - Moloney murine leukemia virus RT (M-MLV-RT) qui est une transcriptase inverse, la particularité de cette transcriptase inverse est de posséder également une activité RNAsique
- L'ARN cible
- Instrument de régulation de température : bain marie

4.4- Étapes de la TMA

Cette méthode s'effectue en deux étapes : la synthèse d'un ADN double brin transcriptible en ARN suivie d'une phase d'amplification. A la fin de ces 2 étapes, une détection des amplicons est nécessaire [35].

1) L'étape de synthèse de l'ADN double brin transcriptible en ARN

L'ARN cible est hybridé avec un oligonucléotide (1) (leur taille dépend de la taille du génome étudié) qui sert d'amorce à la reverse transcriptase qui va réaliser son élongation par incorporation de dNTP permettant d'obtenir une molécule d'ADN complémentaire de l'ARN cible (un hybride ARN/ADN). L'activité RNase de la RT dégrade ensuite l'ARN de cet hybride laissant l'ADN_c qui servira à son tour de matrice pour une seconde amorce (2). Son élongation est effectuée également par l'activité ADN polymérase de la RT. Cela permet l'obtention d'une molécule d'ADN double brin comportant grâce à l'amorce (1) un site promoteur de l'ARN polymérase du phage.

2) L'étape d'amplification

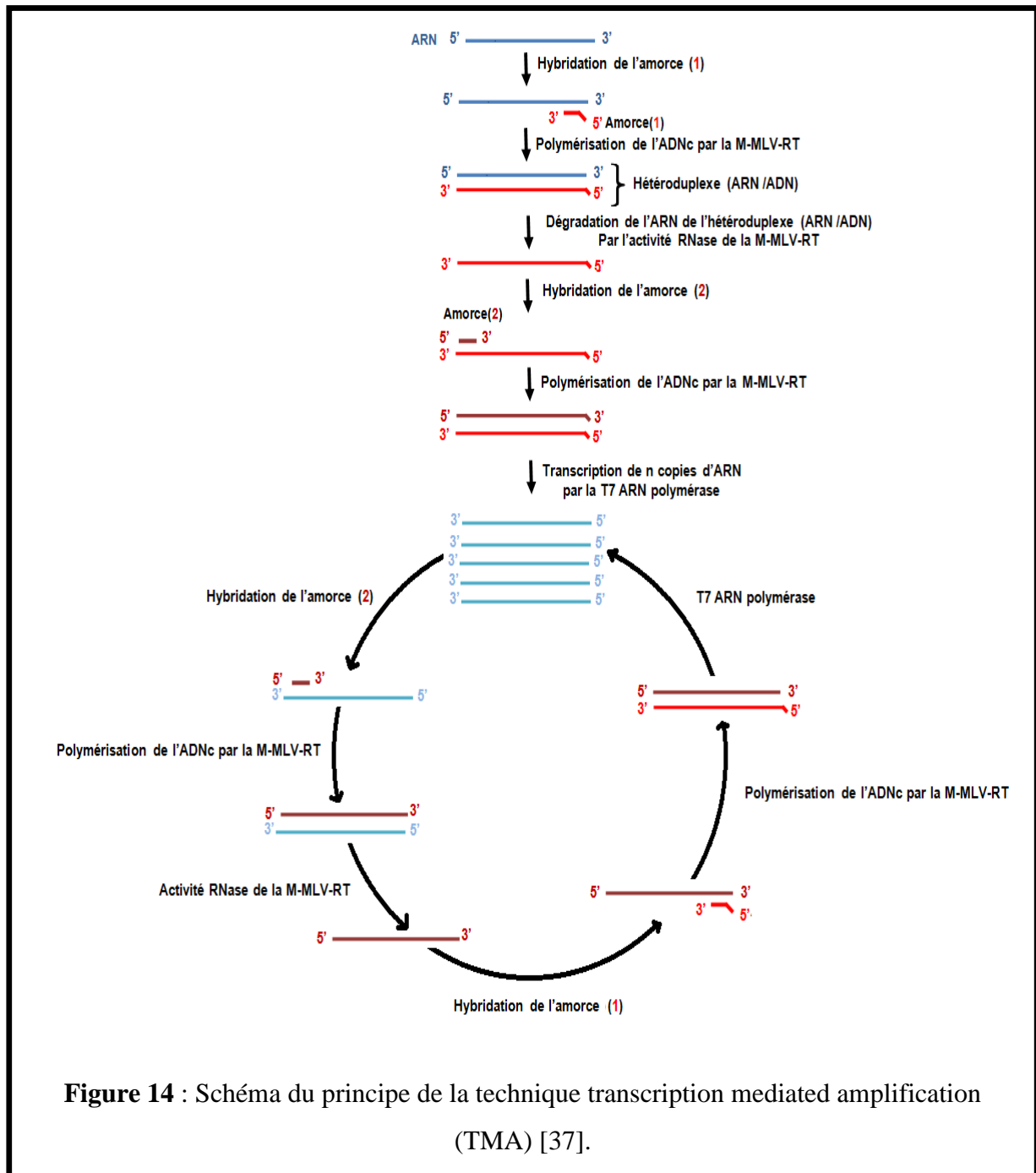
Dans cette étape vient le rôle de l'ARN polymérase qui va se fixer sur la molécule d'ADN synthétisée dans l'étape précédente et transcrire de nombreuses copies d'ARN complémentaire à la séquence cible (100 à 1000 copies).

Ces dernières servent à leur tour de matrice pour la RT selon le cycle décrit précédemment (1ère étape).

4.5- Détection des produits de TMA

L'étape de détection s'effectue par le test de protection d'hybridation (Hybridization Protect Assay, HPA), une méthode d'hybridation homogène chimiluminescente, non radioactive et à base de solutions. Ce test est sensible, simple et rapide à utiliser [36]. Son mécanisme repose sur le marquage d'une sonde spécifique à l'amplicon de l'ARN avec un détecteur moléculaire : l'ester d'acridinium qui émet un signal chimioluminescent. Après l'hybridation, une solution de sélection tamponnée est ajoutée, cette dernière permet de rompre seulement les liaisons ester entre l'acridinium et les sondes non hybridées. Seules les sondes hybridées avec la région cible donneront un signal chimio-luminescent contrairement à l'acridinique libre qui perd sa chimioluminescence [29].

Cette méthode est développée et commercialisée par GenProbe et BioMérieux dans la trousse Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test[®] [37].



4.6- Applications de la technique TMA

La TMA est appliquée dans divers domaines selon [37] :

- Permet la détection simultanée de multiples organismes pathogènes dans un seul tube
- Peut être utilisée pour cibler à la fois l'ARN et l'ADN

- Peut être utilisée en biologie moléculaire, en médecine légale et en médecine pour l'identification et le diagnostic rapide des organismes pathogènes tels que *Neisseria gonorrhoea*, *Chlamydia trachomatis*, *HPV*, *VIH*, *Trichomonas vaginalis* et *Mycobacterium tuberculosis*
- Permet à un laboratoire clinique d'effectuer des tests d'acide nucléique (NAT) pour le dépistage sanguin avec moins d'étapes, moins de temps de traitement et des résultats plus rapides.

4.7- Avantages de la technique TMA

Cette technique présente de multiples avantages [29] :

- Permet l'amplification des deux types d'acides nucléiques, ADN et ARN
- C'est une réaction isotherme donc un bain-marie ou un bloc chauffant est utilisé à la place d'un thermocycleur, très coûteux
- Permet une amplification de 100 à 1000 copies par cycle. Cela se traduit par une augmentation de 10 milliards de copies d'ADN (ou d'ARN) en environ 15 à 30 minutes seulement
- Présente une haute sensibilité

5- Strand displacement amplification (SDA)

5.1- Définition de la technique SDA

Strand Displacement Amplification (SDA) ou amplification par déplacement d'un brin d'ADN, est une technique isotherme (37°C) décrite pour la première fois en 1992 par Walker et al. [24]. Elle met en jeu deux enzymes thermorésistantes : une enzyme de restriction (BsoBI ou BsrI) et dans certain cas (HincII) plus une ADN polymérase dépourvue d'activité exonucléasique (Klenow exo-) [25].

5.2- Principe de la SDA

Le principe est basé sur une coupure partielle d'un des brins de l'ADN par une enzyme de restriction et ceci après incorporation d'un phosphorothiate nucléotide (dATP modifié) puis

le déplacement du brin néoformé par l'ADN polymérase. De nombreux brins sont ainsi formés de manière cyclique (figure 15).

