



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث 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 والحياة

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

La biologie moléculaire en microbiologie clinique

Elaborée par : M^{elle}. Bouarioua Racha

Soutenu le : 19/09/2021

M^{elle}. Gouah Meissa Cheima

Devant le jury d'évaluation :

Présidente du jury : Mme ABDELAZIZ Wided (MCB- UFM Constantine 1).

Rapporteur : Mme HECINI-HANNACHI Abla (MCA- U Salah Boubnider Constantine 3)

Examinatrice : Mme GUERGOURI Ibtissem (MAA- UFM Constantine).

*Année universitaire
2020- 2021*

Remerciements

Nous voudrions exprimer notre plus sincère gratitude à Madame le professeur HECINI –
HANNACHI ABLA, maitre de conférences à l'université Salah Boubnider Constantine
3, pour sa gentillesse, son dévouement, sa patience et tous ses efforts dans la
conception de ce travail.

Nous tenions aussi à la remercier de tous ces conseils en or dans le cadre de notre mémoire
de fin d'étude et même pour notre avenir en tant que microbiologiste, nous espérons
que ce travail aussi modeste qu'il soit, témoignera de notre reconnaissance envers elle.

On remercie sincèrement, les membres Madame ABDELAZIZ WIDED, maitre de
conférences à l'université des frères Mentouri Constantine 1 et Madame GUERGOURI
BTISSEM, maitre assistante à l'université des frères Mentouri Constantine 1 d'avoir
consenti à faire partie du jury.

Nous leur souhaitons une agréable soutenance en notre compagnie.

On remercie le Docteur RAMDANI RABAH et BOUFANARA AMIRA pour les
informations scientifiques qui ont contribué à notre travail.

On remercie nos amies RAYENE, INES, CHIRAZ et ESMAN pour leur soutien moral au
cours de la conception de ce travail

Enfin, on remercie tous ceux qui, de façon directe et indirecte, ont contribué à la réalisation
de ce travail.

Dédicaces

A Allah

Le tout puissant

Pour sa bonté et pour m'avoir guidée durant toute ma vie

A ma maman

A ma meilleure amie depuis l'enfance qui m'a toujours guidée et encouragée dans chaque pas de ma vie.

C'est grâce à toi que je n'ai jamais abandonné, tu étais là pour moi dans mes moments les plus sombres, tu as fait de moi la femme que je suis aujourd'hui et je ne pourrais jamais te remercier assez pour tout cela.

Puisse Dieu te protéger et te procurer une vie pleine de joie, de bonheur et de bonne santé.

A mon papa

A mon protecteur qui m'a appris comment gérer mes problèmes et être une adulte responsable et respectueuse, tu m'as toujours encouragée à poursuivre mes rêves même les plus impossibles.

Je te dédie ce travail pour te remercier pour tes efforts et sacrifices et espère que tu seras fier de moi

Puisse Dieu te protéger et me laisser toujours auprès de toi

A mes trois petites sœurs *Razane, Chiraz, Meisse* et

Mon unique petit frère *Abderahmene*

A mes chères tantes *Hasna* et *Lilya*

A ma famille maternelle et paternelle

Aux personnes qui m'aiment

Aux personnes qui m'ont soutenue

Je vous dédie ce travail

Bouarioua Racha

Dédicaces

À Allah

Le tout puissant

Qui m'a inspirée, montrée le bon chemin à suivre

et m'a donnée la force et la volonté de trouver mon but dans la vie.

À mes très chers parents

Aucun mot, ne pourrait exprimer mon respect et ma considération pour tous vos sacrifices pour mon éducation, mon instruction et mon bien être.

Et peu importe combien je vous remercie, je ne peux vous remercier assez pour tout ce que vous m'avez offert dans ma vie.

À mes deux chers frères *Seif Eddine, Ayoub* et

ma très chère petite sœur *Anfel*.

À toute ma famille.

Aux personnes qui m'aiment.

Aux personnes qui me sont chères.

Aux personnes qui m'ont soutenue.

À Tous ceux que j'aime.

Je vous dédie ce travail.

Gouah Mzissa Chzima

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES FIGURES

LISTE DES ANNEXES

INTRODUCTION

1

PARTIE I. PRINCIPALES TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE UTILISEES
EN MICROBIOLOGIE CLINIQUE

CHAPITRE I. TECHNIQUES D'AMPLIFICATION

1. Les techniques par cycle thermique	3
1.1. Les réactions de polymérisation en chaîne (PCR)	3
1.1.1. La PCR classique	3
1.1.2. La RT-PCR (reverse transcriptase PCR)	4
1.1.3. La nested-PCR	4
1.1.4. La PCR multiplex	5
1.1.5. La PCR ELISA	6
1.1.6. La PCR compétitive	6
1.1.7. La PCR en temps réel	7
1.1.8. La PCR numérique	8
1.2. La réaction de ligation en chaîne (LCR)	8
2. Les techniques isothermes	9
2.1. La Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA)	9
2.2. La Transcription-mediated amplification (TMA)	9
2.3. La Strand displacement amplification (SDA)	10
2.4. La rolling circle amplification (RCA)	10

2.5. La cycling probe technology (CPT)	11
2.6. L'ADN branché (bdNA)	12
2.7. Le système de capture d'hybride	12

CHAPITRE II. TECHNIQUES DE DETECTION

1. Les puces à ADN et les micro-arrays	14
2. Les billes magnétiques	14
3. Le séquençage	15
4. Les techniques d'hybridation	16
4.1. L'hybridation in situ (FISH, fluorescence in situ hybridization)	16
4.2. La reverse dot-blot : système LiPA (line probe assay)	17
4.3. La technique HPA (hybridization protection assay)	17
4.4. La spectrométrie de masse	19

CHAPITRE III. CONTROLE DE QUALITE

1. Choix de la technique	20
2. Contrôle de qualité des résultats	20
2.1. Résultats	20
2.1.1. Résultat qualitatif	20
2.1.2. Résultat quantitatif	20
2.2. Prévention des erreurs	20
2.2.1. Faux positifs	21
2.2.2. Faux négatifs	21
3. Avantages et inconvénients	22

PARTIE II. INDICATIONS DE LA BIOLOGIE MOLECULAIRE

1. Les infections virales	23
1.1. Infections par le virus de l'hépatite C (VHC)	23

1.2. Infections par le virus de l'hépatite B (VHB)	23
1.3. Infections par le virus de l'immunodéficience (VIH)	25
1.4. Infections par les herpès virus	26
1.4.1. Infections par Les herpès simplex virus (HSV)	26
1.4.2. Infections par Le cytomégalovirus (CMV)	27
1.5. Infections par Le papillomavirus (HPV)	28
1.6. Infections par Les autres virus	30
2. Les infections bactériennes	30
2.1. Infections à <i>Chlamydia trachomatis</i> (CT) et <i>Neisseria gonorrhoeae</i> (NG)	30
2.2. Infections à <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (la tuberculose)	34
2.3. Autres infections bactériennes	36
3. Les infections fongiques	37
3.1. Infections à <i>Candida spp.</i> (Candidoses)	41
3.2. Infections aux mucorales (mucormycoses)	42
4. Les infections parasitaires	43
4.1. Infections à <i>Plasmodium sp</i> (le paludisme)	43
4.2. Infections à <i>Toxoplasma gondii</i> (la toxoplasmose)	44
4.3. Autres infections parasitaires	44
5. Le bioterrorisme	45
PARTIE III. APPORT DE LA BIOLOGIE MOLECULAIRES DANS LE DIAGNOSTIC CLINIQUE : RESULTATS A PROPOS DE QUELQUES ETUDES	
1. Apport des techniques moléculaires dans le diagnostic des infections virales	47
1.1. Etude 1. Undiagnosed hepatitis C virus infection in hemodialysis patients: Value of HCV RNA and liver enzyme levels	47
1.2. Etude 2. Evaluation of a Rapid Diagnostic Assay for Detection of SARS-CoV-2	

Antigen in Nasopharyngeal Swabs	49
2. Apport des techniques moléculaires dans le diagnostic des infections bactériennes	51
2.1. Etude 1. Molecular Diagnosis of Bacterial Definite Infective Endocarditis by Real-Time Polymerase Chain Reaction	51
2.2. Etude 2. Diagnostic efficacy of a real time-PCR assay for <i>Chlamydia trachomatis</i> infection in infertile women in north India	56
3. Apport des techniques moléculaires dans le diagnostic des infections fongiques	61
3.1. Etude 1. Application de la PCR en temps réel au diagnostic des candidémies	61
3.2. Etude 2. <i>Aspergillus</i> PCR-Based Investigation of Fresh Tissue and Effusion Samples in Patients with Suspected Invasive Aspergillosis Enhances Diagnostic Capabilities	62
4. Apport des techniques moléculaires dans le diagnostic des infections parasitaires	63
4.1. Etude 1. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with polymerase Chain reaction test on Amniotic Fluid	63
4.2. Etude 2. Real-time PCR for diagnosis of imported Schistosomiasis	65
CONCLUSION	68
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	69-78
ANNEXES	
RESUMES	

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADNr :	Acide désoxyribonucléique ribosomal
AE :	Ester d'acridinium
ARN :	Acide ribonucléique
ARNm :	Acide ribonucléique messager
CMV :	Cytomégalovirus
DIG-Dutp :	Digoxigénine-11-dUTP
DNTP :	Déoxyribonucléotide triphosphate
EBV :	Virus Epstein-Barr
ELISA :	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FISH :	Hybridation in situ par fluorescence
HACEK :	<i>Haemophilus, Aggregatibacter, Cardiobacterium, Eikenella, Kingella</i>
HAS :	Haute autorité de santé
HBe :	Antigène situé à la surface de l'enveloppe du virus de l'hépatite B
HBs :	Antigène situé à la surface de la capsid du virus de l'hépatite B
HHV6 :	Herpès virus humain du type 6
HHV7 :	Herpès virus humain du type 7
HPA :	<i>Hybridization protection assay</i>
HPV :	<i>Human papillomavirus</i>
HSV :	Herpès simplex virus
ITS :	<i>Internal transcribed space</i>
LAMP :	<i>Loop-mediated isothermal amplification</i>
LBA :	Lavage bronchoalvéolaire

LCR :	<i>Ligase chain reaction</i>
LCR :	Liquide céphalo-rachidien
LIPA :	<i>line probe assay</i>
MALDI-TOF :	<i>Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight</i>
MAV-RT :	La transcriptase inverse du virus de la myéloblastose aviaire
NASBA :	<i>Nucleic Acid Sequence-Based Amplification</i>
nt :	Nucléotide
OMS :	Organisation mondiale de la Santé
Pb :	Paire de base
PCR :	<i>Polymerase chain reaction</i>
RCA :	<i>Rolling circle amplification</i>
Rn :	Reporter normalisée
RT :	<i>Reverse transcriptase</i>
SDA :	<i>Strand displacement amplification</i>
TAAN :	Tests d'amplification des acides nucléiques
Taq polymerase:	<i>DNA polymerase of Thermus aquaticus</i>
TMA :	<i>Transcription-mediated amplification</i>
UI :	Unité international
UTP:	Uracile triphosphate
UV :	Ultra-violet
VHB :	Virus de l'hépatite B
VHC :	Virus de l'hépatite C
VIH :	Virus de l'immunodéficience humaine

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Techniques moléculaires de diagnostic en microbiologie clinique du virus de l'hépatite C (VHC)	24
Tableau 2. Techniques moléculaires de diagnostic en microbiologie clinique du virus de l'hépatite B (VHB)	25
Tableau 3. Techniques moléculaires de diagnostic en microbiologie clinique du virus de l'immunodéficience (VIH)	27
Tableau 4. Techniques moléculaires de diagnostic en microbiologie clinique des herpès simplex virus (HSV)	28
Tableau 5. Techniques moléculaires de diagnostic en microbiologie clinique du Cytomégalo virus (CMV)	29
Tableau 6. Techniques moléculaires de diagnostic en microbiologie clinique du Papillomavirus (HPV)	29
Tableau 7. Techniques moléculaires de diagnostic en microbiologie clinique d'autres virus	31
Tableau 8. Principales techniques utilisées pour détecter <i>Chlamydia trachomatis</i> et <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	34
Tableau 9. Principales techniques utilisées pour détecter <i>Mycobacterium</i>	36
Tableau 10. Principales techniques utilisées pour l'identification générale des autres bactéries	38
Tableau 11. Techniques moléculaires appliquées dans la détection et l'identification des champignons	41
Tableau 12. Techniques moléculaires de diagnostic en microbiologie clinique des candidoses	43

Tableau 13. Principale technique pour l'identification de <i>plasmodium</i>	44
Tableau 14. Principaux parasites détectés par la PCR en temps réel	45
Tableau 15. Principaux agents du bioterrorisme détectés par la PCR en temps réel	46
Tableau 16. Résultats des tests sérologiques et moléculaires	49
Tableau 17. Résultats qualitatifs de la détection de SRAS CoV 2 de chaque test et leur sensibilité	51
Tableau 18. Microorganismes responsables l'endocardite infectieuse	54
Tableau 19. Résultats de la PCR en temps réel et de l'hémoculture chez 20 patients atteints d'endocardite infectieuse définie	56
Tableau 20. Techniques d'amplification pour la détection de <i>chlamydia sp</i> et leurs cibles	59
Tableau 21. Comparaison de la PCR en temps réel, de la PCR classique du plasmide cryptique et du gène <i>omp1</i> , du test de fluorescence directe (DFA) et du test immunoenzymatique (EIA) pour <i>C. trachomatis</i> avec le test COBAS Taqman CT, v 2.0	60
Tableau 22. Résultats obtenus par les deux tests	65
Tableau 23. Sensibilité des tests selon l'échantillon analysé	66

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Principe de la nested-PCR	5
Figure 2. Principe de la PCR-ELISA	7
Figure 3. Processus de la PCR numérique	8
Figure 4. Principe détaillé de la SDA	11
Figure 5. Principe de la technique de l'ADN branché	13
Figure 6. Principe du système Hybride capture	13
Figure 7. Principe des puces à ADN	15
Figure 8. Exemples de marqueur dans l'hybridation in situ	17
Figure 9. Procédure de la LiPA	18
Figure 10. Tests appliqués dans le dépistage du virus HPV chez la femme	30
Figure 11. Structure physique du virus de l'hépatite C (VHC)	48
Figure 12. Structure physique et génomique du SARS-CoV-2	50
Figure 13. Localisation de l'infection par une endocardite au niveau du cœur	52
Figure 14. Observation microscopique de <i>Staphylococcus aureus</i>	53
Figure 15. Courbes d'amplification de 13 échantillons de sang total positifs	55
Figure 16. Observation microscopique de <i>Chlamydia trachomatis</i>	57
Figure 17. Cycle de vie de <i>Chlamydia trachomatis</i>	58
Figure 18. Illustration en 3D du genre <i>Candida sp.</i>	61
Figure 19. Observation microscopique du genre <i>Aspergillus</i>	63
Figure 20. Observation microscopique de <i>Toxoplasma gondii</i>	64
Figure 21. Illustration en 3D du genre <i>Schistosoma</i>	65
Figure 22. Cinétique des taux de positivité (PCR, ELISA et HA après traitement)	67

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1. Principe de la PCR classique

Annexe 2. Principe de l'amplification par PCR en temps réel

Annexe 3. Principe de la technique isotherme TMA

Annexe 4. Principe de l'amplification par la technique RCA

Annexe 5. Extraction de l'acide nucléique par l'utilisation de billes magnétiques

Annexe 6. Principe de la spectrométrie de masse

Annexe 7. Critères de Duke pour le diagnostic d'une endocardite infectieuse

Annexe 8. Définition des critères de Duke pour le diagnostic d'une endocardite infectieuse

Annexe 9. Etude moléculaire réalisée au niveau de l'hôpital militaire de Constantine

INTRODUCTION

En 1994, Michel Morange, a caractérisé la biologie moléculaire comme étant *"l'ensemble des techniques et découvertes qui ont permis l'analyse moléculaire des processus les plus intimes du vivant, de ceux qui en assurent la pérennité et la reproduction"* (1).