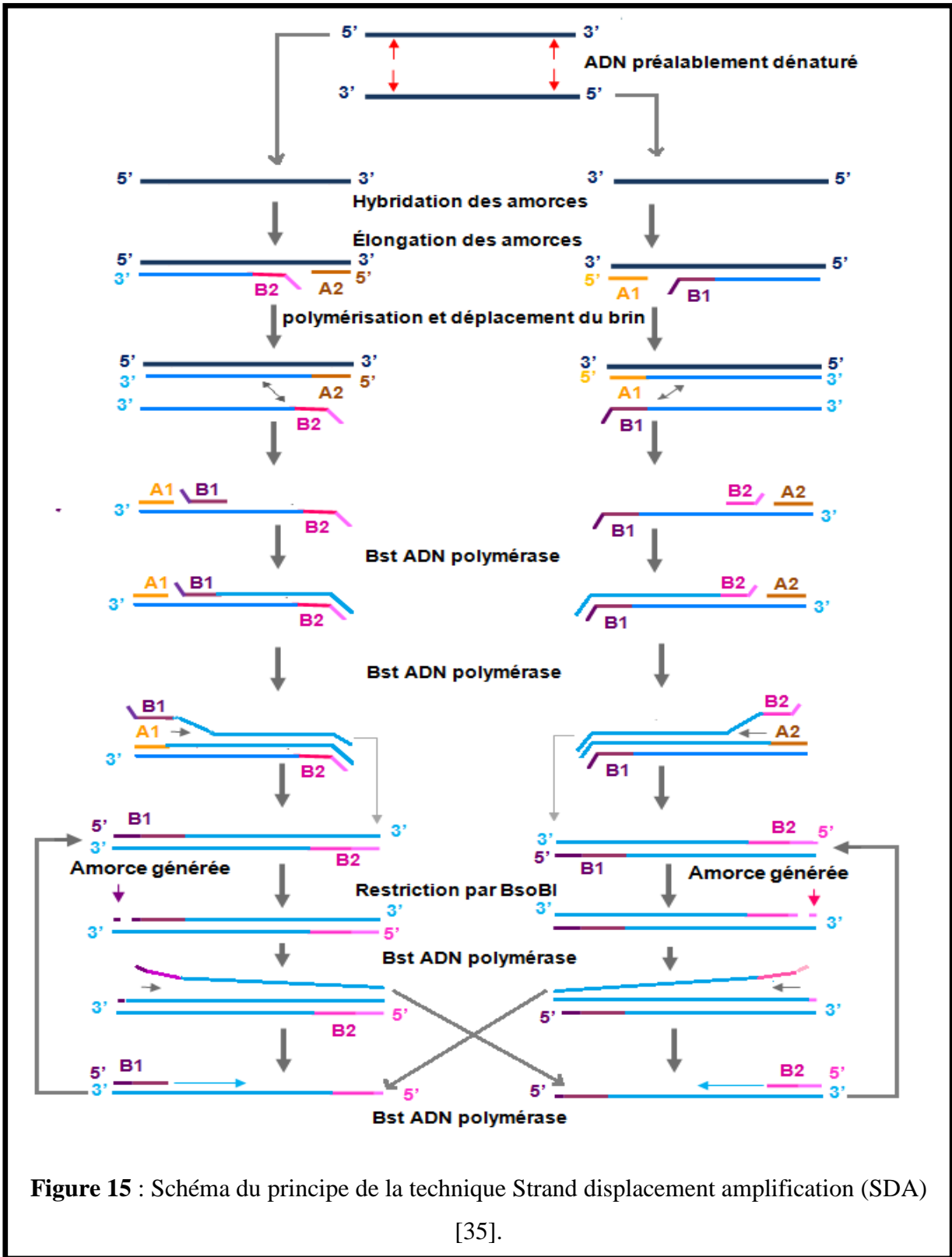


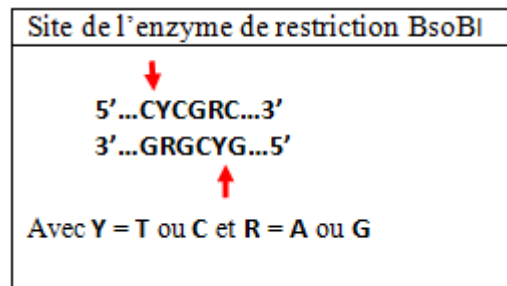
Figure 15 : Schéma du principe de la technique Strand displacement amplification (SDA)

[35].

5.3- Éléments réactionnels de la SDA

En ce qui concerne la SDA, le milieu réactionnel est constitué de [35] :

- Un tampon
- Du magnésium sous forme de $MgCl_2$
- Quatre désoxyribonucléotides : dCTP, dGTP, dTTP mais le dATP est modifié
- Deux couples d'amorces appelés sur le schéma (**figure 14**) A1/A2 (externes) et B1/B2 (internes)
- Deux enzymes
 - Une ADN polymérase dépourvue d'activité exonucléasique
 - Une enzyme de restriction BsoBI



- L'ADN matrice
- Instrument de régulation de la température : bain marie [30].

5.4- Étapes de la SDA

Le déroulement de cette méthode a lieu en deux étapes : génération de la cible ensuite son amplification. Tout comme les deux précédentes méthodes, la détection des amplicons est obligatoire.

a) Génération de la cible

Tout d'abord ; l'ADN doit être dénaturé au préalable (la température de dénaturation dépend de la taille de l'acide nucléique et sa composition en guanine et cytosine), puis transféré dans le milieu réactionnel porté à une température ambiante permettant l'hybridation des amorces. L'ADN polymérase sans activité exonucléase effectue l'élongation des quatre amorces par incorporation des dNTP et entraîne la synthèse d'un ADN double brin. Cette synthèse a lieu en

présence d'un analogue (le dATP-alphaS) d'un des nucléotides utilisé pour la polymérase pour synthétiser l'ADN.

Pour poursuivre la synthèse des brins "A", la polymérase va déplacer les brins "B", eux-mêmes en cours de synthèse. Une fois terminé, les monobrins "B" déplacés vont servir de matrice au couple d'amorces "A"/"B" de séquence complémentaire pour un nouveau cycle d'élongation/déplacement. Les brins déplacés ont alors une Longueur correspondant à la séquence délimitée par les amorces. L'hybridation consécutive de l'amorce "B" de séquence complémentaire suivie de son élongation par la polymérase permet d'obtenir une molécule d'ADN double brin comportant à chaque extrémité les sites de coupure de l'enzyme de restriction BsoBI c'est -à-dire la cible nécessaire à l'étape d'amplification.

b) Processus d'amplification de la cible

La cible obtenue dans l'étape précédente est le point de départ du processus d'amplification.

L'enzyme de restriction BsoBI coupe spécifiquement en son site de reconnaissance, un seul des brins de la cible, sur B1 ou sur B2. Cette coupure simple brin s'explique par l'incorporation depuis le début du processus de dATP modifiés.

Après cette coupure, une nouvelle « amorce » est générée et à partir de laquelle l'ADN polymérase va synthétiser un nouveau brin et déplacer le brin coupé. Le brin déplacé est une copie supplémentaire de la séquence cible et sert de matrice pour une nouvelle étape d'hybridation-élongation.

La société Becton Dickinson a développé un automate et des tests basés sur cette technique sous le nom BD ProbeTec™ [15].

5.5- Détection des produits SDA

La détection de produit SDA peut être réalisée en utilisant l'électrophorèse sur gel ou le suivi en temps réel.

5.6- Applications de la technique SDA

La SDA est appliquée dans divers domaines [30] :

- Elle est utilisée dans l'identification des agents infectieux tels que la tuberculose dans le but de diagnostiquer la maladie
- Elle est utilisée dans la détection des agents infectieux :
 - en bactériologie, Les efforts actuels sont dirigés vers des bactéries telles que *Mycobacterium tuberculosis*, la chlamydia, les mycoplasmes, *Haemophilus influenzae*, la gonorrhée et les espèces *Legionella*, *Shigella* et *Salmonella*
 - En virologie La recherche sur les virus, tels que le VIH, l'herpès et l'hépatite
 - Également en mycologie pour les différentes infections fongiques candidoses
- Elle est utilisée également à la caractérisation des cancers
- Elle est utilisée en criminalistique pour identifier les suspects par leur ADN

5.7- Avantages et inconvénients de la technique SDA

La SDA présente plusieurs avantages parmi lesquels :

a) Avantages de la SDA

- Test rapide
- Existence de la SDA-multiplex
- Protocol simple à réaliser
- Possibilité d'amplifier l'ADN et l'ARN
- Bon rendement (10^{10} fragments en moins de 30 minutes)

b) Inconvénients de la SDA

La SDA a aussi quelques inconvénients [38] :

- La principale limitation de la méthode SDA est qu'elle n'est pas capable d'amplifier efficacement des séquences cibles longues.
- La deuxième limitation est que la SDA fonctionne à des températures relativement basses, ce qui produit des réactions de fond considérables, hybridations non spécifiques

6- Loop mediated isothermal amplification (LAMP)

6.1- Définition

Loop mediated isothermal amplification (LAMP) ou Amplification isotherme induite par boucle est actuellement l'une des méthodes isothermes les plus utilisées, elle a rapidement pris sa place dans les laboratoires de biologie moléculaire notamment ceux qui ne possèdent pas d'équipement pour la PCR. C'est une méthode d'amplification d'ADN/ARN simple et rapide qui se déroule dans un thermocycleur ou un bain marie à 65°C. Elle a été mise au point par Notomi en 2000 et développée par la compagnie japonaise Eiken Chemical Company (Tokyo) [37].

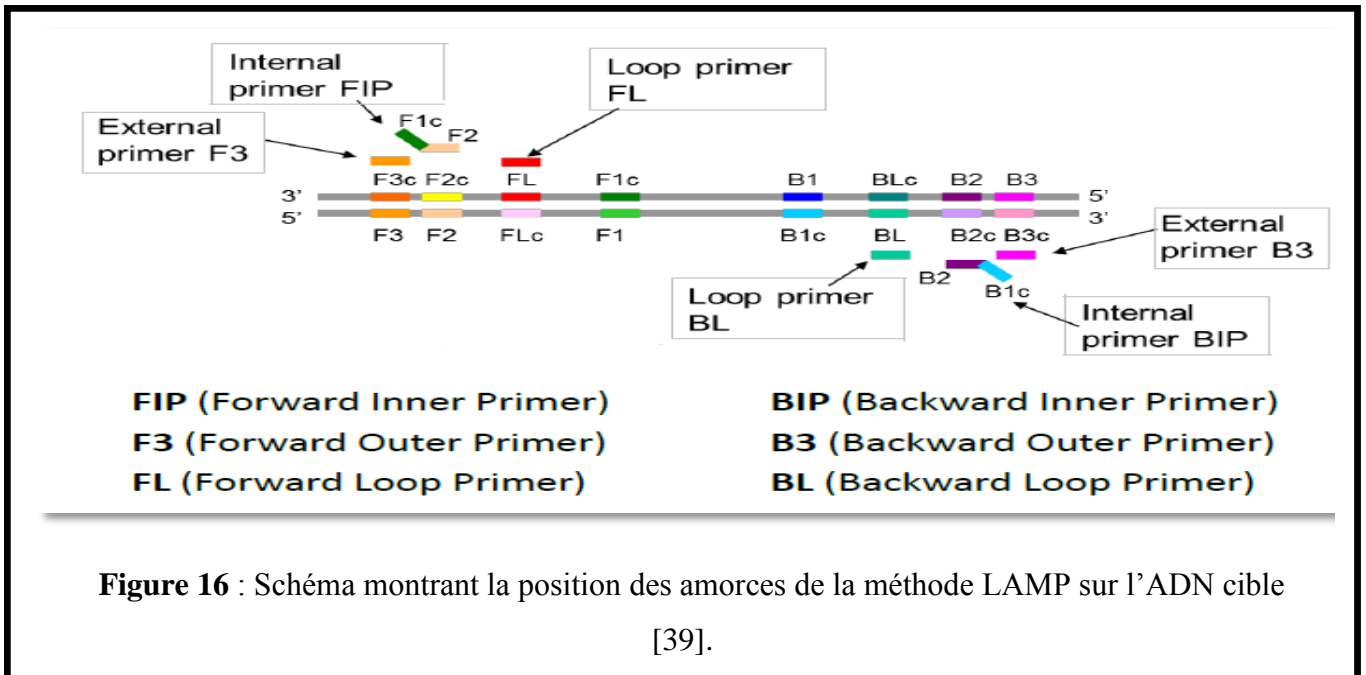
6.2- Principe de la technique LAMP

Son principe repose sur l'utilisation de six amorces d'où son extrême spécificité. Pour un cycle, l'hybridation de l'ADN cible avec les trois amorces sens permet l'élongation de ces dernières tandis que le brin néoformé s'hybride avec les trois amorces antisens pour assurer leur élongation [15] [16].