La biologie moléculaire peut être définie comme l'étude moléculaire des organismes vivants, notamment la structure des gènes et leur physiologie au niveau moléculaire (2).

Elle regroupe l'ensemble des techniques fondées sur l'étude de la détection, la modification et l'identification des acides nucléiques.

Dans le passé, c'était la nécessité d'obtenir des résultats plus rapides, précis et fiables surtout en médecine qui a induit le développement d'autres méthodes et technologies d'amplification des acides nucléiques qu'ils soient ribonucléiques (ARN) ou désoxyribonucléiques (ADN) afin de réaliser les différentes analyses. En partant de ce besoin, le domaine scientifique a connu la naissance de la réaction de polymérisation en chaîne ou PCR (3).

En 1993, la PCR est devenue la clé de l'intégration de la biologie moléculaire en microbiologie clinique mais seulement dans les laboratoires de recherche spécialisée. Ce n'est que quelques années plus tard que la biologie moléculaire a commencé à s'intégrer dans les laboratoires cliniques de routine, grâce à sa capacité de détecter tous les microorganismes. D'autres technologies moléculaires à partir de la PCR, chacune avec ses propres caractéristiques, ont vu le jour.

Tout cela a amené une grande diversité d'indications à la biologie moléculaire clinique jusqu'à être considérée comme un outil de recherche, de confirmation du diagnostic des différentes maladies ce qui diminue la durée d'hospitalisation. Parfois, elle est le seul outil capable de révéler la présence de nouveaux pathogènes de façon rapide, sensible et spécifique.

Malgré cela les laboratoires favorisent encore l'utilisation des autres méthodes traditionnelles comme l'examen direct, la culture cellulaire, les techniques biochimique et sérologique à cause de leurs coûts et la facilité de leur mise au point (4,5).

Notre travail se résume en une étude bibliographique ayant pour objectifs la mise en évidence et la description des différentes techniques de biologie moléculaire dans le domaine

de la microbiologie avec leurs caractéristiques, ainsi que les limites dans leur processus d'application.

Comme nous n'avons pas effectué d'étude pratique, nous avons présenté des résultats à partir des données de la littérature, de quelques études mettant en évidence l'apport des techniques moléculaires dans le diagnostic des infections bactériennes, virales, fongiques et parasitaires.

Ainsi, notre travail vise à améliorer la perspective de la biologie moléculaire en microbiologie clinique en exposant ses attributs et ses diverses applications dans le domaine clinique.

PARTIE I

**PRINCIPALES TECHNIQUES DE BIOLOGIE
MOLECULAIRE UTILISEES EN MICROBIOLOGIE
CLINIQUE**

CHAPITRE I
TECHNIQUES D'AMPLIFICATION

Les techniques de biologie moléculaire évoluent rapidement. Leurs principes et indications diffèrent selon les applications. Même si de nombreuses techniques sont différentes, elles ont toutes des avantages et des inconvénients communs.

Les techniques d'amplification sont réparties en techniques par cycles thermiques, techniques isothermes et techniques d'amplification de signal.

1. Les techniques par cycle thermiques

1.1. Les réactions de polymérisation en chaîne (PCR)

La PCR est un outil de la biologie moléculaire qui permet à une séquence d'acide nucléique d'être amplifiée de manière répétée in vitro pour générer des amplicons qui seront également utilisés comme matrice dans le cycle suivant. La réplication commence par l'hybridation d'oligonucléotides qui sont de courtes séquences d'ADN monocaténaire différentes les unes des autres, complémentaires des sites de reconnaissance autour de la séquence d'ADN à amplifier. Puis une ADN polymérase réplique l'ADN cible par élongation des oligonucléotides ou amorces jusqu'à obtenir une séquence d'ADN simple brin complémentaire à la séquence cible (6).

1.1.1. La PCR classique

La PCR est basée sur le processus de réplication de l'ADN in vivo : l'ADN double brin est déroulé en ADN simple brin, puis copié et recombéné en ADN double brin. Elle consiste en trois étapes selon le cycle répété

- **Dénaturation** de l'ADN à haute température pour convertir l'ADN bicaténaire en ADN monocaténaire qui est réalisée à une température comprise entre 93 et 96°C.
- **Hybridation** de l'ADN cible à deux amorces d'origine nucléotidique à une température comprise entre 55 et 65°C.
- **Extension** de la chaîne d'ADN par addition de nucléotides (dNTP) à partir des amorces en utilisant l'ADN polymérase (la Taq est généralement utilisée) comme catalyseur en présence d'ions Mg²⁺. La température optimale d'activité de l'ADN polymérase est de 72°C.

Ces étapes combinées forment un cycle dans la réaction PCR. Au fur et à mesure des répétitions des cycles, il s'en suit une accumulation exponentielle des séquences d'ADN cible (7,8) (annexe1).

La PCR classique présente plusieurs attributs, pourtant certains défauts ont été observés, ce qui a amené les chercheurs à perfectionner la technique dans le but d'éviter tout type de complication comme la contamination et en même temps optimiser la PCR par augmentation de la sensibilité.

Plusieurs techniques ont alors été développées tout en gardant le principe de la PCR classique.

1.1.2. La RT-PCR (reverse transcriptase PCR)

C'est une technique d'amplification de l'ARN, réalisée en deux étapes où l'ARN est transcrit inversement en ADN complémentaire (ADNc) puis amplifié soit par PCR classique ou bien par PCR en temps réel qui est une technique combinée (RT et temps réel) la plus utilisée actuellement dans le diagnostic du Covid 19 (le virus SARS-CoV 2) (9).

Cette transcription est catalysée par une enzyme ADN-polymérase-ARN-dépendante issue des rétrovirus nommée la transcriptase inverse (ou la transcriptase reverse) qui transfère l'information génétique contenue dans l'ARN en ADN complémentaire, elle peut même synthétiser le brin complémentaire du brin néoformé dans des conditions précises (6).

1.1.3. La nested-PCR

Dans l'étude moléculaire et spécifiquement la technique de la PCR, seules les amorces vont déterminer le fragment à amplifier et donc la spécificité et la sensibilité de la technique, pour cela cette PCR est basée sur un jeu d'amorces pour les améliorer. Même dans l'étude de deux séquences homologues et l'amplification d'un ADN issu d'une population hétérogène.

La PCR nichée (nested) nécessite l'usage de deux paires d'amorces différentes et donc deux réactions de PCR successives où la première avec juste 10 cycles utilise le couple externe qui se fixe à l'extérieur de la région cible. Les amplicons résultants servent de matrice dans la deuxième réaction, qui est amplifiée par la seconde paire « couple interne » qui se fixe à l'intérieur de la région cible (Figure 1).

L'utilisation d'un cycle ouvert (deux réactions PCR successives) augmente aussi le risque de contamination du milieu réactionnel (10).

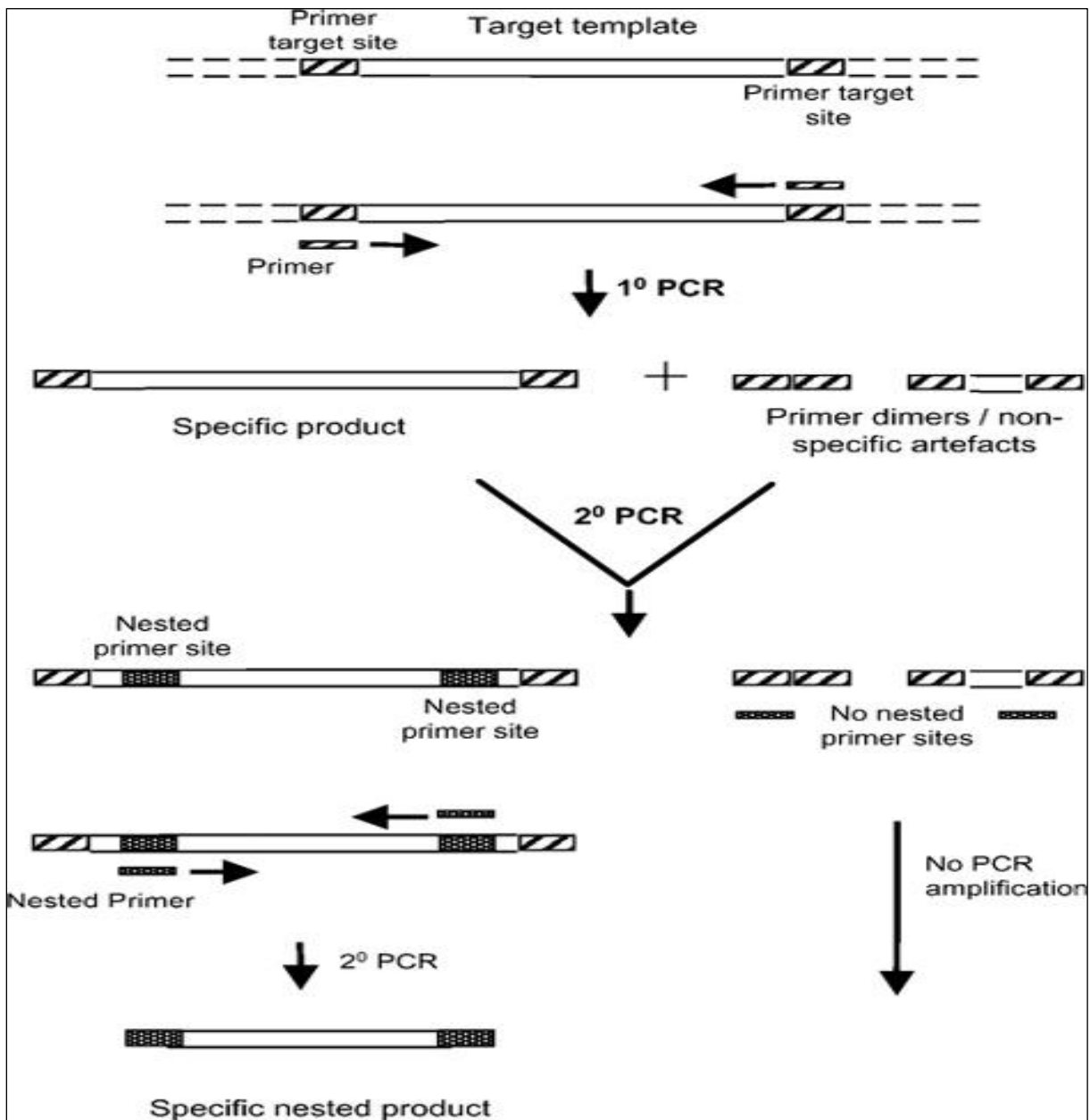


Figure 1. Principe de la nested-PCR (11)

1.1.4. La PCR multiplex

Cette technique autorise l'amplification, en une seule réaction, de plusieurs segments d'ADN distincts en utilisant au moins trois différents couples d'amorces. Il est possible aussi d'amplifier différents types d'ADN reconnus par la même paire d'amorces, comme les mimics

(12).

Cette PCR est généralement suivie par une digestion enzymatique où le produit est visualisé par une électrophorèse (6).

Ce test est généralement effectué pour le diagnostic des infections respiratoires où il recherche le matériel génétique d'un total de 4 bactéries et 18 virus (dont le SRAS-CoV-2) dans un prélèvement de sécrétions du nez et de la gorge (13).

1.1.5. La PCR ELISA

C'est une méthode d'immuno-détection qui permet la quantification de produit issu de la PCR par immobilisation de l'ADN sur une microplaque réalisée en trois étapes.

Initialement, le gène d'intérêt sera amplifié par PCR en utilisant des amorces marquées par le digoxigénine-11-dUTP (DIG-dUTP). Les produits de PCR se lieront ensuite à des sondes marquées avec de la biotine. Après, des liaisons sont effectuées en liant les séquences marquées à la biotine avec la streptavidine contenue dans la microplaque. Puis elles seront détectées par un conjugué anti-DIG-peroxydase et mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre (Figure 2).

Cette PCR permet d'avoir des résultats quantitatifs et qualitatifs en même temps, sa sensibilité est 100 fois mieux que la PCR classique et elle réduit le risque de contamination par l'usage de sondes spécifiques (14).

1.1.6. La PCR compétitive

Il s'agit d'une technique de quantification appliquée aussi bien à l'ADN qu'à l'ARN, basée sur une Co-Amplification (ou Co-transcription inverse suivi d'une Co-amplification) de deux séquences nucléiques dans un même tube.

La séquence nucléique compétitrice ou titrée doit être presque identique à la séquence nucléique cible avec une différence de quelques nucléotides. Lors de l'amplification, les deux matrices rentrent en compétition pour l'ensemble des amorces, puis les produits amplifiés des deux séquences sont détectés soit par différence de longueur ou par présence d'un site de restriction originale d'une mutation ponctuelle (15).