Les différentes amorces sont [39] :

- ✓ Une amorce sens interne (FIP : Forward Inner Primer)
- ✓ Une amorce sens externe (F3)
- ✓ Une amorce antisens interne (BIP : Backward Inner Primer)
- ✓ Une amorce antisens externe (B3)
- ✓ Une amorce boucle interne (LPF : Loop Primer Forward)
- ✓ Une amorce boucle externe (LPB : Loop Primer Backward)

La position de ces amorces est montrée dans le schéma suivant (**figure 16**) :



Comme on peut le constater sur le schéma [26] :

- L'amorce FIP contient 2 régions : la région F1c de l'extrémité 5' est complémentaire de la région F1 de l'ADN cible et la région F2 de l'extrémité 3' est complémentaire à la région F2c de la cible
- L'amorce F3 est complémentaire à la région F3c de l'ADN
- L'amorce BIP contient également 2 régions : la région B2 à l'extrémité 3' est complémentaire de la région B2c de l'ADN alors que la région B1c de l'extrémité 5' est complémentaire à la région B1 sur l'ADN
- L'amorce B3 est complémentaire de la région B3c de l'ADN cible
- Les amorces LPF et LPB quant à elles contiennent des séquences complémentaires de la région simple brin en boucle (single-stranded loop region)

6.3- Éléments réactionnels de la réaction LAMP

- Le tampon généralement utilisé est soit :
 - ✚ Le tampon Thermopool (*Bst*) composé de (1 X dilution : Tris-HCl= 20 mM ; pH=8,8 ; KCl=10 mM ; $(\text{NH}_2)_2 \text{SO}_4 = 10 \text{ mM}$; Triton-X 100 0,1% ; $\text{MgSO}_4 = 2 \text{ mM}$; New England Biolabs ; Ipswich ; MA) [40].
 - ✚ Le Tampon d'amplification isotherme 10 X (*Bst* 2.0) dont la composition est Tris-HCl 20 mM ; $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4 = 10 \text{ mM}$; KCl =150 mM ; $\text{MgSO}_4 = 2 \text{ mM}$; 0,1% de Tween® 20 ; pH =8,8 à 25 °C [40].

- 6 amorces, citées plus haut
- Des dNTP
- Le $MgSO_4$
- La betaine
- L'ADN polymérase *Bst* (dérivée de *Bacillus stearothermophilus*)
- L'ADN matrice
- L'eau ultra pure

L'amplification a lieu dans un thermocycleur, bloc chauffant ou un bain marie [41].

6.4- Étapes de la méthode LAMP

Contrairement à la PCR classique, la méthode LAMP ne contient pas d'étape de purification ou de dénaturation de l'ADN bicaténaire ce qui explique la rapidité de l'analyse [42].

Elle se déroule en 3 principales étapes : hybridation de la cible avec trois amorces sens suivie d'une élongation ; hybridation du nouveau brin avec trois amorces anti-sens suivie d'une élongation et enfin une révélation [42].

Les différentes étapes de la réalisation de l'amplification isotherme induite par boucle sont montrées sur la figure [26] (**Figure 17**) :

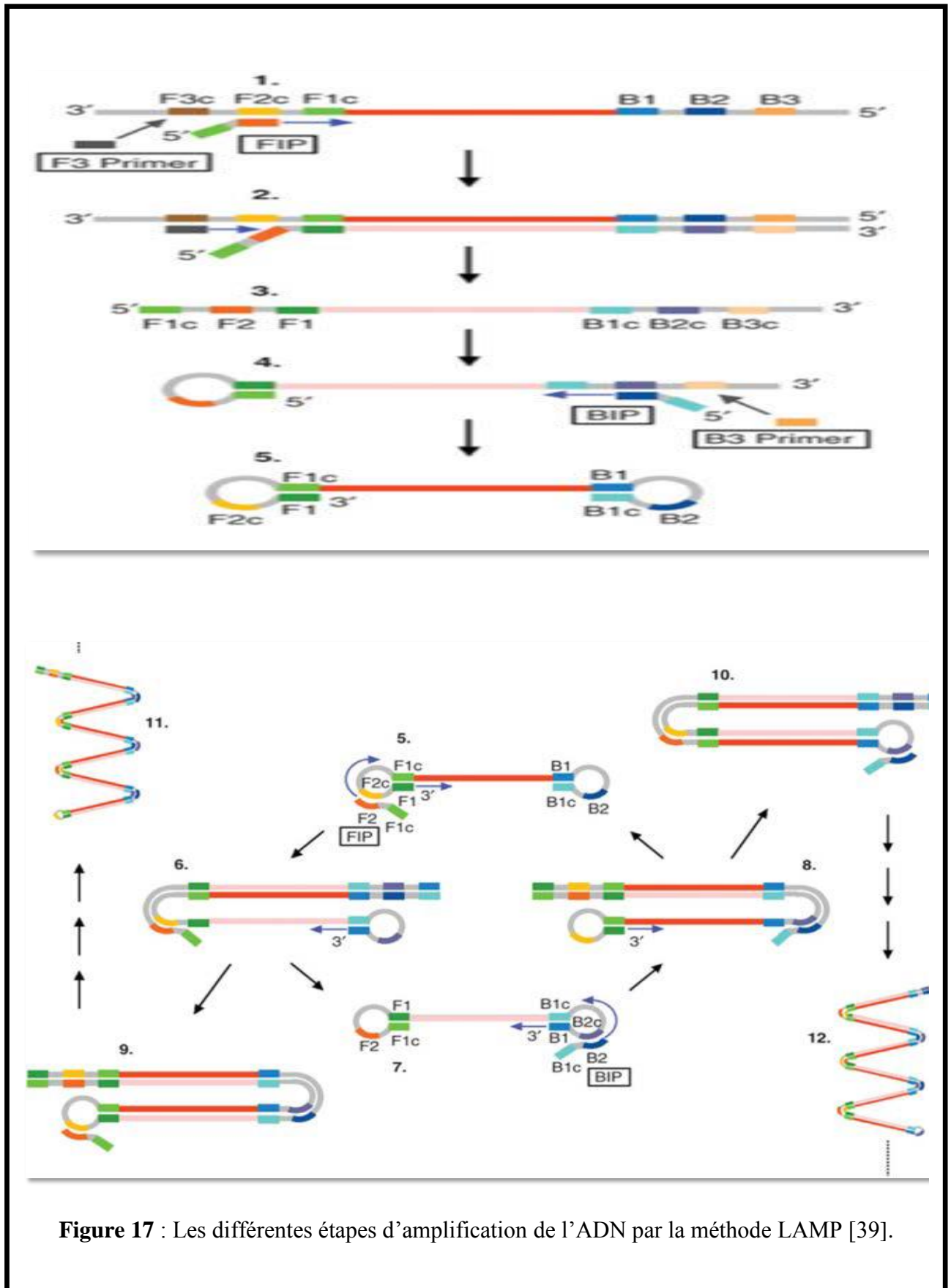


Figure 17 : Les différentes étapes d'amplification de l'ADN par la méthode LAMP [39].

a) Hybridation avec les trois amorces sens

1. D'abord l'amorce FIP s'hybride avec sa région complémentaire sur l'ADN double brin (pas besoin de dénaturation des 2 brins d'ADN) pour initier la synthèse du nouveau brin d'ADN complémentaire grâce à l'enzyme ADN polymérase *Bst*. Cette dernière, grâce à son activité de déplacement de brin, permet le déplacement et la synthèse d'un fragment d'ADN simple brin.
2. L'ADN polymérase *Bst* commence à synthétiser le brin d'ADN complémentaire à partir de l'extrémité 3' de la région F2 de l'amorce FIP.
3. L'amorce F3 s'hybride à sa région complémentaire de l'ADN et à l'extérieur de l'amorce FIP et initie la synthèse du brin d'ADN par déplacement.
4. Un fragment d'ADN double brin se forme à partir de l'amorce F3 et le brin d'ADN matrice.
5. Le brin d'ADN lié à l'amorce FIP est alors libéré suite à la synthèse du brin d'ADN complémentaire par déplacement à partir de l'amorce F3.

A la fin de cette étape, une structure sous forme de boucle se forme à l'extrémité 5' grâce la complémentarité entre les régions F1 et F1c.

b) Hybridation du nouveau brin avec trois amorces anti-sens

6. L'amorce BIP s'hybride au brin d'ADN produit lors de l'étape précédente, et après le retour de la structure de l'ADN à la forme linéaire, elle initie la synthèse de l'ADN complémentaire à partir de l'extrémité 3'.
L'amorce F3 s'hybride à l'extérieur de l'amorce BIP, toujours dans l'extrémité 3' et commence la synthèse du brin d'ADN complémentaire grâce à l'activité de l'ADN polymérase *Bst* (par déplacement de brin d'ADN). Ainsi le brin d'ADN formé à partir de l'amorce BIP est déplacé et libérée comme un fragment d'ADN simple brin, et ceci avant la synthèse à partir de F3.
7. Le brin d'ADN synthétisé grâce à la méthode de déplacement de brin et l'ADN cible perdent la structure en boucle générée (la même que l'étape 5) et redeviennent linéaires.
A la fin de cette étape, une molécule d'ADN double brin linéaire est formée.
8. A chaque extrémité du même brin et entre les séquences complémentaires (exemple : F1 et F1c), il se forme une queue en forme de boucle (stem-loop) qui ressemble à une structure d'haltère. Grâce à la complémentarité des amorces loop avec les régions simple brin en boucle à l'extrémité 5' (et même entre les régions F1 et F2 ou B1 et B2) de la

structure en haltère, le nombre de points d'amorçage pour la synthèse de l'ADN par la méthode LAMP augmente.

9. Après la formation des structures en haltère, le cycle d'amplification par la méthode LAMP commence. Les amorces LPF et LPB s'hybrident à leur séquences complémentaires et initie l'amplification. A la fin de chaque cycle, une augmentation de la taille et du nombre de produits est remarquée.

5.5- Révélation des produits LAMP

La formation d'un précipité blanc permet la révélation et la détection facile des produits LAMP. En effet, les sous-produits générés de couleur blanche peuvent être détectés en réalisant différentes méthodes de détection telles que l'électrophorèse, la détermination turbidimétrique, des méthodes électrochimiques ou colorimétriques (par exemple le Sybr Green) [42].

5.6- Applications de la technique LAMP

La compagnie Eiken Chemical Company a récemment annoncé deux développements majeurs :

- ✓ La détection de l'agent de la tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*) à partir d'un échantillon d'expectoration (crachat) non traité en seulement 50 minutes en utilisant les kits : Loop amp Tuberculosis Complex Detection Reagent Kit
- ✓ Développement de test pour le HAT (Hmain African Trypanosomiasis) dont de nombreux essais ont été réalisés au Congo et en Uganda en 2012 [42].

De plus, la technologie LAMP est utilisée pour le diagnostic en ciblant *Clostridium difficile* dans des échantillons de selles en moins d'une heure, grâce aux kits développés par la compagnie Meridian Bioscience, Cincinnati, OH [37].

5.7- Avantages de la technique LAMP

Cette technique présente plusieurs avantages [37] :

- Tolérance aux substances inhibitrices de la PCR
- Haute sensibilité
- Rapidité de l'analyse (gain de temps)
- Pas besoin de matériel sophistiqué (donc moins coûteuse)
- Disponibilité des kits sur le marché

5.8- Les inconvénients de la technique LAMP

Malgré ces avantages, il existe certains inconvénients associés à cette technique :

- Risque de contamination par d'autres acides nucléiques
- Ne peut pas être utilisé pour l'amplification de séquences de tailles supérieures à 300 pb.