Cette technique permet de révéler la quantité de l'ADN cible grâce au rapport qui démontre que puisque la quantité de la séquence compétitrice est connue donc la quantité de l'acide nucléique cible peut être estimée (16).

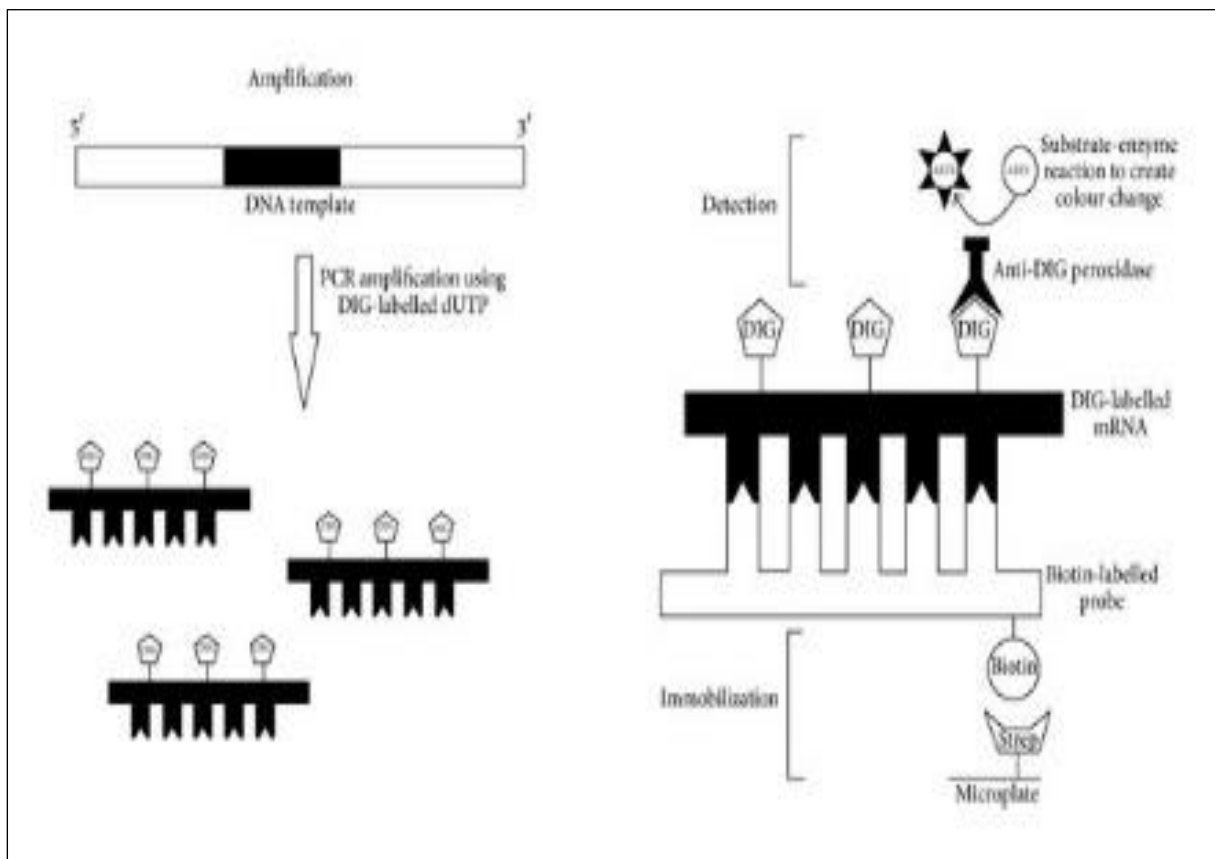


Figure 2. Principe de la PCR-ELISA (14)

1.1.7. La PCR en temps réel

C'est une technique qui permet le suivi de l'accumulation des amplicons grâce à des sondes oligonucléotidiques capables de fluorescence, le mécanisme d'émission du signal varie d'une sonde à une autre. Il existe cinq types de sondes en PCR en temps réel, ce sont les sondes SYBR Green, Taqman, FRET en tandem, balises moléculaires et amorces scorpions (annexe 2).

En microbiologie clinique, la PCR en temps réel utilise des sondes Taqman pour détecter et quantifier les agents infectieux (PCR quantitative en temps réel). Les sondes PCR en temps réel peuvent être utilisées pour d'autres PCR telles que la PCR quantitative, multiplex et la RT-PCR.

Le reporter fluorescent attaché à la sonde émet une fluorescence à une intensité mesurée à chaque cycle et tracée dans une courbe composée de deux phases, l'une comprise entre 20 et

30 cycles où le nombre des amplicons est mesuré, et l'autre étant la phase plateau où l'intensité de fluorescence devient fixe, cela est causé par plusieurs facteurs interférents dans la PCR (17).

1.1.8. La PCR numérique

C'est une nouvelle technique de quantification qui adopte une amplification divisée dans des micropuits, où idéalement chaque partition ne possède qu'une seule molécule cible ou aucune, les résultats positifs (traduits par une fluorescence) et les résultats négatifs sont comptés après l'amplification (18) (Figure 3).

1.2. La réaction de ligation en chaîne (LCR)

La réaction d'amplification en chaîne par une ligase est une technique basée sur deux principaux éléments : une ligase qui est une enzyme thermostable possédant une activité de ligation entre deux molécules par des liaisons covalentes, et un ensemble d'amorces qui doivent avoir une parfaite identité à l'ADN cible lors de l'hybridation.

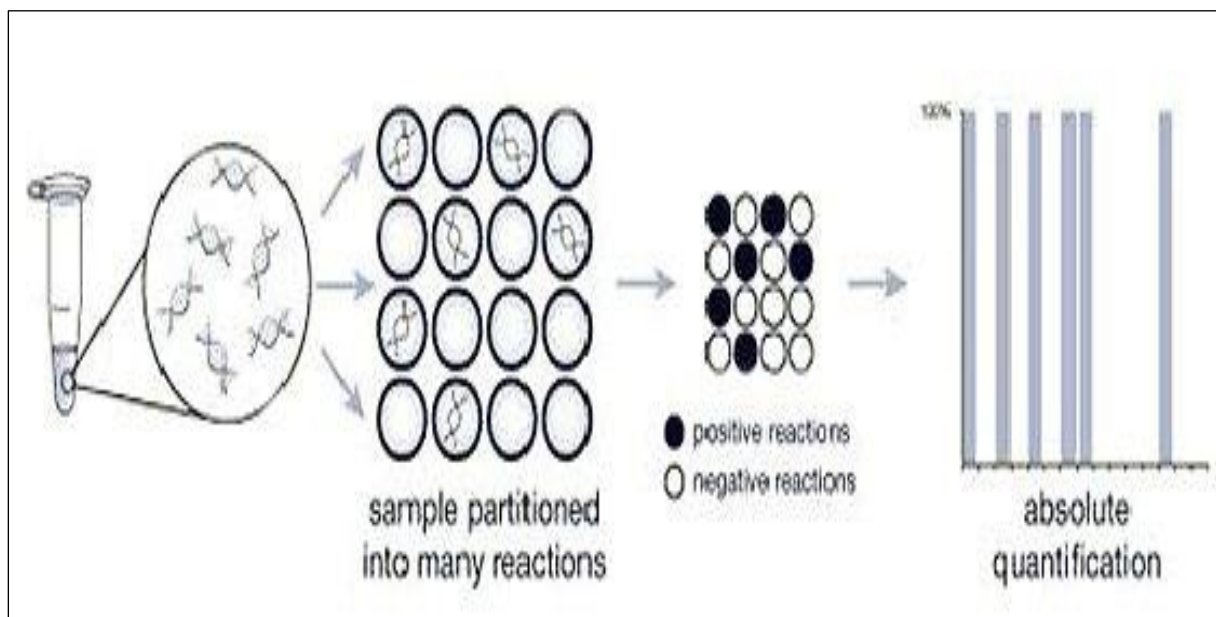


Figure 3. Processus de la PCR numérique (19)

Une ligase lie les fragments d'amorces hybridées à l'ADN cible par liaisons covalentes pour former une amorce de 40 à 60 nt au lieu de 20 à 30 nt, si un mésappariement est présent en 3' et 5' d'une des amorces, la ligation n'aura pas lieu.

La LCR est une technique qui contrairement à la PCR, possède un cycle de température à deux phases : une dénaturation à 95°C, une hybridation et une ligation en même temps de 55°C à 65°C. Lorsque la ligase est ajoutée, un tampon doit être présent dans le but de diminuer la ligation indépendante de l'ADN, généralement on utilise le KOH/KCl₂ ou le MgCl₂ (6).

2. Les techniques isothermes

Les techniques isothermes sont des techniques qui amplifient l'un des deux acides nucléiques ou bien un signal à une température stable. Contrairement à la PCR qui nécessite un thermocycleur, les techniques isothermes utilisent un bain marie ce qui les rend plus économiques tout en assurant des résultats fiables. Elles sont même vendues sous forme de kits prêts à l'emploi.

2.1. La Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA)

L'amplification basée sur la séquence d'acide nucléique (NASBA) est une technique isotherme qui vise la détection et l'amplification de l'ARN simple brin (elle peut s'adapter à l'ADN aussi). Elle a comme machinerie trois enzymes essentielles « une transcriptase inverse, une ARNase H et une ARN polymérase (T7 ARN polymérase). Elle peut générer 1000 copies par un seul cycle avec l'usage d'une température stable de 41°C (un bain-marie suffit).

Brièvement, un cycle de ce système représente une réaction de transcription inverse, réalisée par la transcriptase inverse du virus de la myéloblastose aviaire (MAV-RT) qui synthétise l'ADNc de l'ARN analysé. Suivie par la dégradation de l'ARN où l'ARNase catalyse la réaction puis le MAV-RT polymérise le brin complémentaire de l'ADNc pour former un ADN double brin.

Enfin le T7 ARN polymérase transcrit l'ADNc en ARN qui sera détecté par les balises moléculaires (sondes nucléiques fluorescentes) (6).

2.2. La Transcription-mediated amplification (TMA)

L'amplification médiée par la transcription (TMA) est une méthode semblable à la NASBA avec une différence en quelques points.

Contrairement à la NASBA, la TMA utilise deux enzymes seulement, la MTV transcriptase inverse et la T7 ARN polymérase » avec l'activation de la fonction ARNase H de

la MTV-RT par l'ajout du diméthylsulfoxyde et le sorbitol au mélange réactionnel, la température (37- 42°C), la détection des séquences d'ARN se fait par la HPA (le test de protection d'hybridation) (6) (annexe 3).

Cette technique peut être quantitative, il suffit juste d'ajouter des contrôles internes dans l'échantillon à analyser (20).

2.3. La Strand displacement amplification (SDA)

L'amplification par déplacement (SDA) est un ensemble de réactions d'amplification d'ADN catalysée par deux enzymes thermorésistantes, avec une température d'activité optimale de 65°C, la première enzyme est une enzyme de restriction (BsoB1 ou bien Bsr1) et la deuxième est une ADN polymérase dépourvue d'activité exo-nucléasique. Puisque les deux paires d'amorces contiennent spécifiquement un site de clivage par enzyme de restriction, une polymérase est utilisée pour générer l'ADN cible avec le site de restriction. La digestion par une enzyme sur un seul brin produit une extrémité 3', qui peut être étendue par la polymérase tout en déplaçant les brins adjacents (Figure 4).

Ce système peut amplifier l'ARN aussi, mais il est utilisé principalement pour la détection des mycobactéries et *Chlamydia trachomatis* (21).

2.4. La rolling circle amplification (RCA)

Il s'agit d'une technique d'amplification à température unique où une ADN polymérase (ϕ 29) amplifie à l'aide d'une amorce, un simple brin circulaire de manière répétitive et de façon linéaire des séquences d'ADN simples brins concatémères (23) (annexe 4).

Cette technique se distingue des autres techniques isothermes par le fait qu'elle est résistante à la contamination et la capacité d'amplifier sans optimiser la dose (optimisation à faible débit) (24).

La RCA amplifie généralement les acides nucléiques circulaires. Dans le cas de séquences linéaires, une sonde appelée « sonde cadenas » est ligaturée à la fin de la séquence, et une ligase est utilisée pour circulariser le brin d'ADN ou d'ARN pour permettre l'amplification RCA (23).

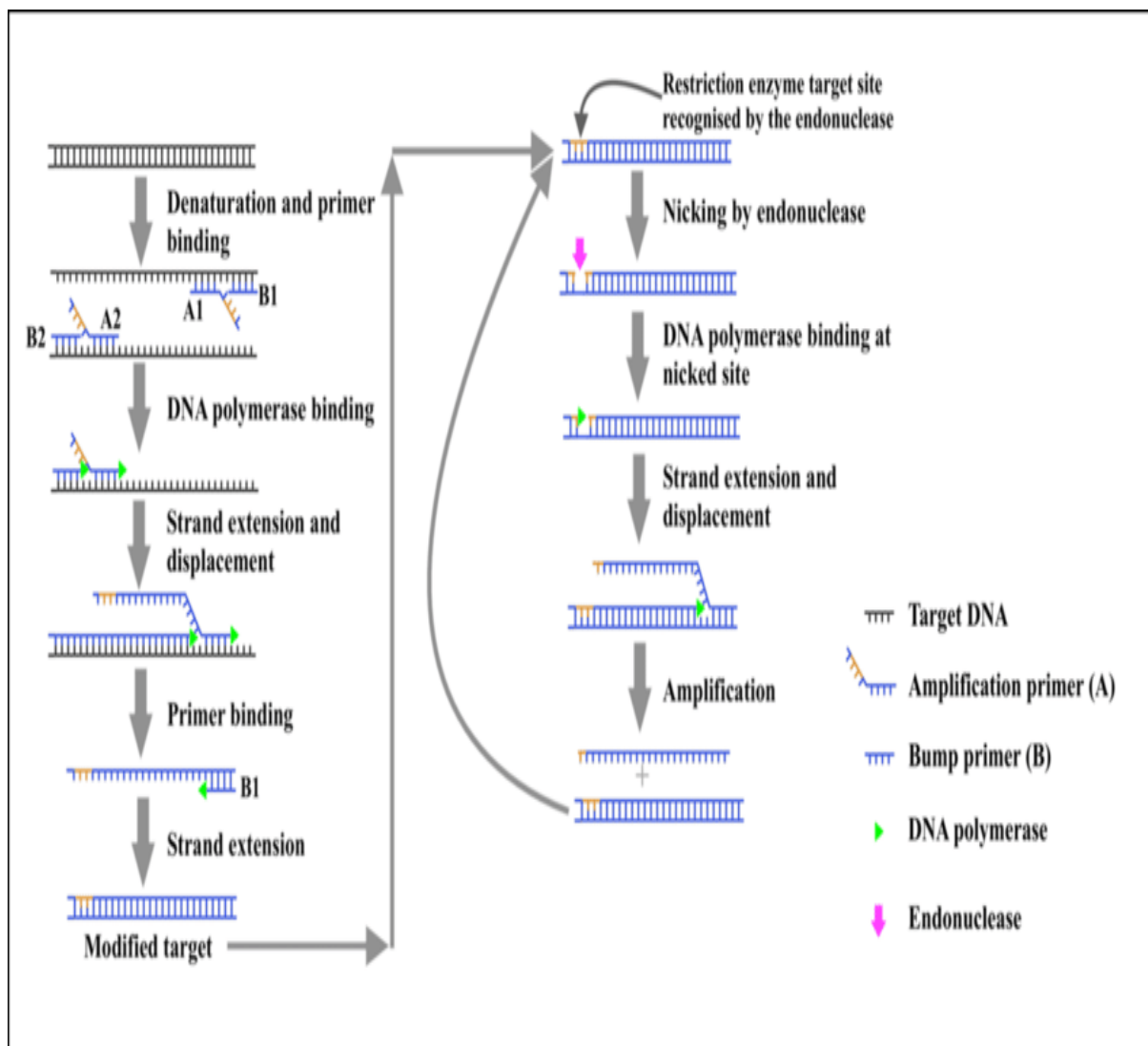


Figure 4. Principe détaillé de la SDA (22)

Dans le cas d'une séquence double brin, deux méthodes sont appliquées, soit par ajout d'une deuxième amorce au brin complémentaire du brin matrice, sinon une dénaturation du brin complémentaire (25).

2.5. La cycling probe technology (CPT)

La technique d'amplification du signal isotherme à la particularité de détecter et quantifier l'ADN cible amplifié.

Son principe est d'utiliser une sonde composite ; complexe composée d'ADN et d'ARN ou un fragment d'ARN niché entre chaque deux fragments d'ADN.

La sonde ADN-ARN chimérique s'hybride avec l'ADN cible dans le milieu réactionnel, et l'ARNase reconnaît spécifiquement le duplexe ADN-ARN et clive l'ARN interne.

Cette réaction déstabilise la sonde et sépare les fragments d'ADN les uns des autres, entraînant une excitation des deux fluorochromes (reporter et quencher) aux deux extrémités du fragment, cette séparation émettra une fluorescence dont la mesure est basée sur la quantité des sondes clivées, puis l'amplification du produit de la séquence déjà amplifiée pourra être mesurée (24,26).

2.6. L'ADN branché (bDNA)

L'acide désoxyribonucléique branché est une technique établie pour détecter et quantifier des ADN ou des ARN en évitant le passage par l'amplification comme première étape.

Elle a comme principe l'amplification d'une ou de multiples sondes hybridées à un acide nucléique cible. Ce système utilise une série de sondes spécifiques à la séquence cible, qui par la suite les immobilise sur un support solide. Ces sondes s'hybrident avec d'autres sondes, entraînant une amplification du signal quantifiable (Figure 5).

Cette méthode est actuellement utilisée pour diagnostiquer les infections virales en mesurant leur charge virale (27).

2.7. Le système de capture d'hybride

C'est une technique isotherme de signal qui quantifie l'acide nucléique déjà amplifié ce qui diminue considérablement le risque de contamination.

Au début, un ADN se combine avec une sonde d'ARN spécifique pour former un hybride ADN-ARN ; puis un anticorps relié à une microplaque s'attache à l'hybride pour donner un complexe qui est ensuite capturé par un anticorps combiné à une phosphatase alcaline.

La détection est mise au point par une réaction enzymatique où un substrat chimio luminescent est ajouté au milieu réactionnel puis clivé par l'enzyme présente dans le milieu qui est la phosphatase alcaline. Ce clivage émet une fluorescence mesurée par un fluoromètre (24,28) (Figure 6).

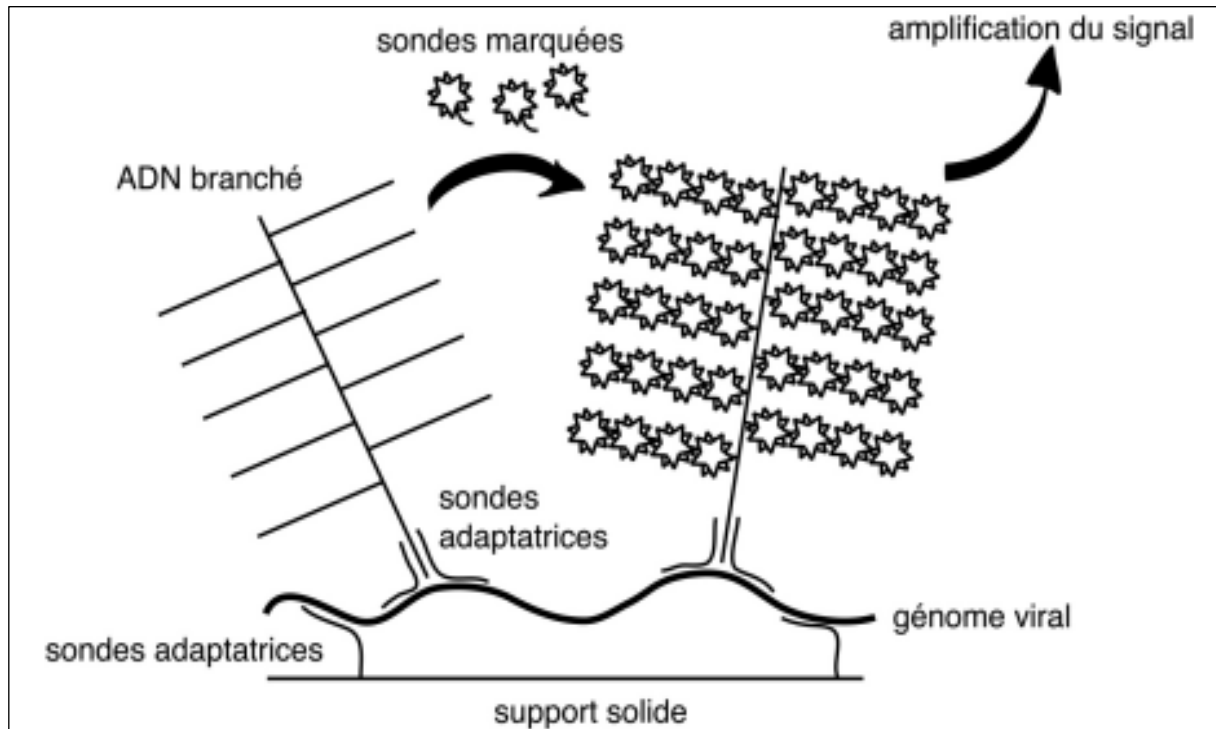


Figure 5. Principe de la technique de l'ADN branché (22)

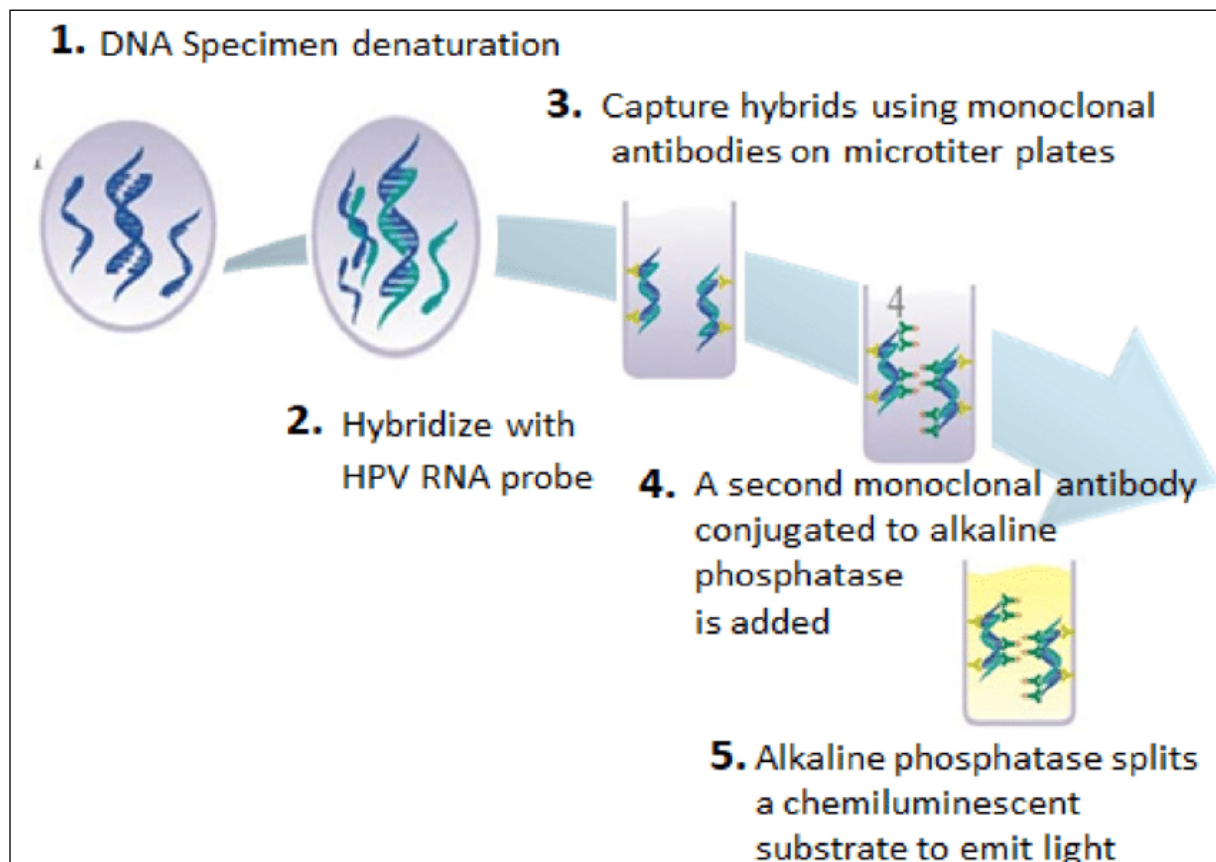


Figure 6. Principe du système Hybride capture (29)

CHAPITRE II
TECHNIQUES DE DETECTION

Afin de révéler un produit amplifié par PCR, de nombreuses autres méthodes de détection sont disponibles. Nous en évoquons quelques-unes.

1. Les puces à ADN et les micro-arrays

Ce sont des multi-capteurs permettant de caractériser et quantifier un acide nucléique dans un échantillon. Ils sont constitués d'un support de petite taille en plastique, en verre ou en silicium, sur lequel un grand nombre de sondes différentes ont été greffées, les unes après les autres, de manière ordonnée (6,30,31).

Ces deux systèmes plants différent au niveau de la miniaturisation, du mode de fabrication, du nombre de spots et de leur densité par unité de surface. Plus clairement, les micro-arrays possèdent quelques centaines à quelques milliers de spots par rapport aux puces qui en possèdent des dizaines de milliers à des millions.

Dans un premier temps, il suffit d'hybrider les sondes immobilisées sur la puce avec l'acide nucléique de l'étude qui a été préalablement amplifié par PCR puis marqué.

Après lavage, les hybrides sont identifiés (grâce au marquage des produits PCR) et interprétés à l'aide d'un ordinateur muni d'un logiciel spécifique à chaque application (30) (Figure 7).

2. Les billes magnétiques

Les billes magnétiques sont des billes sphériques composées d'un noyau en oxyde de fer non toxique revêtu d'un polymère qui peut être de la silice, de la cellulose ou bien du polystyrène, il possède la particularité d'être super paramagnétique (il ne présente aucune propriété magnétique sauf si il y a un aimant externe) ce qui lui permet de se disperser d'une façon uniforme dans le liquide (32).

Lors d'une extraction de l'acide nucléique et après une lyse cellulaire, plusieurs billes magnétiques sont ajoutées et utilisées comme support solide pour fixer l'ADN, la fixation se fait par formation de liaisons qui peuvent être soit covalentes en utilisant des groupes carboxyles ou hydroxyles à la surface de la bille (annexe 5).

Cette méthode est appliquée à la détection et à l'isolement de molécules d'ADN ou d'ARN.