Chapitre III

Comparaison entre les techniques d'amplification

1- Introduction

La découverte de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est venue bouleverser le monde des diagnostics médicaux, en effet elle est devenue la plus utilisée pour l'amplification de l'ADN, la détection et l'identification de maladies infectieuses, les troubles génétiques...etc., avec une grande facilité et précision. L'amélioration de la PCR a conduit au développement de diverses techniques de détection moléculaire qui comporte plusieurs variantes de PCR (la PCR nichée ; PCR multiplex détaillées dans le chapitre I).

Chaque technique a cependant des avantages et des inconvénients [43]. Les principaux inconvénients de la PCR sont :

- I) Le besoin d'un instrument sophistiqué pour maintenir une température variable avec un temps variable (thermocycleur pour séparer deux brins d'ADN puis amplifier le fragment requis)
- II) La durée de trois à quatre heures pour connaître le résultat
- III) L'extraction de l'ADN des échantillons avant d'effectuer la PCR
- IV) La difficulté de sa réalisation sur l'ARN

Bien que ce soit une méthode passionnante pour le diagnostic des microorganismes, ces points négatifs sont devenus un obstacle qui nécessite quelques modifications afin que l'utilisateur final en bénéficie. Pour diminuer les difficultés rencontrées avec la PCR, plusieurs techniques capables d'amplifier l'ARN ainsi que l'ADN à une température constante étaient une exigence, dont l'ensemble est décrit dans le chapitre précédent (chapitre II). Cette partie va être consacrée à la comparaison de ces deux techniques (PCR classique et méthodes isothermes).

2- Paramètres de comparaison

Toutes les techniques d'amplification isothermes et même la PCR classique diffèrent les unes des autres en termes de l'utilisation de la matrice, température et durée de réaction, nombre d'amorces et d'enzymes, tolérance aux inhibiteurs et détection du produit et aussi des champs d'application.

2.1- Spécificité

Toutes les méthodes précédemment décrites (**chapitres I et II**) ont un objectif commun, elles s'intéressent à l'amplification des deux types d'acides nucléiques avec une certaine spécificité (préférence) pour chacun. Par exemple la méthode NASBA est conçue spécialement pour amplifier de l'ARN monocaténaire, la TMA aussi, donc leur matériel de départ est limité à l'acide nucléique ARN simple brin. Mais les deux techniques offrent un avantage considérable quant il s'agit de l'amplification et la détection des agents pathogène à ARN. Cependant, la PCR classique, la SDA et LAMP amplifient l'ADN.

2.2- Température d'amplification

Concernant la température de réaction, elle est constante dans toutes les techniques isothermiques selon un processus d'amplification continue de la cible et en se basant sur le déplacement des séquences lors de l'étape de dénaturation de l'ADN, et ceci concerne principalement la méthode LAMP, par contre dans la PCR classique, la température suit un cycle thermique : Cycles de chauffage et de refroidissement répétés visant la dénaturation de l'ADN (94°C) et la réplication enzymatique de l'ADN (55°C, puis 72°C) ; dont elle suit un processus thermique variable.

2.3- Nombre d'amorces et d'enzymes

La NASBA, la TMA et la PCR utilisent deux amorces simples à concevoir. Les deux techniques isothermes (NASBA et TMA) nécessitent trois étapes enzymatiques différentes (transcription ; synthèse d'ADN_c ; dégradation d'ARN) avec un nombre d'enzyme différent, respectueusement trois pour la première et seulement deux pour la deuxième, pour accomplir une amplification isotherme d'ARN. La méthode LAMP nécessite six amorces spécifiques, la SDA quatre, dont la conception est qualifiée de complexe pour une nouvelle utilisation. Quant aux enzymes la LAMP utilise une seule, la SDA nécessite deux. La PCR a besoin uniquement d'une seule enzyme pour accomplir l'amplification.

2.4- Détection des produits

Concernant la détection des produits, deux méthodes sont majoritairement employées pour toutes les techniques : l'électrophorèse sur gel d'agarose et la détection en temps réel. La méthode ELISA est également utilisée à l'exception de la SDA et LAMP. Cette dernière possède d'autres méthodes de détection telles que la colorimétrie et la turbidimétrie, qui offre un avantage pour visualiser le résultat positif directement à travers l'écran du turbidimètre en temps réel. De plus, le turbidimètre en temps réel peut être réglé pour mesurer la concentration du tube à des intervalles de secondes [44].

2.5- Agent dénaturant

La NASBA, TMA dans le cas où la cible est un ADN, et la SDA peuvent être considérées comme étant des méthodes d'amplification isothermes, ces trois méthodes nécessitent une étape initiale de dénaturation thermique (séparation des deux brins d'ADN). Au cours de la réaction d'amplification l'agent dénaturant est principalement de type enzymatique : la RNase H dans NASBA, l'activité RNase de la polymérase chez TMA et l'enzyme de restriction dans la SDA. Pour la PCR l'agent dénaturant est principalement la température (95°C). Concernant la LAMP c'est le travail simultané de la betaine et l'ADN polymérase avec l'activité de déplacement de brin.

2.6- Tolérance aux inhibiteurs

Un des avantages les plus importants des techniques d'amplification isothermes est lié à leurs tolérances à certains inhibiteurs y compris les substances organiques et inorganiques telles que détergents, antibiotiques, composés phénoliques, enzymes, les polysaccharides, les graisses, les protéines et les sels (chapitre I) qui affectent l'efficacité de la PCR. Kaneko et al [45]., ont évalué la tolérance de LAMP à une culture moyenne et certaines substances biologiques. Selon cette étude, la sensibilité de LAMP était moins affectée par les différents composants des échantillons cliniques que la PCR; par conséquent, l'étape de la purification de l'ADN peut être éliminée. De ce fait LAMP aura la capacité de générer 10^9 copies d'ADN, et pourra détecter des acides nucléiques directement dans des échantillons biologiques en seulement 15 à 60 minutes. Cela réduit directement le temps de traitement des échantillons et le coût global de la méthode la PCR classique [23] [40], et offrent à LAMP des avantages supplémentaires qui la rendent plus efficace que NASBA, TMA ou SDA.

Tableau 05. Principales propriétés des diverses techniques d'amplification isothermes et de la PCR [30].

Techniques	PCR classique	Techniques isothermes			
	PCR	NASBA	TMA	SDA	LAMP
Amplification de l'ADN	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Amplification de l'ARN	Oui	Oui *	Oui *	Oui	Oui
Température de l'amplification	Trois températures : 94°C ; 55 à 60°C ; 72°C	37°C - 42°C	37°C - 42°C	37°C	65°C
Nombre d'enzyme utilisé au cours de la réaction d'amplification	1	3	2	2	1
Conception des amorces	Simple	Simple	Simple	Complexe	Complexe
Amplification multiplex	Oui	Oui	Oui	Non	Oui
Méthodes de détection des produits	Électrophorèse sur gel ; ELISA ; temps réel	Électrochimiluminescence (ECL) ; Électrophorèse sur gel ; ELISA ; temps réel	Électrochimiluminescence (ECL) ; Électrophorèse sur gel ; ELISA ; temps réel	Électrophorèse sur gel ; temps réel	Électrophorèse sur gel ; Turbidimétrie ; Colorimétrie ; Temps réel.
Tolérances aux composants biologiques	Non	Non	Non	Non	Oui
Besoin d'une étape de dénaturation	Oui	Oui	Oui	Oui	Non
Agents dénaturant	Chaleur	RNase H	Activité RNase de l'ADN polymérase	Enzyme de restriction	Betaine
Instrumentation	Thermocycleur	Bain marie	Bain marie	Bain marie	Bain marie ou bloc chauffant

* : cible ARN monocaténaire (la technique est spécifique à l'ARN)

2.7- Le coût

Les méthodes d'amplification isotherme offrent des avantages significatifs par rapport à la PCR car elles ne nécessitent pas d'appareil coûteux et sophistiqué (**Tableaux 06 et 07**).

Tableau 06. Exemple de fabricants et de produits disponible dans le commerce utilisant la technologie d'amplification d'acides nucléique isothermes [30].

Méthode d'amplification	Produit commercialisé	Préparation des échantillons	Législation	Tests disponibles	Durée du test (échantillonnage - résultat)	Coût en dollars ou euro
PCR	-Roche Diagnostics System -Bayer	Oui	Oui	Presque tous les micro-organismes	1 à 2 jours	30 à 60 € par pathogène
NASBA	- OligoC-TesT -CorisBioConcept -Belgium	Non	Oui	<i>Leishmania</i> et <i>Trypanosoma cruzi</i>	100 minutes	26 \$ par test
	-NucliSENSEasyQ -BioMerieuxFrance	Oui	Oui (CE)	HPV HSV RSV SARM VIH-1 charge virale Entérovirus	120 minutes	5000\$
TMA	- APTIMA/Tigris -Gen-Probe USA		oui (FDA et CE)	- <i>Neisseria gonorrhoeae</i> - <i>Chlamydia trachomatis</i> Virus du papillome humain(HPV) <i>Trichomonas Vaginalis</i> (TV)	3 heures et 30 minutes	Non disponible
SDA	-ProbeTec Becton -Dickinson & Co USA	Oui	oui (FDA et CE)	- <i>Neisseria gonorrhoeae</i> - <i>Chlamydia trachomatis</i> HSV 1 et 2	60 minutes	Non disponible
LAMP	- Genie II (OptiGene, UK)	Non	Non (dosages dans développement)	Compatible avec plus de fluorescence à base du dosage	15 à 20 minutes	13 000\$
	- Illumigene Meridian Bioscience	Non	oui (FDA et CE)	Isotherme <i>C. difficile</i> Group B <i>Streptococcus</i>	60 minutes	Non disponible

Tableau 07. Tarifs hors taxes en euros des analyses effectuées au niveau des laboratoires de biologie moléculaire appliqués en France (Octobre 2014).

BIOLOGIE MOLECULAIRE		Coût (€)
Préparation-Extraction d'échantillons pour recherche par PCR en santé animale	Echantillon	12,77
Recherche agents microbiens par P.C.R. temps réel simplex ou multiplex par analyse individuelle sur sang (extraction comprise)	Analyse	35,86
Recherche agents microbiens par P.C.R. temps réel simplex ou multiplex par analyse individuelle sur organes (extraction comprise)	Analyse	48,64
Recherche agents microbiens par P.C.R. simplex ou multiplex par analyses de mélange sur sang (extraction comprise)	Analyse	40,60
Recherche agents microbiens par P.C.R. simplex ou multiplex par analyses de mélange sur organes (extraction non comprise)	Analyse	53,38

2.8- Applications

En vue de la détection et de la quantification de la charge virale, l'utilisation de la méthode NASBA a montré que le suivi des patients atteints du VIH 1 par la méthode NASBA NucliSENS EasyQ® HIV-1 v1.1 a une spécificité comparable (99.4 %) et une sensibilité et sélectivité supérieures aux techniques PCR *Versant HIV-1 RNA* (Bayer®) et *Cobas Amplicor HIV-1 Monitor version 1.5* (Roche Diagnostic Systems®) [26]. Une autre étude de quantification par NASBA est également utilisée dans le cadre du suivi de la charge virale des patients atteints du VHC. Dans ce cas, la sensibilité de la méthode NASBA a été évaluée 10 fois supérieure à celle de la PCR *Quantiplex HCV-RNA* (Bayer®) et comparable à la technique *HCV Monitor PCR based assay* (Roche®) [30]. Des méthodes NASBA ont aussi été développées dans le diagnostic des infections aux Flavivirus : une approche basée sur la détection de gènes d'enveloppe du West Nile virus a montré une sensibilité 1000 fois supérieure à celle de la RT-PCR standard et équivalente à la PCR Taqman (Roche®) [46] [47]. La technique LAMP a été développée pour l'identification rapide d'une grande variété de bactéries, y compris *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, espèces de *Leptospira*, *Salmonella Typhi* et *Escherichia coli*.