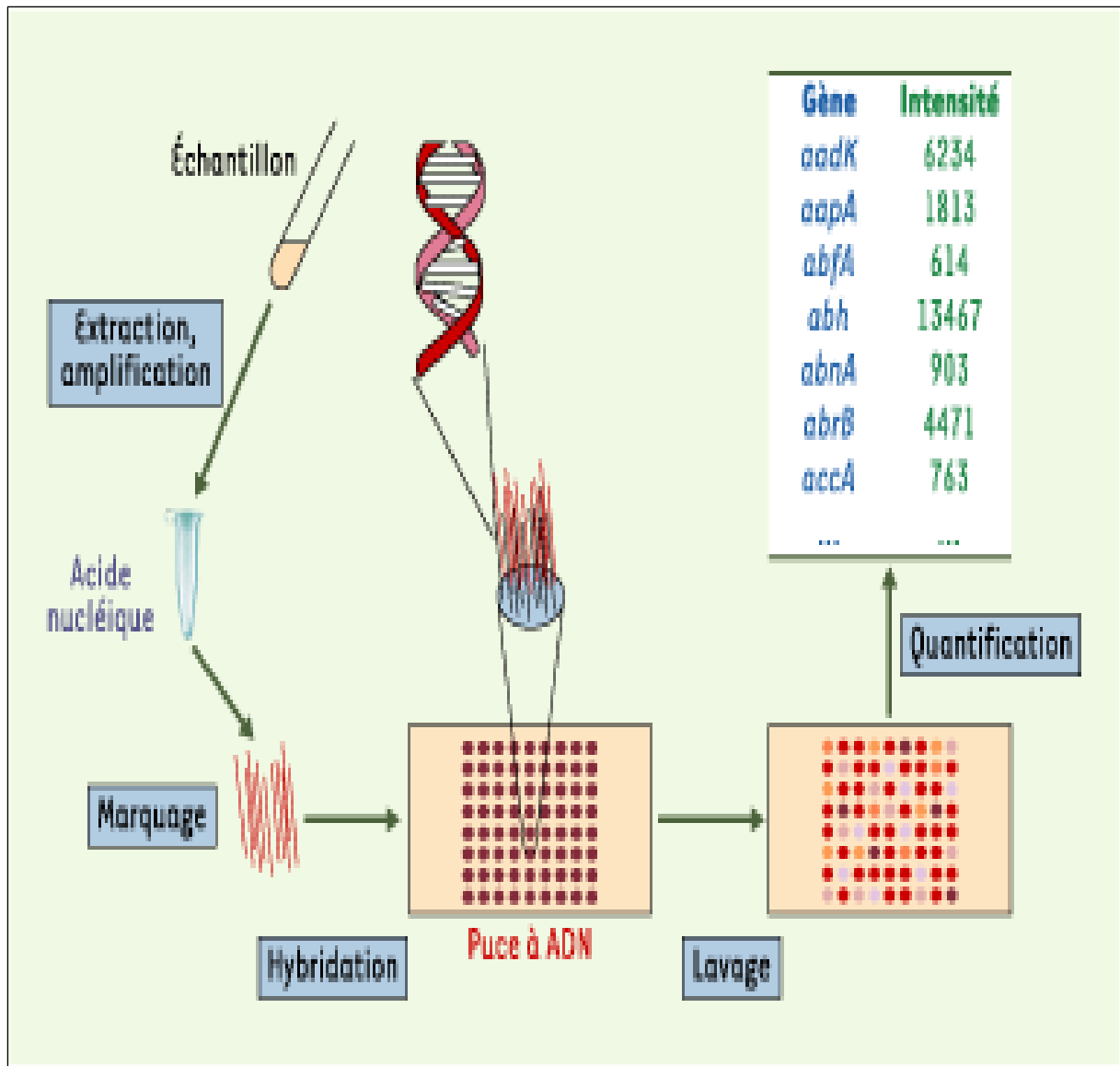


Figure 7. Principe des puces à ADN (31)

Sinon la liaison peut être non covalente, dans ce cas il y a recours aux billes revêtues de streptavidine qui se lie à la biotine fixée à l'ADN cible. Ce genre de billes est utilisé dans la purification de l'ADN et sa synthèse (33).

3. Le séquençage

Le séquençage proprement dit est une méthode qui établit l'ordre d'enchaînement des nucléotides A, T, C, G dans un brin d'ADN. Ce procédé permet par la suite l'acquisition des informations biologiques.

Le séquençage se définit sous deux termes, le premier terme est le re-séquençage c'est-à-dire déterminer la succession d'une séquence nucléotidique puis la comparer à une séquence de référence. Le deuxième terme est « le séquençage de novo » qui désigne le séquençage d'une séquence d'ADN inconnu sans pouvoir la comparer à une séquence de référence.

Le séquençage est utilisé pour identifier un agent infectieux surtout lorsque la culture est difficile, l'identification problématique ou dans certaines études épidémiologiques.

Le séquençage permet aussi le génotypage des virus et l'étude des résistances aux antiviraux (34).

Dans le cas des bactéries, la cible est souvent composée d'un (ou plusieurs) gène(s) codant pour l'ARN 16S ou la région « interspacer » séparant les gènes codant pour les ARN 16S–23S. D'autres régions peuvent être utilisées comme le gène codant pour la protéine du choc thermique (hsp65). Pour les champignons, la région D2 de la grande sous-unité de l'ARNr est couramment ciblée.

Cette technique présente cependant deux inconvénients. Les erreurs contenues dans les banques de données où les identifications par comparaison sont effectuées. De plus, comme le gène de l'ARN 16S est ubiquitaire chez les bactéries, la contamination bactérienne peut entraîner des erreurs de diagnostic.

Bien avant, le séquençage d'une molécule d'ADN utilisait la technique de Sanger comme méthode de référence, mais tout a radicalement changé. Les progrès de la technologie et de l'informatique révolutionna la biologie moléculaire et ceci par l'invention des automates, le séquençage est devenu totalement automatique (séquençage nouvelle génération), il est alors passé en haut débit (4).

En la microbiologie clinique, le séquençage nouvelle génération permet d'une façon plus performante de réaliser une analyse approfondie des épidémies, la détection des facteurs de virulence et de pathogénicité et la mise en évidence des gènes de résistances aux antibiotiques (35).

4. Les techniques d'hybridation

4.1. L'hybridation in situ (FISH, fluorescence in situ hybridization)

C'est une méthode de biologie moléculaire utilisée pour étudier l'ARN messager, l'ADN

et l'ARN d'origine virale. Elle permet la mise en évidence d'une séquence nucléique grâce à une sonde marquée à froid, généralement de petite taille, elle reconnaît spécifiquement la séquence complémentaire et forme un duplexe stable grâce à des liaisons hydrogène entre les nucléotides (36).

Les désoxyribonucléotides (dNTP) de la sonde s'associent à un fluorochrome qui peut être une biotine ou une digoxigénine, une fois l'hybridation effectuée, une fluorescence est émise puis détectée par microscopie à fluorescence ou par cytométrie en flux (37) (Figure 8).

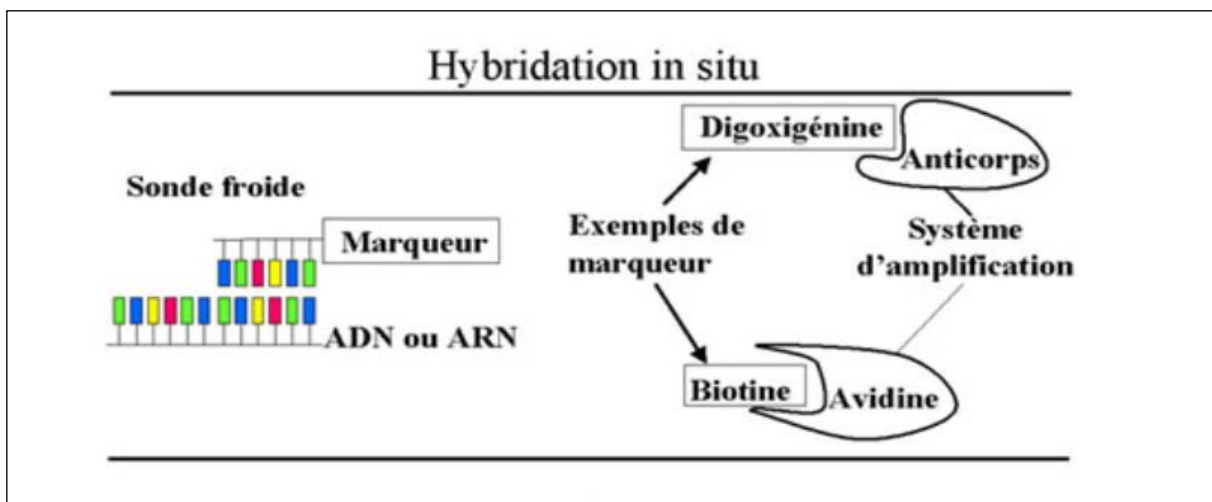


Figure 8. Exemples de marqueur dans l'hybridation in situ (38)

4.2. La reverse dot-blot : système LiPA (line probe assay)

Cette technique consiste à l'hybridation des séquences issues de la PCR, réalisée sur des bandes sensibilisées avec des sondes oligonucléotidiques pour que les gènes d'intérêts se fixent avec les sondes qui leur sont complémentaires et le résultat est révélé enzymatiquement.

Elle nécessite la connaissance parfaite de la région à étudier. Elle est généralement utilisée pour la détection des mutations ponctuelles (39).

4.3. La technique HPA (hybridization protection assay)

Cette technique utilise des sondes oligonucléotidiques pour la détection des acides nucléiques, chaque sonde est constituée d'une série de nucléotides complémentaires à la séquence cible associées à une molécule d'ester d'acridinium (AE) reliées par des liaisons covalentes.

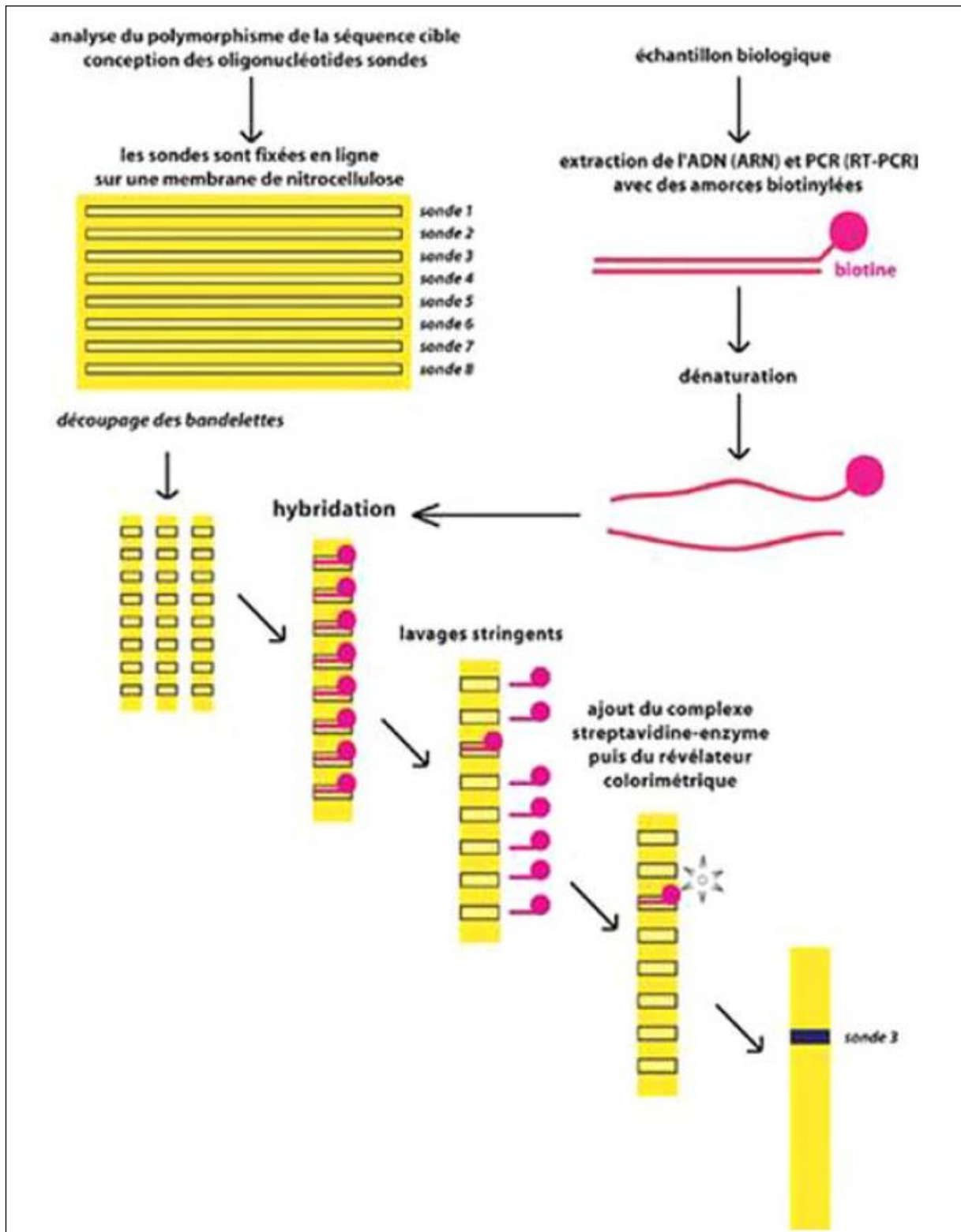


Figure 9. Procédure de la LiPA (39)

Dans une solution faiblement alcaline, lorsque la sonde s'hybride avec l'ADN cible, une liaison ester, de l'ester d'acridinium, est hydrolysée et l'interaction entre l'ester d'acridinium et le peroxyde alcalin produit une fluorescence mesurée par un luminomètre (24,40).

4.4. La spectrométrie de masse

Cette technique permet de détecter et identifier les molécules, elle permet même de les quantifier par mesure de leur masse.

Elle consiste à bombarder l'acide nucléique par un faisceau d'électrons (très énergétique), la molécule est ionisée et les ions résultants sont séparés selon leur rapport masse /charge (41).

Pour l'identification des microorganismes par cette méthode, les profils spectraux MALDI-TOF (matrix assisted laser desorption ionization-time of flight) sont utilisés et cela est fait par comparaison des résultats obtenus avec les bases de données (42) (annexe 6).

CHAPITRE III
CONTROLE DE QUALITE

1. Choix de la technique

La biologie moléculaire possède de nombreuses techniques enchevauchées appliquées dans la microbiologie clinique qu'elles soient réalisées pour une détection, une quantification ou un génotypage, le choix reste plus au moins difficile. Pour cela, la sélection revient au chercheur selon l'expérience, le budget du laboratoire et surtout les caractéristiques du microorganisme à étudier et à analyser.

Actuellement, les laboratoires favorisent les kits prêts à l'emploi pour leurs propriétés qui permettent de faciliter la mise en place de la technique tout en diminuant le taux des résultats faussement positifs (4).

2. Contrôle de qualité des résultats

Le contrôle de qualité des résultats cliniques est un contrôle à long terme du processus analytique pour révéler les erreurs durant la manipulation. Il consiste à repérer les erreurs entêtées soit à chaque dosage ou uniquement un seul par les résultats obtenus (43).

2.1. Résultats

En microbiologie, les résultats sont classés en deux sortes.

2.1.1. Résultat qualitatif

Il se traduit par la présence ou l'absence d'agent infectieux, le résultat positif dans une analyse moléculaire est interprété par l'existence de l'acide nucléique dans l'échantillon viral. Cependant chez les bactéries cette présence ne suffit pas pour juger, car la bactérie peut être morte et l'ADN est toujours présent. Pour cela, il faut chercher l'ARN bactérien pour confirmer que la bactérie est présente, viable et responsable de l'infection.

2.1.2. Résultat quantitatif

C'est la charge infectieuse généralement, il s'agit principalement de la charge virale dans le milieu hospitalier.

2.2. Prévention des erreurs

Il arrive parfois que les résultats soient faussement positifs ou faussement négatifs

surtout dans le cas des techniques d'amplification génique, pour cela, l'organisation d'un laboratoire de biologie moléculaire doit répondre à certaines formalités.