Kaneko et ses collaborateurs ont prouvé à travers leur étude effectuée sur *S. aureus* que LAMP était spécifique par rapport à la PCR. En utilisant des conditions optimales avec un temps de détection plus court comparé à la PCR dans l'identification de *S. aureus* [45] [46].

2.9- Législation et déontologie

Les critères pour les tests diagnostiques idéals Selon l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) sont :(1) sensibilité ; (2) spécificité ; (3) faible coût ; (4) simplicité ;(5) rapidité ;(6) acceptable à toute sorte de variation climatique et (7) disponibilité facile des instruments [49]. Les méthodes d'amplification et de détection des acides nucléiques basées sur la PCR semblent avoir des qualités de sensibilité et de spécificité mais manquent d'autres qualités comme la rapidité et nécessitent des instruments coûteux (thermocycleur). Les techniques d'amplification isothermes satisfont aux autres qualités énoncées par l'OMS. Parmi les techniques d'amplification isothermes, LAMP se distingue comme étant un test de diagnostic efficace. C'est un outil de diagnostic préféré en raison de la facilité avec laquelle il peut être effectué même si le principe et le mécanisme de réaction sont un peu compliqués [50].

Conclusion

L'amplification de l'ADN est devenue un élément incontournable en biologie moléculaire. Son application est désormais étendue à plusieurs domaines notamment le diagnostic médical et l'identification des organismes.

La mise au point des méthodes d'amplification des acides nucléiques *in vitro* est rendue possible grâce à l'automatisation de ces techniques par l'utilisation d'un thermocycleur et des kits spécifiques.

Le but principal de notre étude est d'évaluer et comparer les caractéristiques des techniques d'amplification isothermes par rapport à la PCR classique. Cette dernière a permis le progrès et l'évolution de la biologie moléculaire ainsi que le développement de plusieurs de ses variantes, néanmoins, malgré son succès la PCR est peu à peu abandonnée au profit des techniques d'amplification isothermes qui ont rapidement envahi les laboratoires de recherche et d'analyse en raison de leurs avantages et applications multiples. Ces nouvelles techniques telles la NASBA, la TMA, la SDA ou encore la LAMP offrent des avantages considérables comparées aux méthodes classiques essentiellement le temps et le coût. En plus de la possibilité de l'amplification de l'ADN et de l'ARN, les méthodes isothermes présentent une meilleure sensibilité et spécificité. Elles permettent également un gain de temps considérable en évitant la dénaturation préalable de l'acide nucléique et le changement de température après chaque cycle, aussi, sur le point de vue économique, ces techniques ne nécessitent pas un matériel sophistiqué pour leur réalisation ce qui les rend nettement moins cher que la PCR classique. Pour ces différentes raisons, les techniques d'amplification isothermes sont aujourd'hui de plus en plus répandues dans les laboratoires de biologie moléculaire à travers le monde.

En Algérie, ces méthodes ne sont malheureusement pas encore exploitées dans les laboratoires en raison de non disponibilité des kits, des amorces et des enzymes. Sans ces méthodes qui, deviennent obligatoires aujourd'hui, toute recherche menée dans tous les domaines en biologie restera vaine et sans intérêt.

Annexe

ANNEXE

Atelier de biologie moléculaire : extraction, purification et amplification d'ADN d'*Escherichia coli* par réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

Laboratoire 16 ; le 25/04/2018 ; heure : 8h30-17h ; spécialité : M2 mycologie et biotechnologie fongique.

Introduction

Notre travail consiste à étudier et comparer ces différentes techniques isothermes par rapport à la PCR. Pratiquer une de ces techniques au niveau de notre faculté est rendue impossible vu le manque du matériel nécessaire (kits, amorces, enzymes). A cause de cette contrainte, on a juste eu l'occasion d'assister à deux ateliers de biologie moléculaire, dont le premier on s'est contenté de l'observation et le deuxième on l'a pratiqué de l'extraction de l'acide nucléique à la révélation.

A travers ce rapport, nous allons bien détailler la PCR en abordant notamment ses différentes étapes, en expliquant les manipulations et en analysant nos résultats.

Étapes de la PCR

Un cycle de PCR est constitué de trois étapes effectuées à des températures différentes permettant de contrôler l'activité enzymatique. Pour effectuer ces transitions de températures, des micro-tubes contenant le mélange réactionnel également l'acide nucléique à amplifier sont placés dans un appareil programmable : un thermocycleur. Ce dernier permet d'exposer des tubes à des températures choisies et pour des durées déterminées par le manipulateur. La réaction PCR dure environ 2 à 3 h (pour une PCR de 25 à 30 cycles).

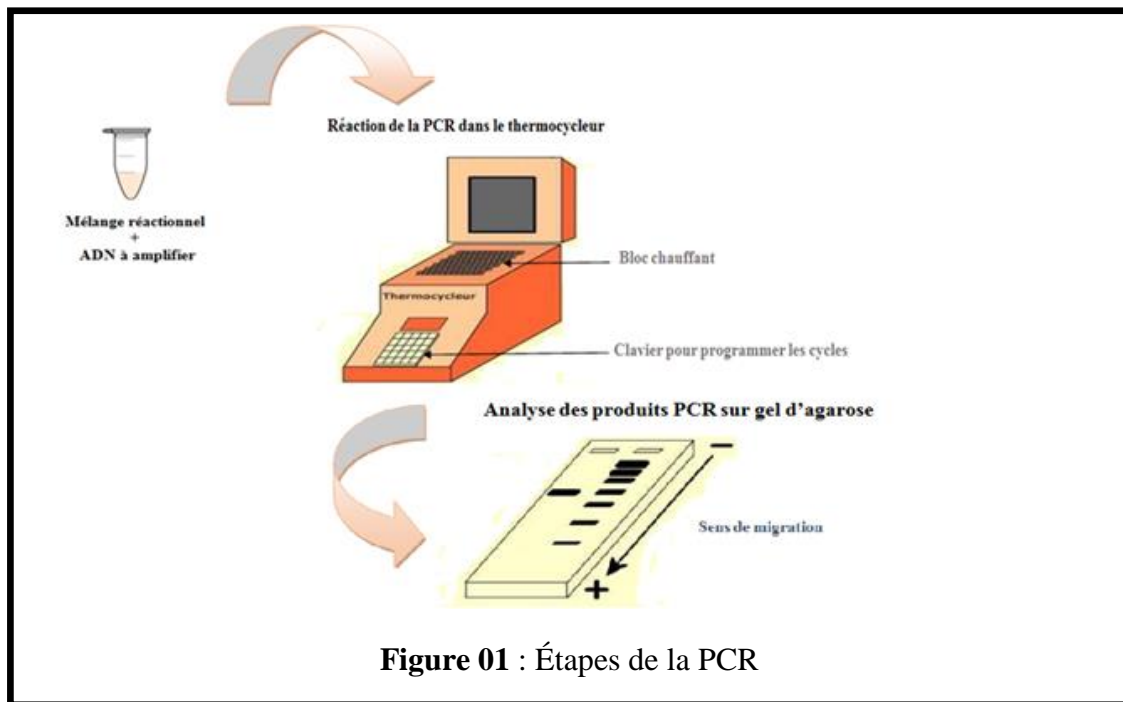


Figure 01 : Étapes de la PCR

1) Buts de l'atelier

- Extraction d'ADN génomique d'une bactérie à Gram négatif *Escherichia coli*.
- Réalisation d'un profil électrophorétique sur gel d'agarose afin de vérifier la présence de l'ADN purifié.
- Amplification par PCR d'une partie conservée : le gène ADNr16s ainsi qu'une colonie d'*E. coli* en utilisant des amorces spécifiques.
- Détection du produit amplifié après migration sur gel d'agarose.

2) Manipulation :

a- Extraction et purification de l'ADN génomique d'*Escherichia coli*

❖ Extraction

A proximité du bec Bensen (pour éviter toute contamination issue d'ADN étranger), on prélève une colonie d'*Escherichia coli* à partir d'une culture pure à l'aide d'une anse de platine. Ensuite, on suspend la colonie dans 600 μL de solution de lyse afin d'éclater les cellules et faire sortir leurs constituants dans la solution grâce aux détergents qu'elle contient.

Pour que cette dernière étape soit efficace, une incubation au bain marie à 80°C pendant 5 minutes est nécessaire.

❖ Purification

Après la lyse cellulaire, on ajoute 1 μL d'ARNase puis on incube à 37°C pendant 15 à 30 minutes pour éliminer les ARN qui constituent une contamination pour l'ADN.

On laisse refroidir pendant 5min à température ambiante avant d'ajouter 200 μL de protéinase K afin d'éliminer les protéines qui, tout comme les ARN, constituent une source majeure de contamination de l'ADN. Après une incubation dans la glace pendant 5 minutes, on procède à une centrifugation pendant 3 minutes à 13000 rpm pour ensuite récupérer le surnageant ne contenant que l'ADN génomique (les protéines et les débris cellulaires de grand poids moléculaire sont alors dans le culot).

❖ Précipitation de l'ADN

Dans un tube propre de 1,5 ml, on transfère le surnageant précédemment récupéré et auquel on rajoute 600 μL d'isopropanol, ce dernier permet la précipitation de l'ADN génomique et l'apparition d'une pelote blanche. Pour récupérer l'acide nucléique purifié on doit d'abord passer par une centrifugation pendant 3 minutes à 13000 rpm pour ensuite récupérer le culot qui contient l'ADN pur.

❖ Réhydratation de l'ADN

Un lavage de notre ADN génomique est essentiel et c'est pour cela qu'on ajoute 600 μL d'éthanol suivi par une centrifugation pendant 3 minutes à 13000 rpm. Après cette étape on élimine le surnageant pour ne garder que le culot. Ensuite, on renverse le tube sur du papier absorbant puis on le retourne et on le laisse sécher à l'air libre.

Enfin, on ajoute 100 μL de solution de réhydratation (dans notre cas c'est l'eau distillée) et on incube pendant 1h à 65°C. L'échantillon est alors prêt pour l'analyse.