2.2.1. Faux positifs

Généralement, les résultats faussement positifs sont des conséquences de la contamination lors de la technique d'amplification. Pour cela, l'organisation responsable a mis quelques mesures indispensables pour modérer ce risque.

De ces mesures, l'utilisation d'automate qui diminue considérablement le risque de contamination provoquée par le manipulateur. Aussi l'utilisation de l'uracile N glycosylase (UNG) qui est généralement inclus dans les kits, et même dans le milieu réactionnel de la PCR en temps réel et de la SDA. Elle est basée sur l'intégration du dUTP (inexistant à l'état naturel) dans le mélange réactionnel de la PCR à la place du dTTP, l'activation de l'UNG avant la PCR permet le clivage des séquences contenant les dUTP ce qui permettra l'élimination partielle des contaminants présents dans le milieu et l'initialisation de la PCR (l'UNG sera ensuite éliminé par dénaturation thermique).

Enfin l'emploi des contrôles externes positifs et négatifs devient obligatoire pour garantir un résultat en microbiologie et ils sont obtenus comme ceci.

- Le contrôle positif, soit d'un échantillon positif (infectieux) ou bien d'un échantillon négatif dans lequel l'agent infectieux est rajouté ;
- Le contrôle négatif, c'est un blanc ; un mélange réactionnel sans ADN (remplacé par l'eau).

Pour ces deux contrôles, il est recommandé qu'ils soient utilisés à deux valeurs différentes dans l'étude quantitative.

2.2.2. Faux négatifs

Il y a des sortes de prélèvements biologiques comme le sang et les urines qui possèdent des inhibiteurs d'amplifications faussant les résultats ; même si l'agent infectieux est présent, le résultat restera négatif, donc il faut les éliminer. Pour cela, l'addition d'un contrôle interne est importante.

Aussi, pour éviter les résultats faussement négatifs, il faut assurer la qualité d'extraction de l'acide nucléique comme une première étape.

Presque toutes ces préventions sont présentes dans les kits prêts à l'emploi (4).

3. Avantages et inconvénients

La biologie moléculaire regroupe plusieurs techniques dont le principe et les indications diffèrent d'une technique à une autre, mais cela n'empêche pas le fait qu'elles partagent toutes quelques attributs. Comme le fait qu'elles aient la particularité de détection de tout agent infectieux connu qu'il soit d'origine bactérienne, virale, fongique ou parasitaire.

Elles sont considérées parfois comme les seuls outils capables de localiser les nouveaux agents infectieux et de faire la différenciation entre deux traits phénotypiquement identiques surtout après que leur performance a été améliorée par l'utilisation des automates.

Même si la biologie moléculaire est considérée comme idyllique, elle présente quelques inconvénients.

Dans certains cas, la détection d'acide nucléique ne prouve pas la viabilité du pathogène (surtout chez les bactéries) c'est-à-dire que l'ADN d'une cellule morte peut contaminer un échantillon et engendrer des résultats faussement positifs. Ou au contraire, l'obtention de faux négatif pourrait être causée soit par les inhibiteurs de l'amplification ou bien une mutation au niveau de la zone d'hybridation de l'amorce. Aussi, au niveau du laboratoire, la biologie moléculaire est généralement évitée dans le diagnostic, car son appareillage et ses kits sont considérablement coûteux, en plus de l'exigence du local à être plus adapté pour réaliser la technique moléculaire, le personnel se doit aussi d'être bien formé dans la manipulation moléculaire (4).

PARTIE II
INDICATIONS DE LA BIOLOGIE MOLECULAIRE

La biologie moléculaire possède la capacité de détecter tout agent infectieux cependant, les indications de la biologie moléculaire en milieu clinique sont plus limitées.

1. Les infections virales

Dans les laboratoires de virologie, des techniques ont été développées sous forme de kits avec des indications particulières pour permettre la détection de quelques agents viraux.

1.1 . Infections par le virus de l'hépatite C (VHC)

C'est un virus à ARN responsable d'infection hépatique aiguë transmissible, qui par la suite peut devenir chronique.

En clinique, le diagnostic direct repose d'abord sur un test sérologique basé sur la détection des anticorps spécifiques au VHC, puis un test moléculaire est réalisé dans trois cas de résultat : une sérologie positive au VHC, une sérologie négative avec une suspicion d'une hépatite C aiguë ou chez les immunodéprimés avec un résultat négatif à l'anticorps, mais la présence d'une hépatite C chronique est toujours suspectée et lors d'un traitement, des méthodes moléculaires sont utilisées dans le suivi thérapeutique.

Un test qualitatif est appliqué pour la détection de l'ARN viral par utilisation de plusieurs techniques moléculaires qui permettent d'établir un diagnostic, suivre le traitement et par la suite affirmer la guérison (tableau 1).

Ensuite, viennent les techniques de quantification de la charge virale (virémie) dans le but de déterminer l'évolution de l'infection au VHC et en même temps estimer l'efficacité du traitement thérapeutique, la quantification est effectuée généralement par une PCR en temps réel.

Le virus de l'hépatite C présente plusieurs génotypes (6 au total) ce qui diversifie le développement de la maladie et son diagnostic, c'est pour cela qu'un génotypage est nécessaire pour déterminer l'antiviral approprié et la durée du traitement (44,45).

1.2. Infections par le virus de l'hépatite B (VHB)

Responsable des hépatites aiguës qui évoluent en hépatites chroniques, le VHB est un virus à ADN de la famille des Hepadnaviridae, il se transmet prénatalement (mère-enfant), par infection nosocomiale ou dans les cas rares, par transfusion sanguine.

Tableau 1. Techniques moléculaires de diagnostic en microbiologie clinique du virus de l'hépatite C (HCV) (18,44)

Indications	Techniques moléculaires
Recherche de l'ARN viral (Amplification)	- PCR classique - Transcription mediated amplification (TMA) - Ligase chain reaction (LCR)
Quantification de l'ARN viral	- PCR en temps réel quantitative - PCR compétitive - PCR numérique - ADN branché
Génotypage	- Line probe assay (LIPA) - Séquençage

L'hépatite B chronique est caractérisée par une persistance de l'antigène HBs de six mois ou plus, chez 20 % des cas une évolution de 20-30 ans de la chronicité, une cirrhose peut se manifester puis se développer en un hépatocarcinome mortel.

Lorsqu'un patient est atteint d'hépatite B chronique, il passe par trois phases qui sont caractérisées par une corrélation entre la charge virale et le degré de lésion hépatique (présence de l'antigène HBe, l'anticorps HBe et le taux de la transaminase).

En microbiologie clinique, des tests biologiques, histologiques et moléculaires sont réalisés dans le suivi de l'infection hépatique, les examens moléculaires se basent principalement sur la quantification de l'ADN viral par des techniques spécifiques selon leur sensibilité et l'échelle de détection. Les résultats sont exprimés en UI/ml ou copies/ml (tableau 2).

Le virus possède 10 génotypes (A-J) mais seulement 8 (A-H) sont retrouvés à l'échelle mondiale. Avant chaque traitement, le génotypage et la charge virale doivent être établis pour assurer un bon choix et un bon dosage du traitement.

Généralement lors du traitement antiviral, une baisse de la lésion hépatique certifie une charge virale inférieure à 10^4 copies/ml. Cependant un traitement par les analogues nucléotidiques doit faire obtenir une charge virale inférieure à 10^3 copies/ml, et cela, dans le but de diminuer le risque de développement de résistance aux antiviraux (44,46).

Tableau 2. Techniques moléculaires de diagnostic en microbiologie clinique du virus de l'hépatite B (VHB) (44,47)

Indications	Techniques moléculaires
Quantification de l'ADN viral	- PCR classique
	- PCR en temps réel quantitative
	- PCR compétitive
	- PCR numérique
	- ADN branché
Génotypage	- LAMP
	- Séquençage
	- Reverse dot-blot
	- PCR-RFLP
	- Line probe assay (LIPA)

1.3. Infections par le virus de l'immunodéficience (VIH)

Il s'agit d'un virus à ARN simple brin de la famille des Retroviridae, retrouvé sous deux formes (VIH-1 et VIH-2), il s'intègre dans les lymphocytes CD4 et réalise une transcription inverse puis incorpore son ADN proviral dans le génome de l'hôte et reste en phase latente.

En clinique, l'infection du VIH passe par trois phases : une primo-infection où le virus se réplique de façon rapide avant le début d'une réponse immunitaire, une phase asymptomatique où le système immunitaire contrôle complètement l'infection virale. Elle est

traduite par une absence de signe d'immunodépression chez le patient et enfin la phase du SIDA, où le sujet présente les symptômes de l'immunodépression (taux faible de CD4) avec le développement d'autres infections opportunistes (tuberculose, candidose profonde ...) ou des tumeurs comme les cancers (48).

Depuis un échantillon sanguin, plusieurs tests sont mis au point (hormis la mesure du taux des CD4) :

Un test qualitatif par techniques moléculaires est utilisé seulement dans une suspicion d'une infection virale au VIH, cependant l'examen quantitatif par techniques moléculaires est souvent réalisé, car il permet de prévoir l'évolution de l'infection, sa transmission et le diagnostic approprié. Lors d'un traitement, l'objectif est mis à une charge virale inférieure à 50 copies/ml. Dans le cas d'un second prélèvement du même patient, le laboratoire doit utiliser la même technique avec le même kit appliqué dans le prélèvement précédent (chaque kit obtient des résultats absolus différents) (tableau 3) (44).

En 2013, l'OMS a recommandé que la mesure de la charge virale soit privilégiée dans le diagnostic et la confirmation de l'échec thérapeutique anti-VIH (EV). Ce dernier est défini par une charge virale supérieure à 1000 copies/ml de manière persistante lors d'un prélèvement de trois mois d'intervalle et six mois de début thérapeutique, le degré de l'EV est mesuré selon la charge virale (49).

Le génotypage est aussi appliqué dans le cas d'une résistance aux antiviraux causée par des mutations, il consiste en un séquençage du gène codant pour la reverse transcriptase, la protéase et la glycoprotéine de l'enveloppe (gp41) du virus avec la condition d'une charge virale inférieure à 1000 copies/ml (48).

Chez les patients atteints d'une infection au VIH, une co-infection est possible comme le cas d'une infection au VIH associée à une infection hépatique (44).

1.4. Infections par les herpès virus

1.4.1. Infections par les herpès simplex virus (HSV)

Ils sont considérés comme les agents infectieux les plus fréquemment rencontrés en milieu hospitalier. Ce sont des virus à ADN de la famille des Herpesviridae qui possèdent un cycle lysogénique ou il est intégré au génome des cellules hôtes et reste silencieux jusqu'à une réactivation qui provoque de graves complications surtout chez les immunodéprimés dans le

cas d'une transplantation d'organe ou co-infection au VIH.

Tableau 3. Techniques moléculaires de diagnostic en microbiologie clinique du virus de l'immunodéficience (VIH) (18,44)

Indications	Techniques moléculaires
Recherche de l'ARN viral (Amplification)	<ul style="list-style-type: none"> - PCR classique - PCR en temps réel - Transcription mediated amplification (TMA) - ADN branché
Quantification de l'ARN viral	<ul style="list-style-type: none"> - PCR compétitive - PCR en temps réel quantitative - PCR numérique - Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) - RT- PCR (reverse transcription amplification)
Détection des résistances anti-rétrovirales	<ul style="list-style-type: none"> - Séquençage

La recherche de l'ADN viral est considérée comme non bénéfique, car il détecte même les acides nucléiques en phase latente, malgré cela, des kits de détection des herpes virus sont disponibles par contre, lors de l'interprétation il faut être très attentif surtout pour les EBV, HHV6 et HHV7 (tableau 4).

La quantification est aussi appliquée sur les herpes virus surtout l'EBV, la charge virale évalue le progrès de l'infection et permet de suivre la performance du traitement (44).

1.4.2. Infections par le cytomégalovirus (CMV)

Appartenant à la famille des herpes virus, le cytomégalovirus s'infiltré à l'intérieur des

leucocytes du sang, s'intègre dans le génome hôte et reste en phase latente jusqu'à réactivation.

Tableau 4. Techniques moléculaires de diagnostic en microbiologie clinique des herpès simplex virus (HSV) (44,48)

Indications	Techniques moléculaires
Recherche de l'acide nucléique viral	-PCR classique
	-PCR en temp réel
	-Hybridation <i>in Situ</i>
	-Dot-blot hybridation

Il cible les immunodéprimés atteints du sida ou lors d'une transplantation d'organe d'autres infections, c'est pour cela qu'une détection rapide est importante.

La biologie moléculaire est considérée comme futile, car les examens qualitatifs ne distinguent pas l'ADN viral actif et latent. La mesure de la charge virale permet de s'informer sur l'état de l'infection et en même temps évaluer l'efficacité du traitement, en dépit de ça, il existe des kits commercialisés pour la détection et la quantification de l'ADN viral (tableau 5)(44).

1.5. Infections par le papillomavirus (HPV)

De la famille des Papovaviridae, le papillomavirus est un virus à ADN qui compte une centaine de types dont 14 sont considérés comme à haut risque par leurs capacités à provoquer des cancers. Transmis par contact sexuel, le HPV est responsable de 30% des cancers et en particulier le cancer du col de l'utérus qui est estimé être le 4^{ème} cancer le plus courant chez la femme. Les deux génotypes 16 et 18 du HPV provoquent 70% des cancers et lésions précancéreuses dans le col de l'utérus (44,51).

La prévention de l'infection se fait par un dépistage ou une vaccination. Le dépistage passe par deux tests selon un intervalle d'âge : Dans le cas d'une femme de 25-29 ans, un

examen cytologique est recommandé tous les 3 ans ou un frottis conventionnel est prélevé du col de l'utérus et mis en observation microscopique dans la recherche des anomalies au niveau des cellules du col utérin.

Tableau 5. Techniques moléculaires de diagnostic en microbiologie clinique du cytomegalovirus (CMV) (18,44,50)

Indications	Techniques moléculaires
Recherche de l'ADN viral (amplification)	- PCR classique
	- Ligase chain réaction (LCR)
	- Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA)
	- Hybrid capture
Quantification de l'ADN virale	- PCR en temps réel quantitative
	- PCR compétitive
	- PCR numérique

En 2011 la haute autorité de santé (HAS) a recommandé qu'un test HPV soit réalisé lorsqu'une femme atteint les 30 ans, il s'agit d'un examen de détection de l'ADN du HPV par plusieurs techniques moléculaires dans le but de mettre en évidence la présence d'une infection à HPV à haut risque. Cet examen doit être réalisé tous les 5 ans jusqu'à l'âge de 65 ans (tableau 6) (figure 10) (52).