Fiche technique

Extraction et purification de l'ADN génomique d'*Escherichia coli*

Laboratoire 16 de biologie moléculaire ; durée totale : environ 4 heures

Matériels et méthodes	Produits utilisés	Observations	Préventions
Allumage du bec et prélèvement d'une colonie à l'aide d'une anse de platine	Culture pure d' <i>E.coli</i>		Une ou deux colonies ; conditions stériles
Suspendre la colonie dans 600 µL de solution de lyse	Solution de lyse	Trouble	S'assurer que la colonie est dans le tube
Vortex 3-5 secondes			Bien mélanger sans tarder
Incubation au bain marie 80°C pendant 5 minutes			Se disposer d'un flotteur
Refroidissement des tubes pd 5minutes à température ambiante			
Ajout d'un 1 µL d'ARNase	Enzyme ARNase		Bien régler la micropipette
Incubation à 37°C pendant 15-30 minutes			Réglage de la température et la disposition d'un chronomètre
Refroidissement à température ambiante pendant 5 minutes			
Ajout de 200 µL de solution de protéinase K ; vortex	Solution protéinase K		Bien régler la micropipette
Incubation dans la glace pendant 5 minutes			Becher bien rempli de glace
Centrifugation 3 minutes à 13000 rpm			Bien équilibrer les tubes dans la centrifugeuse Réglage du temps et la vitesse
Récupération du surnageant à l'aide d'une micropipette			Veiller à ne pas prélever les débris
Transfert du surnageant dans un tube propre de 1,5 mL			Dépôt de la quantité entière du surnageant
Ajout de 600 µL d'isopropanol	Isopropanol	Formation de pelotes d'ADN	
Centrifugation 3 minutes à 13000 rpm			Bien équilibrer les tubes dans la centrifugeuse Réglage du temps et la vitesse
Élimination du surnageant			
Ajout de 600 µL d'éthanol	Éthanol à 70%	Solution transparente	
Centrifugation 3 minutes à 13000 rpm			Idem
Élimination du surnageant			
Séchage			Inverser le tube eppendorf sur un papier absorbant puis le laisser sécher à l'air libre
Ajout de 100 µL de solution de réhydratation	Eau distillée		Bien mélanger à l'aide d'une pipette
Incubation pendant une heure à 65°C			

b- PCR

Préparation du mélange réactionnel

Solutions mères	Concentrations finales	Quantité par réaction (25 uL)
H2O u.p	X	X µL
Tampon 10 x	1 x	2.5 µL
dNTPs (2,5 mM)	0.25 mM	2.5 µL
MgCl ₂ (2 mM)	0.2 mM	2 µL
Amorce A1 (10 µL)	0.1 µL	0.5 µL
Amorce A2 (10 µL)	0.1 µL	0.5 µL
Enzyme (au frigo introduit en dernier)	0.05 U par µL	0.25 µL

Amorces	Séquences	Températures de fusion(Tm)
Sens (A1)	5'TCAAGTGAATTGACGGGGGC3'	61°C
Antisens (A2)	5'GCCCCGGGAACGTATTCAC3'	58°C

On prépare une quantité suffisante du mélange réactionnel pour 11 tubes avant de disperser 23 µL du mix dans chaque tube pour avoir exactement la même quantité du mélange dans tous les tubes, puis on ajoute 2 µL d'ADN génomique dans chacun.

En ce qui concerne le dernier tube (tube n°3 : PCR en colonie), on verse 25 µL du mélange et on rajoute une colonie bien isolée d'*E.coli*.

Les dépôts se feront de manière organisée afin de ne commettre aucune erreur, pour cela, on place tous les constituants du mix dans l'ordre d'introduction dans le porte tube et à chaque prélèvement on doit se placer de manière à voir ce que l'on prélève et à vérifier qu'aucune bulle n'a été prélevée par la micropipette. Ensuite on referme chaque tube avant de déposer l'ADN afin d'éviter et à minimiser les risques de contamination. Enfin, on prend soin de déposer l'ADN dans le fond du tube pour éviter les pertes sur les bords et optimiser l'amplification, et on vortex sur les bords du vortex pour homogénéiser le mix avec l'ADN génomique.

On dépose les 11 tubes dans le thermocycleur qui contient à sa surface interne une fine couche de paraffine ce qui empêche l'évaporation du contenu des tubes lors de l'amplification.

Le thermocycleur est un appareil que l'on programme pour effectuer automatiquement les cycles de l'amplification avec des températures spécifiques des amorces.

Pour cette séance nous avons programmé l'appareil pour qu'il réalise :

- Une dénaturation initiale de l'ADN à 94°C pendant 10 minutes
- 25 cycles d'amplification comportant chacun :
 - Une phase de dénaturation de l'ADN à 94°C pendant 30 s
 - Une phase d'hybridation des amorces à 55°C pendant 30 s
 - Une phase d'élongation des amorces à 72°C pendant 30 s
- Une élongation finale à 72°C pendant 10 minutes.



Figure 02 : Thermocycleur utilisé au laboratoire

c- Électrophorèse

Le port d'une blouse en coton et à manches longues est obligatoire, des gants jetables. On doit également placer un papier absorbant sur la paillasse afin d'absorber les fuites possibles et préparer deux plaques une pour le gel à 1% et autre pour celui de 3%.

Tout d'abord, la poudre d'agarose est pesée à l'aide d'une spatule et d'une balance électronique. Cette poudre est transvasée dans un erlen dans lequel sont ajoutés les 50 ml du tampon TBE et on complète le volume avec de l'eau distillée.

Ce mélange est chauffé quelques minutes dans un four micro-ondes pour faire évaporer l'eau. Le chauffage entraîne la formation d'une mousse abondante en surface, ce qui a été prévu en utilisant un erlen de volume supérieur à celui de la solution.

Une solution antérieurement préparée de TBE est ajoutée et le mélange est agité manuellement, flacon ouvert. Pour finir, et au dernier moment, une goutte de BET est ajoutée

(liquide marron conservé dans un petit flacon fermé et étiqueté en raison de la photosensibilité). Le flacon est à nouveau agité manuellement de façon à obtenir un mélange homogène.

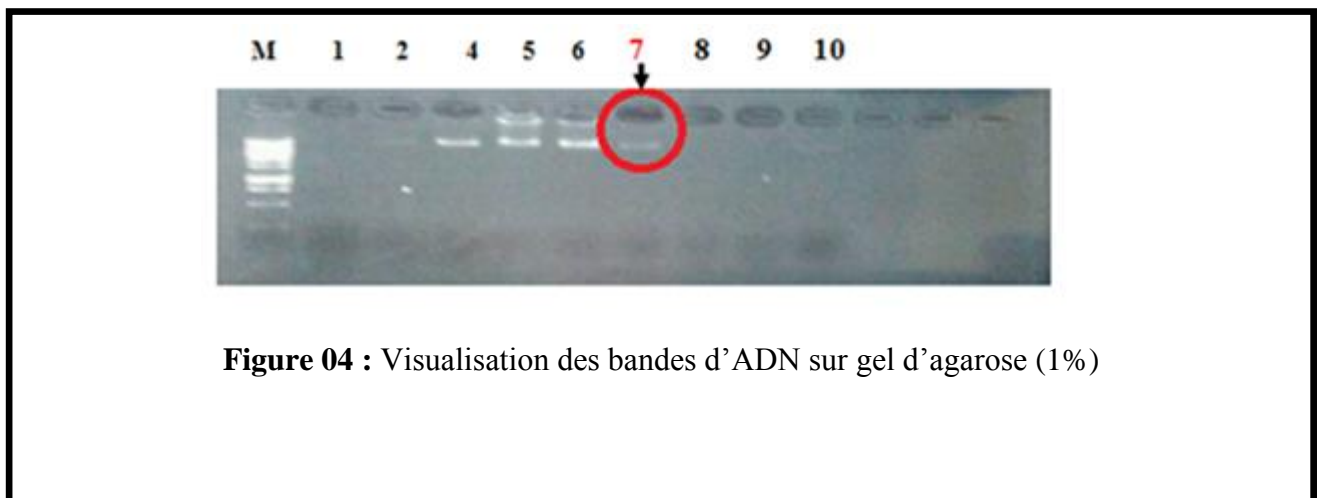
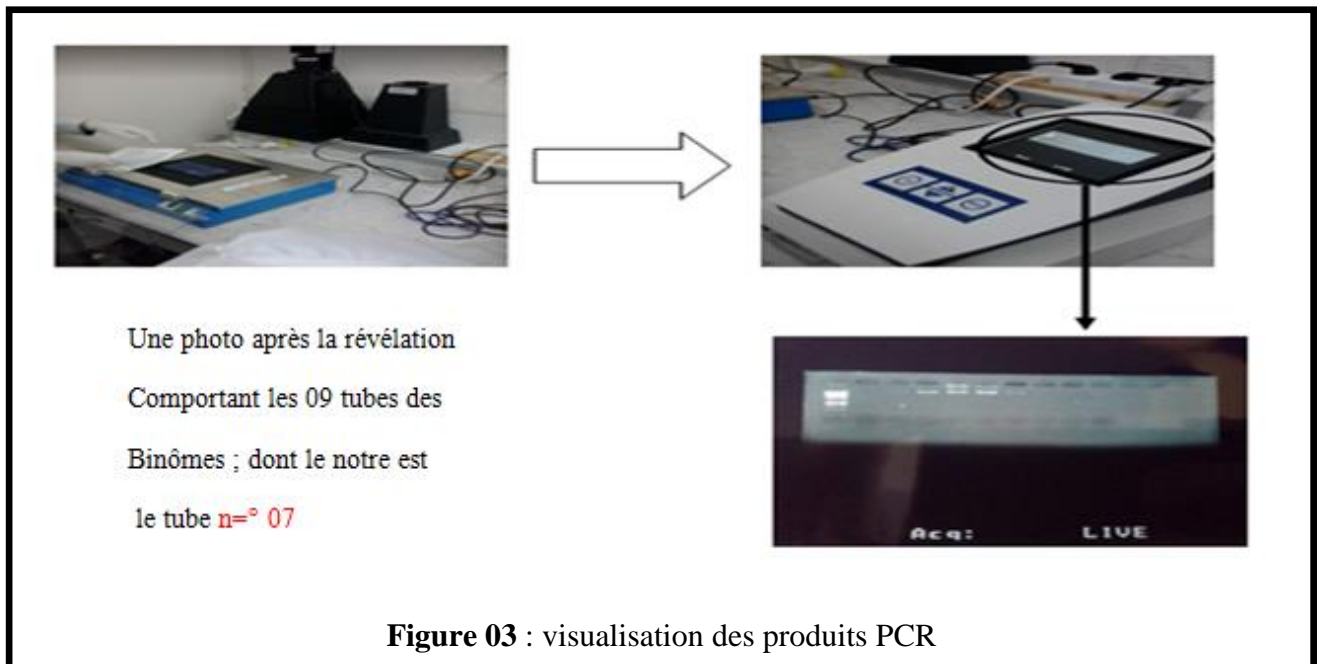
Le gel est ensuite coulé dans la cuve à électrophorèse en prêtant attention à limiter les fuites, les puits sont préparés à l'aide du peigne. La solidification du gel prend 15 à 25 mn. Une fois la solidification faite, les plaques sont placées horizontalement dans une cuve d'électrophorèse MUPID (Eurogentec) contenant le tampon et raccordées aux électrodes. Les fragments d'ADN génomique ainsi que les fragments d'ADN obtenus après PCR sont placés dans les puits des gels pour la migration, Les fragments de l'ADN génomique plus le marqueur de taille de 1 Kb sont chargés dans le gel à 1% par contre les produits PCR et le marqueur de taille de 450 Kb dans le gel de 3%.

La séparation électrophorétique est donc réalisée pendant 20 minutes à 100 V, une fois la migration terminée, la révélation se fait par autoradiographie (UV à 280 nm) dans une enceinte noire, fermée, qui ne peut être ouverte pendant la diffusion des UV ; la lecture se fait sur un écran de visualisation (non exposé aux UV). Le gel et la solution tampon qui contient du BET après la migration sont traités ultérieurement.

Concentration du gel d'agarose	Quantité du mix	Quantité de l'ADN	Quantité produit PCR	Quantité tampon de charge	Temps de migration	Taille marqueur	Voltage
1%	23 µL	02 µL	08 µL	02 µL	20 minutes	1 Kb	100 V
3%	23 µL	02 µL	08 µL	02 µL	20 minutes	450 pb	100 V

Observation et interprétation des résultats

a) Migration de l'ADN génomique sur un gel d'agarose à 1%



- M : c'est le marqueur de taille utilisé durant l'Atelier : 1 Kb
- Présence de bandes de la même taille dans les puits 4, 5, 6 et 7 ce qui explique la présence de l'ADN mais d'un taux de signal différent :
 - Pour les puits 4, 5, 6 : signal fort signifie la présence d'une grande quantité d'ADN dans l'échantillon (forte concentration).
 - Pour le 7^{ème} : une bande d'un signal moindre donc une petite quantité d'ADN présente dans l'échantillon (c'est le nôtre n^o=07)

- Absence totale de bandes pour le reste des tubes : 1, 8, 9 et 10 due à des erreurs de manipulation, ou une très petite quantité d'ADN (très faible concentration).

b) Migration des produits PCR sur gel d'agarose à 3%

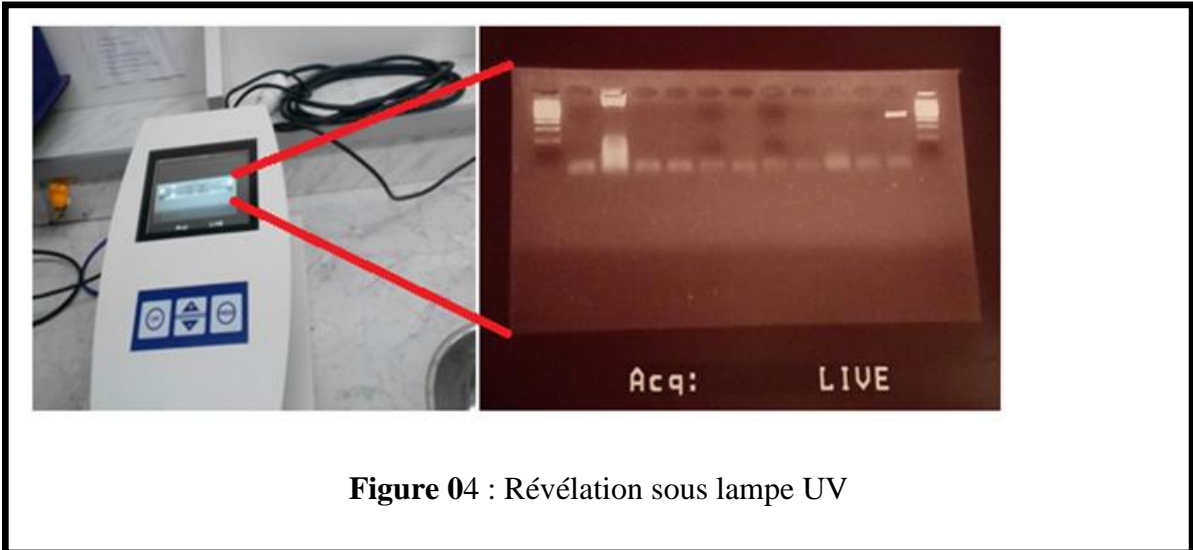


Figure 04 : Révélation sous lampe UV

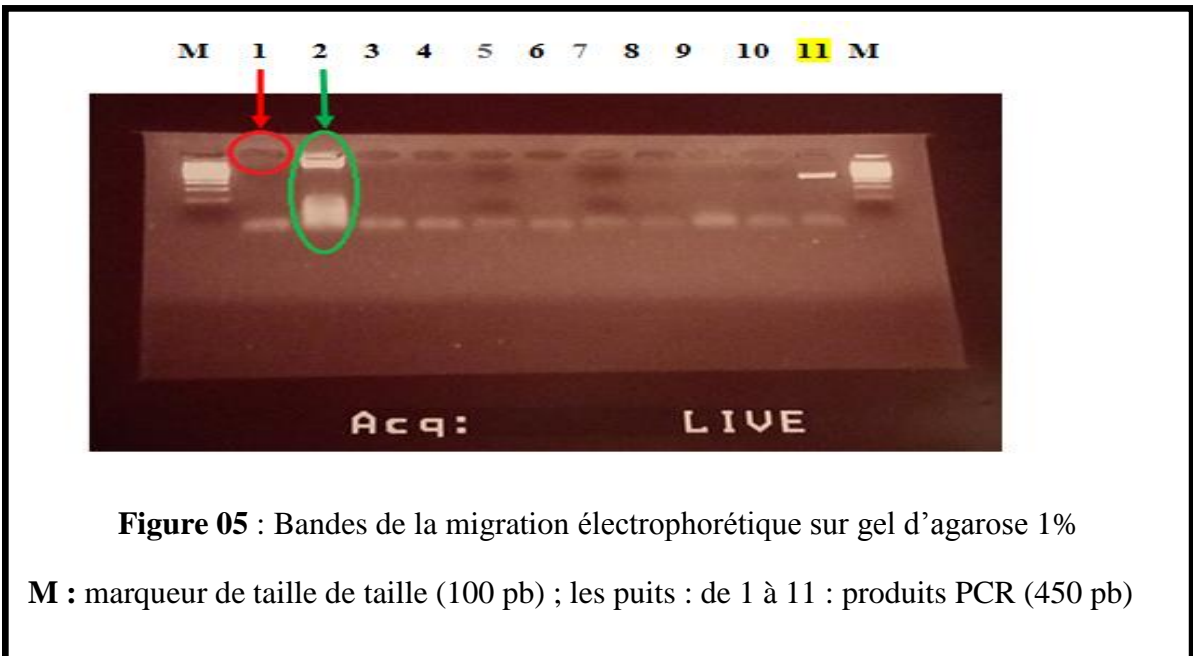


Figure 05 : Bandes de la migration électrophorétique sur gel d'agarose 1%

M : marqueur de taille de taille (100 pb) ; les puits : de 1 à 11 : produits PCR (450 pb)

- ✓ Dans tous les puits de 1 à 11 : présence de bandes implique qu'il y a eu une PCR donc amplification d'ADNr 16S de tous les échantillons même pour les groupes qui n'ont pas trouvé d'ADN génomique dans le TP précédent lors de l'extraction (probable contamination).
- ✓ Concernant le 1, 3, 4, 6, 8, 9 et le 10^{ème} puits : présence de bandes de la même taille mais qui dépassent celles des marqueurs (il a eu un élution lors de la migration peut être).
- ✓ Le puits n°2 (produit PCR de la colonie) : présence de plusieurs bandes car l'amplification de l'ensemble de l'ADN existant dans la colonie est réalisée. (un mélange de tous les ADN)
- ✓ Le 5^{ème} et le 7^{ème} puits : présence de 3 bandes donc l'échantillon est contaminé
- ✓ Le 11^{ème} puits : présence d'une seule bande de la même taille que le marqueur (cas idéal)

Liste des références

Liste des références

- [1]. Kahn A. (1988). L'amplification in vitro des fragments d'ADN par PCR (polymerase chain reaction) : un tournant en génétique. *Mini-synthèse*, 4. (8), 515-518
- [2]. Morgane M. (1993). Séminaire de philosophie et mathématique. Naissance de la biologie moléculaire, école normale supérieure –IREM-Paris nord, 1993, école centrale des arts et des manufactures, Paris, 9 p.
- [3]. Goossens M. (1989). L'amplification des séquences de nucléotides par PCR et les nouvelles techniques de diagnostic moléculaire. 28eme Réunion de la Société Française pour l'Étude de la Fertilité, Laboratoire de Génétique Moléculaire, Service de Biochimie, INSERM U91, Hôpital Henri-Mondor, 19-21 octobre 1989, Paris, France, 7 p.
- [4]. Saiki RK. Et al. (1985). Enzymatic amplification of beta-Globin genomic sequences and Restriction Site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354
- [5]. Morange M. (1994). « Histoire de la biologie moléculaire ». Paris : La découverte. 378 p.
- [6]. PFISTER, A. (2010). La démarche diagnostique de l'infection par le FeLV : synthèse et conseils aux praticiens. Thèse de doctorat : vétérinaire. Lyon : université Claude Bernard-Lyon I. 132 p.
- [7]. Charafi F. (2012). Apport des techniques moléculaire en bactériologie. Thèse de doctorat : Pharmacie. Rabat : université Mohammed V- Souissi- Faculté de médecine et de pharmacie- Rabat, 119 p.
- [8]. Iglesias M. (2009). Ajout d'un contrôle d'inhibition des kits STR multiplex. Travail de diplôme : Lausanne : laboratoire Aurigen, Lausanne, 79 p.
- [9]. Modibo Traore A. Structure d'un brin d'ADN. (18 février 2010) [Photo] In :Guineelibre. Disponible sur <http://guineelibre.over-blog.com/article-notions-de-genetiques-l-adn-et-son-role-45173693.html>
- [10]. Dreamstime. DNA and RNA structure. (Sans date). [Schéma] In: Dreamstime.com. Disponible sur <<https://fr.dreamstime.com/illustration-stock-structure-d-adn-et-d-arn-image66261252>> (consulté le 20/05/2018)
- [11]. Somma M., Querci M. (Sans date). Analyse d'échantillons alimentaires pour la présence d'organismes génétiquement modifiés.