Tableau 6. Techniques moléculaires de diagnostic en microbiologie clinique du Papillomavirus (HPV) (44,50)

Indication	Techniques moléculaires
Détection de l'ADN viral et génotypage	- Ligase chain reaction (LCR)
	- Hybrid capture

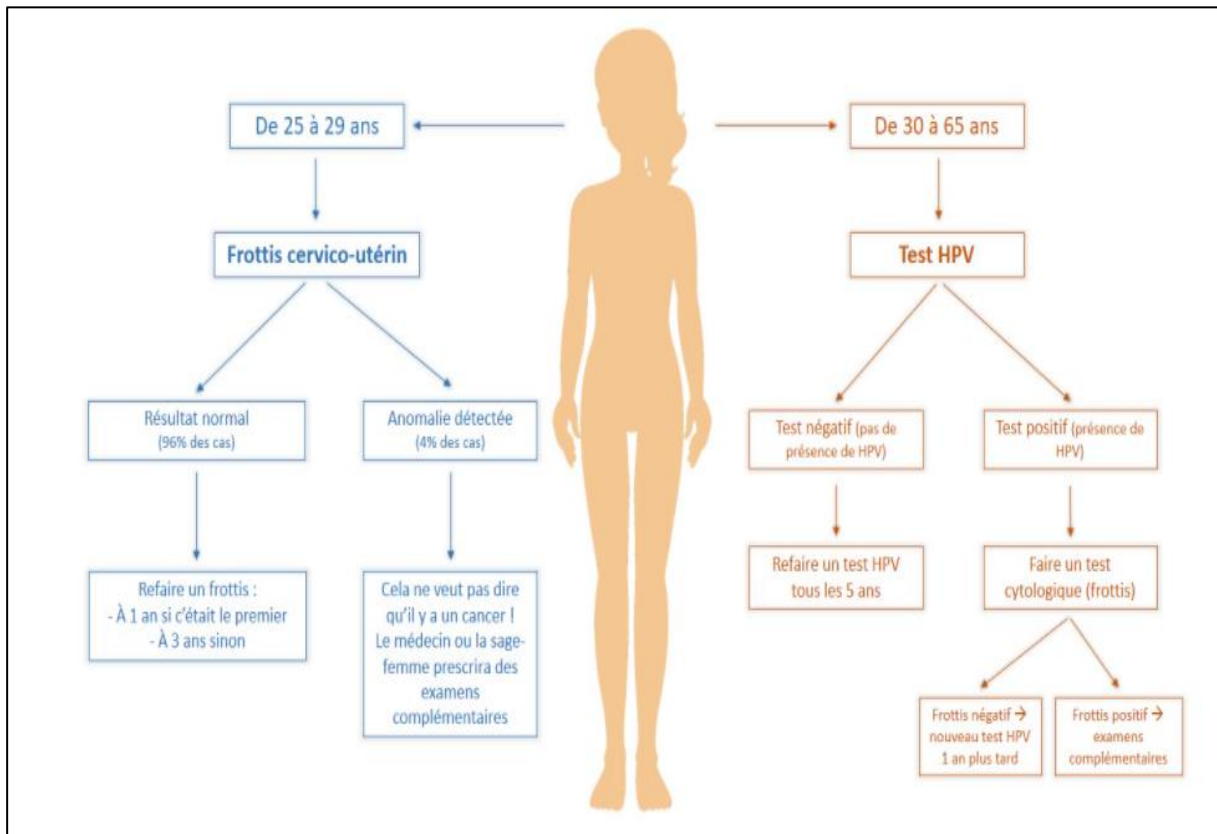


Figure 10. Tests appliqués dans le dépistage du virus HPV chez la femme (53)

1.6. Infections par les autres virus

Plusieurs autres virus sont détectés, quantifiés et séquencés dans le cadre de la microbiologie clinique, dans le tableau suivant plusieurs techniques sont citées selon le virus analysé (tableau 7).

2. Les infections bactériennes

2.1. Infections à *Chlamydia trachomatis* (CT) et *Neisseria gonorrhoeae* (NG)

Les infections à *Chlamydia trachomatis* et *Neisseria gonorrhoeae* sont les infections sexuellement transmissibles les plus courantes au niveau mondial causées par une bactérie. Selon l'OMS, il y a eu 131 millions de nouveaux cas d'infection à *Chlamydia trachomatis* et 78 millions de nouveaux cas d'infection à *Neisseria gonorrhoeae* en 2012 (54,55).

Tableau 7. Techniques moléculaires de diagnostic en microbiologie clinique d'autres virus (44,48)

Techniques moléculaires	Indications	
	Détection de l'acide nucléique viral	Quantification de l'acide nucléique viral
PCR en temps réel	- Virus West Nile	- Parvovirus B19
	- Influenza virus A/H5	- Virus de l'hépatite A
		- Virus Epstein-Barr (EBV)
		- Herpès simplex 1 et 2
		- SARS CoronaVirus
PCR numérique		- Varicelle-zona (VZV)
		- T-lymphotropic virus humain
		- Rhinoviruses
		- Virus de l'hépatite E
		- Parechovirus type 3
RT-PCR	- Virus West Nile	- Virus BK
	- Entéro-virus (en temps réel)	- Influenza virus A
	- SARS CoronaVirus(en temps réel)	
	- Virus respiratoire (RSV)	
	- Virus West Nile	

LCR	- Cowpox virus - SARS CoronaVirus
	- Virus respiratoire (RSV)
NASBA	- Entérovirus
	- Virus West Nile
TMA	- SARS Corona Virus
RCA	- Ebolavirus (EBOV)
LAMP	- Pseudorabies virus (PRV)
HDA	- SARS CoronaVirus
Séquençage NGS	- SARS CoronaVirus

Ces infections sont souvent asymptomatiques et même dans le cas de présence de signes, elles sont souvent légères au stade précoce mais peuvent entraîner de graves complications.

Précisément, chez la femme, ces deux infections se manifestent par une cervicite, une urétrite, une maladie inflammatoire pelvienne, une périhépatite ou une rectite et si elles ne sont pas traitées, la possibilité d'une grossesse extra-utérine ou même une infertilité.

Chez l'homme, elles peuvent provoquer une urétrite, une épididymite, une prostatite, une rectite, une arthrite réactive et une sténose urétrale (cas de NG).

Chez les nouveau-nés, elles causent une conjonctive et une pneumonie (causée juste par *Chlamydia trachomatis*) (56,57,58).

Chlamydia trachomatis est une bactérie à Gram négatif, anaérobie, intracellulaire obligatoire qui se réplique dans les cellules eucaryotes, possédant 18 sérovars (56).

La cultivation de CT en milieu de culture est difficile, c'est pour cela que des techniques de référence ont été établies mais elles sont coûteuses et longues. Malgré leur taux élevé de spécificité, elles présentent une faible sensibilité. Ceci est résolu par l'usage de tests

d'amplification des acides nucléiques (TAAN) qui représentent les tests les plus sensibles pour détecter *Chlamydia* avec 100 % de spécificité, et peuvent être effectués sur différents échantillons (endocervicaux, urétraux, vaginaux, pharyngés, rectaux ou urinaires) (44, 59).

Neisseria gonorrhoeae est une bactérie sous forme de diplocoques à Gram négatif, oxydase positive et elle à un mode de vie intracellulaire obligatoire. Sa croissance nécessite juste un milieu de culture sélectif et sa présence est confirmée par des tests biochimiques, des tests de substrats enzymatiques chromogènes, des tests immunologiques, des tests de sensibilité aux antimicrobiens ou bien des méthodes moléculaires (soit celles basées sur l'amplification ou bien sans amplification). Ces dernières offrent une spécificité de 100% et une sensibilité de 85% (44,57,60).

Parfois, des tests de biologie moléculaire sans amplification (hybridation directe) sont utilisés ; cependant, les tests utilisant des techniques d'amplification sont largement utilisés pour détecter CT et NG (tableau 8).

Généralement la spécificité et la sensibilité du test varient selon l'origine biologique de l'échantillon (urines, prélèvement urétral, endocervical ou vaginal) mais les kits restent équivalents entre eux sur le plan sensibilité et spécificité quelle que soit la technique d'amplification utilisée. Toutefois, il est recommandé de ne pas utiliser ces méthodes de test si le patient a suivi un traitement spécifique dans les trois semaines précédentes car elles ne peuvent pas différencier un organisme vivant d'un organisme mort. De plus, si un test d'amplification est utilisé dans une zone de faible endémie, certains auteurs recommandent un deuxième test de confirmation sur le même échantillon ou un nouvel échantillon si le résultat est positif (pour écarter les faux positifs), voire de réaliser une culture (61).

2.2. Infections à *Mycobacterium tuberculosis* (la tuberculose)

La tuberculose est une maladie infectieuse généralement causée par la bactérie *Mycobacterium tuberculosis*.

La tuberculose se diffuse d'une personne à une autre par voie aérienne. Lorsque les patients tuberculeux toussent, crachent ou éternuent, ils libèrent des bactéries tuberculeuses dans l'air. Une autre personne peut être infectée en inhalant des bactéries, ce qui favorise la prévalence de l'épidémie. Selon l'OMS, la tuberculose est l'une des 10 premières causes de mortalité dans le monde dont 1,4 million de personnes sont mortes de la tuberculose en 2019.

Tableau 8. Principales techniques utilisées pour détecter *Chlamydia trachomatis* et *Neisseria gonorrhoeae* (44)

Indications	Bactéries	Techniques moléculaires
Détection après amplification	- CT/NG	- PCR
	- CT	- PCR en temps réel
	- CT uniquement	- NASBA
	- la CT ou bien la NG	- TMA et HPA
	- CT/NG	- SDA
Détection directe sur échantillon	- CT/GC	- Hybrid Capture
	- CT et/ou NG	- HPA
Détection sur culture	- NG	- HPA
Détection combinée ou isolée de CT ou NG	- CT	- Hybrid capture

L'OMS estime aussi qu'à l'échelle mondiale, il y a 10 millions de personnes qui ont contracté la tuberculose en 2019 : 5,6 millions d'hommes, 3,2 millions de femmes et 1,2 million d'enfants.

La tuberculose touche tous les pays et toutes les tranches d'âge, mais c'est une maladie qui peut être évitable et guérie par un suivi rigoureux et un traitement adapté (à six mois le taux de guérison est de 85%) (62,63).

Cette bactérie a un revêtement cireux inhabituel à la surface, qui est principalement dû à la présence d'acide mycolique. Ce revêtement empêche les cellules d'être colorées au Gram, de sorte que *Mycobacterium tuberculosis* peut être à Gram négatif ou à Gram positif. C'est

pour cela que des colorants acido-résistants (tels que le Ziehl-Neelsen) ou fluorescents (tels que l'auramine) sont utilisés pour l'examen direct (des crachats généralement) pour identifier *Mycobacterium tuberculosis* au microscope (64).

Malheureusement, ce test nécessite au moins 10^4 bacilles acido-alcool-résistants/ml et ne permet pas de différencier les *M. tuberculosis* des autres mycobactéries.

La culture sur milieu de Lowenstein-Johnson confirme l'infection par *M. tuberculosis* en représentant l'examen de référence, mais elle nécessite une longue durée (quatre à six semaines).

La biologie moléculaire a réduit considérablement ce délai (12-14 jours) avec l'augmentation de la sensibilité de détection.

Tout d'abord, le diagnostic précoce est nécessaire pour un traitement efficace. Certains kits sont développés pour diminuer la durée de diagnostic de la tuberculose pulmonaire. Ils sont très performants lors de l'étude des crachats positifs après coloration spécifique avec une sensibilité supérieure à 95 %, et une spécificité de 100 % ou même les échantillons négatifs avec une sensibilité moins bonne (80- 85 %) et une bonne spécificité (99%) mais la technique est moins sensible (56%) lors de l'analyse du liquide céphalorachidien dans le cas des méningites tuberculeuses avec une spécificité de 98% . Ces tests bien qu'ils soient rapides et spécifiques, leur sensibilité varie selon la nature des échantillons. Pour éliminer ce problème, des améliorations dans les kits d'extraction ont été effectuées. Certaines cultivent dans le milieu Lowenstein-Jensen pendant une courte période de 2-3 jours avant d'effectuer l'amplification (tableau 9).

Aussi les chercheurs ont rapporté leur expérience à l'aide du développement personnel d'outils de recherche par biologie moléculaire (technique « maison ») et les études faites en comparant les kits et les techniques « maisons » ont montré des résultats positifs (les deux sont équivalents) (44).

Tableau 9. Principales techniques utilisées pour détecter *Mycobacterium* (44)

Indications	Techniques moléculaires
Détection après amplification	- PCR - TMA et HPA
Détection après amplification	- NASBA et reverse dot-blot - PCR en temps réel
Détection directe sur prélèvement	- reverse dot-blot
Détection sur culture	- HPA - Reverse dot-blot

2.3. Autres infections bactériennes

Tout agent infectieux peut être détecté par des outils de biologie moléculaire. Bien qu'il existe de nombreuses techniques d'amplification, la principale technique utilisée reste la PCR (tableau 10).

La biologie moléculaire présente de nombreux avantages par rapport à la culture qui est la technique de référence.

En fait, la biologie moléculaire est plus rapide et plus sensible que la culture. Cependant, selon l'échantillon, la PCR est parfois limitée car certains échantillons contiennent des inhibiteurs difficiles à éliminer (comme les crachats, l'urine, les selles...).

Nous présentons quelques lignes directrices utiles pour la biologie moléculaire en bactériologie :

➤ **Les agents difficilement ou non cultivables**

Par exemple, *Bordetella pertussis*, *Borrelia burgdorferi* ou *Tropheryma whippelii*.

➤ **Les bactéries opportunistes**

Par exemple, *Legionella sp.*

➤ **Les bactéries traditionnellement détectées par la sérologie**

Par exemple, la toxine *Escherichia coli* O157 :H7 ou les antigènes du *Streptococcus* groupe A.

➤ **Certaines bactéries pouvant être présentes en absence de pathologie**

Par exemple, *Streptococcus pneumoniae* (la quantification de la bactérie a été proposée pour apprécier son rôle dans la pathologie étudiée).