- [12]. Tellaa R. (2013). Apport de la biologie moléculaire dans le diagnostic des infections fongiques invasives revue de la littérature. Thèse de doctorat : Pharmacie. Rabat : université Mohammed V- Souissi- Faculté de médecine et de pharmacie- Rabat, 88 p.
- [13]. Ameziane N. et al. (2006). Principes de biologie moléculaire en biologie clinique. France : Elsevier/Masson. 705 p.
- [14]. Reddahi M. (2017). PCR en temps réel : principe et application en infectiologie. Thèse de doctorat : Pharmacie. Rabat : université Mohammed V- Souissi- Faculté de médecine et de pharmacie- Rabat, 161 p.
- [15]. Brodeur J. et Toussaint M. Température de fusion moléculaire d'un fragment d'ADN. (2006) [graphe]. In : Le monde en image. Disponible sur <http://monde.ccdmd.qc.ca/ressource/?id=55559>
- [16]. Tse C. et Capeau J. Quantification des acides nucléiques par PCR quantitative en temps réel. (2003) [graphe]. In : Jhon Libbey. Disponible sur http://www.jle.com/fr/revues/abc/e-docs/quantification_des_acides_nucleiques_par_pcr_quantitative_en_temps_reel_261839/article.phtml?tab=images
- [17]. Abm. Multiplex PCR. (Sans date). [Schéma]. Disponible sur https://www.abmgood.com/marketing/knowledge_base/polymerase_chain_variation_system.php
- [18]. Cavé H. et al. (2003). La RT-PCR en diagnostic clinique. Ann Biol Clin, 61. (6), 635-644
- [19]. Mebarki F. (1998). La PCR et les règles de son optimisation [en ligne]. 24, disponible sur <https://www.gazettelabo.fr/archives/pratic/1998/24PCR.htm>
- [20]. Ecole de l'ADN Nimes. (Sans date). La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) principe et applications.
- [21]. Réseau français pour la santé végétale. (Sans date). Amplification isotherme.
- [22]. Guatelli J. et al. (1990). Isothermal, In Vitro Amplification of Nucleic Acids by a Multienzyme Reaction Modeled after Retroviral Replication. Proc Natl Acad Sci, 87(5). 1874-1878.

- [23]. Fakruddin M.D. (2012). Nucleic acid sequence based amplification (NASBA) - prospects and applications. *International journal of life science & pharma research*, 2 (1), 106-121
- [24]. Walker GT. Et al. (1995) A DNA Probe Assay Using Strand Displacement Amplification (SDA) and Filtration to Separate Reacted and Unreacted Detector Probes. *Molec Cell Probes* 9:399–403
- [25]. Lamoril J. (2003). Techniques d'amplification génique autres que la PCR. *Biotribune magazine*, 8 (1), 34-35
- [26]. Nahar S. (2014). LAMP: An appropriate technology for point-of-care (POC) application in medical diagnostics. Mémoire de master : master of science. Québec : Université du Québec Institut National de la Recherche Scientifique, Centre Énergie Matériaux Télécommunications, 85 p.
- [27]. Life sciences. SKU: NECB-24 (3X NASBA Reaction Buffer for NEC-1-24) [En ligne]. (Page consultée le 22 Mai 2018). Disponible sur <https://lifesci.com/shop/nasba-kits-nasba-products/nasba-kits-components/3x-nasba-reaction-buffer-nec-1-24/#tab-description>
- [28]. Berendsen T. (2014). Comparaison de la NASBA Panfungi à la culture mycologique pour la détection de la contamination fongique d'un environnement à air maîtrisé. Thèse de doctorat : Pharmacie. Grenoble : Université Joseph Fourier faculté de pharmacie de Grenoble, 128 p.
- [29]. Monsonogo J. (2007). « Traité des infections et pathologies génitales à papillomavirus ». Paris: Springer-verlag. 527 p.
- [30]. Gill P., Ghaimi A. (2008). Nucleic acid isothermal amplification technologies- A review. *Tylor and Francis*. (27), 224-243
- [31]. Collins et al. (2002). Detection of highly pathogenic and low pathogenic avian influenza subtype H5 (Eurasian lineage) using NASBA. *J Virol Methods*, 103 (2), 213-25.
- [32]. Keightley et al. (2005). Real-time NASBA detection of SARS-associated coronavirus and comparison with real-time reverse transcription-PCR. *J Med Virol*, 77 (4), 602-8
- [33]. Bohmer et al. (2009). Novel application for isothermal nucleic acid sequence-based amplification (NASBA). *J Virol Methods*, 158 (1-2), 199-201
- [34]. McDonough, Bott and Giachetti (1997) Application of Transcription-Mediated Amplification to detection of nucleic acids from clinically relevant organisms. In : Lee H, Morse SA, Olsvik O (eds) *Nucleic acid amplification technologies : Application to disease diagnosis*. Eaton Publishing, Natick, MA

[35]. Microbiologiemedicale.fr. Amplification génique par TMA (Transcription Mediated Amplification) [en ligne]. (Page consultée le 22/05/2018).

<https://microbiologiemedicale.fr/amplification-genique-par-tma-transcription-mediated-amplification/>

[36]. Arnold L. (1989). Assay formats involving acridinium-ester-labeled DNA probes. *Clin Chem* 35, 1588–1594

[37]. Craw P., Balachandran W. (2012). Isothermal nucleic acid amplification technologies for point-of-care diagnostics: a critical review. The Royal Society of Chemistry.

[38]. Walker GT (1993) Empirical Aspects of Strand Displacement Amplification. *PCR Methods and Application* 3, 1–6

[39]. Notomi T H. et al. (2000)". Loopmediatedis othermaalm plificationonf DNA." *NucleiAc cidsR es* 2 8(12) : 63.

[40]. Watts M. (2014). A Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for *Strongyloides stercoralis* in Stool That Uses a Visual Detection Method with SYTO-82 Fluorescent Dye. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 90. (2), 306-311

[41]. Natural living center. Strand displacement amplification [en ligne]. (Page consultée le 22/05/2018).

<http://www.naturallivingcenter.net/ns/DisplayMonograph.asp?StoreID=b571dewxvcs92jj200akhmccqa7w8v75&DocID=genomic-sda>

[42]. Ephytia. Amplification isotherme [en ligne]. (Page consultée le 13/05/2018).

<http://ephytia.inra.fr/fr/C/23576/Veg-Di-g-Amplification-isotherme>

[43]. Mullis KB, Faloona FA. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155, 335–350. [[PubMed](#)]

[44]. Lanciotti RS, Kerst AJ. (2001). Nucleic acid sequence-based amplification assays for rapid detection of West Nile and St. Louis encephalitis viruses. *J Clin Microbiol*, 39 : 4506-4513.

[45]. Kaneko

[46]. Damen M, et al. (1999). Characterization of the quantitative HCV NASBA assay. *J Virol Methods*. (82) ; 45-54.

[47]. Lanciotti RS, Kerst AJ. (2001). Nucleic acid sequence-based amplification assays for rapid

detection of West Nile and St. Louis encephalitis viruses. *J Clin Microbiol.* (39) ;

4506-4513.

[48]. Wu SJ. *et al.* (2001) Detection of dengue viral RNA using a nucleic acid sequence-based amplification assay. *J Clin Microbiol.* (39) ; 2794-2798.

[49]. Njiru ZK. *et al.* (2008) African trypanosomiasis : sensitive and rapid detection of the sub-genus *Trypanozoon* by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of parasite DNA. *Int J Parasitol.* (38) ; 589–599.

[50]. Hotez PJ. *et al.* (2007). Control of neglected tropical diseases. *New England Journal of Medicine.* (357) ; 1018–1027. [[PubMed](#)]

Abstract

In molecular biology, nucleic acid amplification methods are various and very different. But the most exploited one is the Chain polymerisation Reaction "PCR". It allows to obtain a large number of DNA copies in a specific way *In Vitro* and a short time also. The PCR reaction is a succession of cycles, each of which consists of three phases with three different temperatures. In order to speed up the process and improve performance, variants have been developed to improve the quality, specificity and performance of the process. Also, new isothermal amplification techniques have emerged, requiring only a single constant temperature and can be a good alternative to PCR-based techniques. Among the isothermal amplification methods are NASBA (Nucleic acid sequence based amplification), TMA (Transcription Mediated Amplification), SDA (Strand Displacement Amplification), and LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification).

The aim of the study is to compare the various techniques mentioned, their principles, their costs, their advantages and disadvantages in order to choose the ideal technique for practice in different applications.

Keys words : PCR, Isothermal amplification, NASBA, TMA, SDA, LAMP.

تلخيص

في مجال البيولوجيا الجزيئية تتنوع طرق تضاعف الحمض، حيث أن أكثر التقنيات استعمالاً حتى الآن هي تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل PCR . حيث تسمح بالحصول على عدد كبير من نسخ الحمض النووي بطريقة محددة في المختبر وفي وقت قصير. إن تفاعل البلمرة المتسلسل هو سلسلة دورات، تتكون كل منها من ثلاث مراحل بثلاث درجات حرارة مختلفة. بغرض تسريع العملية وتحسين الأداء، تم تطوير طرق أخرى جديدة تتطلب درجة حرارة واحدة ثابتة يمكنها أن تكون بديلاً جيداً للتقنيات القائمة على PCR. من بين طرق تضاعف الأحماض النووية المعتمد على حرارة ثابتة : NASBA ، SDA ، TMA ، و LAMP.

الهدف من هذه الدراسة هو مقارنة التقنيات المختلفة المذكورة أعلاه، مبادئها، تكاليفها، مزاياها وعيوبها من أجل اختيار التقنية المثالية للاستخدامها في مختلف المجالات .

Techniques isothermes d'amplification des acides nucléiques : méthodes, techniques et applications

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en biologie moléculaire des microorganismes

En biologie moléculaire, les méthodes d'amplification des acides nucléiques sont diverses et la plus exploitée jusqu'à maintenant est la réaction de polymérisation en chaîne ou PCR. Elle permet l'obtention d'un grand nombre de copies d'ADN de manière spécifique *in vitro* et en un temps réduit. La réaction de PCR est une succession de cycles dont chacun est constitué de trois phases avec trois différentes températures. Afin d'accélérer le processus et avoir un meilleur rendement, des variantes ont été mises au point pour améliorer la qualité, la spécificité et la performance de celle-ci. Aussi, de nouvelles techniques d'amplification dites isothermes sont apparues, ne nécessitant qu'une seule température constante et pouvant constituer une bonne alternative aux techniques basées sur la PCR. Parmi les méthodes d'amplification isothermes, on trouve la NASBA : Nucleic acid sequence based amplification (Amplification basée sur une séquence d'acides nucléiques), la TMA : Transcription Mediated Amplification (Amplification médiée par transcription), la SDA : Strand Displacement Amplification (amplification par déplacement de brin), et la LAMP : Loop-Mediated Isothermal Amplification (amplification isotherme à médiation par boucle).

Le but de l'étude est de comparer les différentes techniques citées, leurs principes, leurs coûts, leurs avantages et inconvénients afin de bien choisir la technique idéale pour l'utiliser dans les différentes applications.

Mots clés : PCR, amplification isotherme, NASBA, SDA, TMA, LAMP.

Laboratoire de recherche : Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM)

Jury d'évaluation :

Président du jury :	Mlle ABDELAZIZ Wided	Maitre-Assistante A- UFM Constantine
Rapporteur :	Monsieur HADDI M. Laid	Professeur - UFM Constantine
Examineur :	Mlle ARABET Dallel	Maitre de conférences - UFM Constantine

Date de soutenance : 02/07/2018