➤ **Un diagnostic infectieux d'urgence**

Par exemple, suspicion d'une méningite à *Neisseria meningitidis*, à *Streptococcus pneumoniae* ou à *Haemophilus influenzae*.

➤ **la recherche de résistance aux antibiotiques**

par exemple *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline ou *Enterococcus sp* résistant à la vancomycine (44).

2. Les infections fongiques

Les infections fongiques sont fréquentes dans le milieu hospitalier, surtout les mycoses invasives opportunistes considérées comme bénignes.

Généralement, le diagnostic est réalisé par méthodes classiques (cultures, tests enzymatiques) ; mais pour le cas des mycoses invasives, la biologie moléculaire est la plus adaptée dans l'identification des souches et l'étude des résistances antimycosiques.

Chez les immunodéprimées, plusieurs pathologies sont causées par les champignons surtout les espèces *Aspergillus sp.* *Candida sp.* et *Pneumocystis sp.*

Depuis son intrusion dans les laboratoires cliniques, la biologie moléculaire a permis la détection de beaucoup d'espèces de champignon, les techniques utilisées ont pu diminuer considérablement le taux de contamination comparées aux méthodes traditionnelles (tableau 11).

du gène PVL	
Détection	sur
échantillon clinique	
	<p>- <i>Streptococcus</i> groupe A</p> <p>- HPA</p> <p>- identification directe des germes impliqués dans les vaginites (<i>Candida sp. Gardnerella vaginalis et Trichomonas vaginalis</i>)</p> <p>- <i>Streptococcus B</i></p> <p>- Détection de la résistance à la méthicilline du <i>Staphylococcus aureus</i></p> <p>-<i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Staphylococcus coagulase négative</i>, <i>Streptococcus spp.</i> , <i>Enterococcus Faecium</i> et <i>Enterococcus faecalis</i>, <i>Escherichia coli</i>, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et <i>Enterobacterium spp</i>)</p> <p>- Détection direct des staphylocoques dorés résistants à la méthicilline</p>
	<p>- Hybridation par sonde ADN</p> <p>- Hybridation directe</p> <p>- Hybridation in situ par fluorescence sur sang total</p> <p>- Reverse dot-blot</p>

●Détection des bactéries

**Pseudomonas aeruginosa*

* *Enterococcus faecalis* - PCR en temps réel

**Staphylococcus aureus*

et staphylocoques coagulase
négatifs

* *Borrelia sp.*

**Campylobacter sp.*

**Listeria monocytogenes sp.*

●Recherche de résistance aux traitements :

* Recherche de résistance à la
méthicilline (MecA) des
Streptococcus

sp

* Recherche de résistance à la
vancomycine (vanA/vanB) des

Enterococcus sp.

Dans le diagnostic clinique, la mise en évidence des mycoses se fait à partir du liquide broncho-alvéolaire (LBA). Lors de la lecture des résultats, des contaminations par spores ou conidies peuvent donner des faux positifs. C'est pour cela qu'il est recommandé d'utiliser un prélèvement sanguin total (prélèvement de l'échantillon direct ou dans un milieu de culture) avec l'obligation d'une grande attention lors de l'interprétation des résultats, car les champignons peuvent faire partie de la flore commensale comme le cas de *Candida albicans* ou bien l'ADN fongique appartient à des champignons nécrosants, dans ce cas-là une

quantification de l'acide nucléique est réalisée pour pouvoir identifier la cause de l'infection en cas de résultat positif.

Dans certains laboratoires, les chercheurs optent pour une analyse par des automates d'extraction ou une association des tests biologiques (PCR ciblant les ADN ribosomique 18s, 28s ou les régions ITS (internal transcribed space) et sérologiques (ELISA) (65).

Malgré les avancées prometteuses, les outils de la biologie moléculaire nécessitent une standardisation et une optimisation pour valider leur application dans les laboratoires cliniques de routine.

Tableau 11. Techniques moléculaires appliquées dans la détection et l'identification des champignons (44,66)

Indications	Techniques moléculaires
Détection de l'ADN fongique	- PCR en temps réel
	- Rolling circle amplification (RCA)
	- hybridization protection assay (HPA)
	- Hybridation <i>in situ</i> (FISH)
Identification générale des champignons	- séquençage

3.1. Infections à *Candida spp.* (Candidoses)

Ce sont des infections causées par des levures nommées *Candida*, qui ciblent le tube digestif ou les muqueuses. Elles sont généralement opportunistes surtout dans le cas d'un système immunitaire affaibli ou d'un diabète (67).

Lorsqu'un patient est suspecté d'une candidose, les laboratoires cliniques optent tout d'abord pour les tests classiques comme la culture, l'examen macroscopique et microscopique qui permet l'identification du pathogène et le choix de l'antifongique. Cependant en cas de candidose profonde, les méthodes traditionnelles deviennent non fiables car elles ne permettent

pas l'identification précise de l'agent causal d'origine fongique. Dans de telles circonstances, les chercheurs se sont penchés vers la biologie moléculaire.

Dans le diagnostic des candidoses profondes, les techniques moléculaires permettent une analyse qualitative et quantitative avec un risque de contamination beaucoup plus faible surtout par l'application de la PCR en temps réel. Cependant, par manque de standardisation, des techniques moléculaires de détection fongique et de kits commerciaux, le diagnostic par les techniques moléculaires reste non appliqué en laboratoire clinique de routine.

L'identification des candidoses est appliquée dans le cas où l'espèce doit être connue pour traiter la candidose avec l'antifongique adéquat. Dans le cadre médical, c'est la technique du séquençage qui est la plus appliquée grâce à sa rapidité et sa précision d'identification (tableau 12) (68).

3.2. Infections aux mucorales (mucormycoses)

Ce sont des infections invasives provoquées par des champignons filamenteux faisant partie de l'ordre des *Mucorales*. Elles peuvent être soit pulmonaires, cutanées ou cérébrales avec un taux de mortalité assez élevé (entre 45 et 64%), surtout chez les immunodéprimés et les diabétiques.

Dans les laboratoires cliniques, les mucormycoses sont généralement diagnostiquées par un examen histologique et une culture de l'agent pathogène à partir de sécrétions respiratoires et d'une biopsie. Ces méthodes sont assez efficaces dans le diagnostic médical mais limitées, car la prise en charge du patient atteint n'est pas assez rapide à cause de la lenteur du diagnostic et l'incapacité d'identifier d'une façon précise l'agent causal (espèce). C'est pour cela que plusieurs études se sont orientées vers la biologie moléculaire.

Plusieurs travaux ont appliqué plusieurs méthodes moléculaires afin de distinguer les techniques adéquates dans l'identification des mucormycoses, parmi les plus favorisées, la technique de séquençage et la spectrométrie de masse qui ciblent les régions ITS de l'ADN ribosomique (65).

Malgré ces résultats, l'application de ces techniques reste limitée par faute de difficultés d'extraction, en plus de l'absence de standardisation des tests dans les laboratoires cliniques (69).

Tableau 12. Techniques moléculaires de diagnostic en microbiologie clinique des candidoses (67)

Indications	Techniques moléculaires
Détection de l'ADN fongique	- PCR classique - PCR en temps réel - Nested-PCR - PCR multiplex
Identification de l'espèce de candidose	- Séquençage

4. Les infections parasitaires

Les maladies parasitaires constituent un problème majeur de santé publique dans le monde. Elles sont généralement diagnostiquées par des méthodes traditionnelles comme l'examen direct, coproculture, test immunologique... .

La biologie moléculaire s'est beaucoup développée dans les infections parasitaires. Cependant, il n'y a pas beaucoup de types de kits pour ces microorganismes. De plus, dans la littérature, on retrouve principalement des tests « maison »(44).

4.1. Infections à *Plasmodium* sp. (Le paludisme)

Le paludisme est une maladie parasitaire potentiellement mortelle qui se transmet à l'homme par la piqûre d'un moustique *anophèle* femelle infectée. Le paludisme peut être prévenu et peut-être guéri. L'OMS a estimé qu'en 2019, le nombre des cas de paludisme dans le monde a atteint 229 millions de cas (70).

Le dépistage de ce parasite se fait par frottis et goutte épaisse, il permet d'établir le diagnostic en 30 minutes mais il laisse le champ à la possibilité d'avoir des résultats faussement négatifs.

La PCR ne permet pas de différencier ente les espèces de *Plasmodium* et elle rend les

résultats en durée de deux heures (avec l'inclusion d'extraction) mais elle présente une excellente sensibilité ; de 5-10 parasite/ μ l au contraire au test de référence qui a une sensibilité plus faible de 50-500 parasite/ μ l et en plus la PCR en temps réel permet de quantifier le parasite aussi (tableau 13).

Par ailleurs, la combinaison des deux techniques (l'étude au microscope et PCR) est excellente bien qu'elle est faiblement utilisée et la biologie moléculaire est réservée aux grands centres spécialisés (44).

Tableau 13. Principale technique pour l'identification de *Plasmodium* (44)

Pathogène	Technique moléculaire
<i>Plasmodium sp</i>	PCR TaqMan en temps réel

4.2. Infections à *Toxoplasma gondii* (la toxoplasmose)

La toxoplasmose est une maladie endémique causée par une infection parasitaire, qui est généralement transmise à l'homme par les animaux domestiques (en particulier les chats) ou par l'ingestion de viande insuffisamment cuite. La plupart des gens souffrent d'une maladie bénigne, mais elle provoque parfois des symptômes grippaux, qui peuvent être dangereux pour les personnes dont le système immunitaire est affaibli ou les femmes enceintes car cela affecte le développement du fœtus (toxoplasmose congénitale) (71).

La détection se fait par sérologie qui permet d'évaluer le risque de transmission fœto-maternelle et de réactivation chez les immunodéprimées et elle se confirme par incubation à la souris.

La PCR peut remplacer la technique d'incubation à la souris en étudiant le liquide amniotique ou bien le sang total pour un diagnostic rapide (c'est possible d'utiliser d'autres échantillons aussi). Malheureusement, il n'existe pas de kit pour ça. Des contrôles de qualité sont disponibles pour homogénéiser les techniques et les cibles amplifiées (44).

4.3. Autres infections parasitaires

D'autres exemples de parasites sont examinés à l'aide de méthodes de biologie moléculaire : *Leishmania sp* (la leishmaniose), *Babesia sp* (la babésiose), *Trypanosoma sp* (la trypanosomiase), *Giardia sp* (la giardiase), *Trichomonas sp* (la trichomonase), *Cryptosporidium sp* (la cryptosporidiose), *Entamoeba sp* (l'amibiase) et *Encephalitozoon sp* (la microsporidiose). Dans tous ces cas il n'y a pas de kits, juste des techniques « maison » sont utilisées (tableau 14) (44).

Tableau 14. Principaux parasites détectés par la PCR en temps réel (44)

Parasites	Technique moléculaire
- <i>Plasmodium sp</i>	
- <i>Babesia sp</i>	
- <i>Trypanosoma sp</i>	
- <i>Leishmania sp</i>	
- <i>Toxoplasma sp</i>	PCR en temps réel
- <i>Cryptosporidium sp</i>	
- <i>Enterocytozoon sp</i>	
- <i>Encephalitozoon sp</i>	
- <i>Entamoeba sp</i>	
- <i>Giardia sp</i>	

5. Le bioterrorisme

Il est défini comme étant l'utilisation d'agent vivant comme les virus ou les bactéries dans le but de nuire ou augmenter les chances de mortalité chez l'humain, l'animal ou la plante (72).

Suite à l'épisode des courriers piégés à l'anthrax aux États-Unis en 2001, la lutte contre le bioterrorisme est devenue primordiale. Plusieurs pays ont développé des techniques en

particulier moléculaires de détection des agents bioterroristes qui permettent l'élaboration d'un traitement rapide pour diminuer au maximum la transmission des maladies (tableau 15) (73).

Tableau 15. Principaux agents du bioterrorisme détectés par la PCR en temps réel (44)

Pathogène	Technique moléculaire
<i>Bacillus anthracis</i>	
<i>Yersinia pestis</i>	
<i>Francisella tularensis</i>	
Smallpox	
<i>Clostridium botulinum</i>	
Virus de Lassa	PCR en temps réel
<i>Escherichia coli</i> O157 :H7	
<i>Salmonella sp</i>	
<i>Brucella sp</i>	
<i>Listeria sp</i>	
Dengue Virus	
Orthopox Virus	

PARTIE III

APPORT DE LA BIOLOGIE MOLECULAIRE DANS LE DIAGNOSTIC CLINIQUE : RESULTATS A PROPOS DE QUELQUES ETUDES

La biologie moléculaire a profondément contribué à la mise en évidence des agents pathogènes difficilement délectables par les méthodes traditionnels.

Dans cette partie nous mettons en évidence l'apport des techniques moléculaires dans le diagnostic des infections en nous basant sur les résultats de quelques études en fonction des données de la littérature concernant les infections bactériennes, virales, fongiques et parasitaires.

1. Apport des techniques moléculaires dans le diagnostic des infections virales

1.1. Etude 1. Undiagnosed hepatitis C virus infection in hemodialysis patients: Value of HCV RNA and liver enzyme levels (74)

L'hépatite est une maladie souvent causée par un virus qui pénètre à l'intérieur des cellules hépatiques, se multiplie, et provoque leur désintégration par le système immunitaire, ce qui entraîne une inflammation du foie.

Certain virus ne sont qu'à l'origine d'une hépatite aiguë. D'autres comme le VHC qui est un virus à ARN, peuvent se développer en une forme chronique grave qui est susceptible de provoquer une cirrhose ou un cancer du foie (75) (Figure 11).

Le diagnostic de l'hépatite repose tout d'abord sur la sérologie par la technique ELISA qui donne un résultat 100 % fiable surtout chez les sujets immunocompétents. Cependant, il existe des cas où le résultat donne un faux négatif surtout chez les immunodéprimés ou dans le cas d'une transplantation d'organe, pour cela un deuxième test est toujours conseillé avec des tests de confirmation (western blot) (76).

Dans le cas du VHC, une simple détection de l'anticorps anti-virus C permet de constater la présence ou l'absence du virus mais, il ne nous renseigne pas sur l'état de l'infection (récente ou ancienne) (77).

Dans le cas d'une suspicion sur les résultats sérologiques, des méthodes moléculaires sont utilisées.

Le dépistage de l'ARN du VHC est réalisé par des tests qualitatifs comptant principalement la technique de PCR pour cause de sa grande sensibilité.

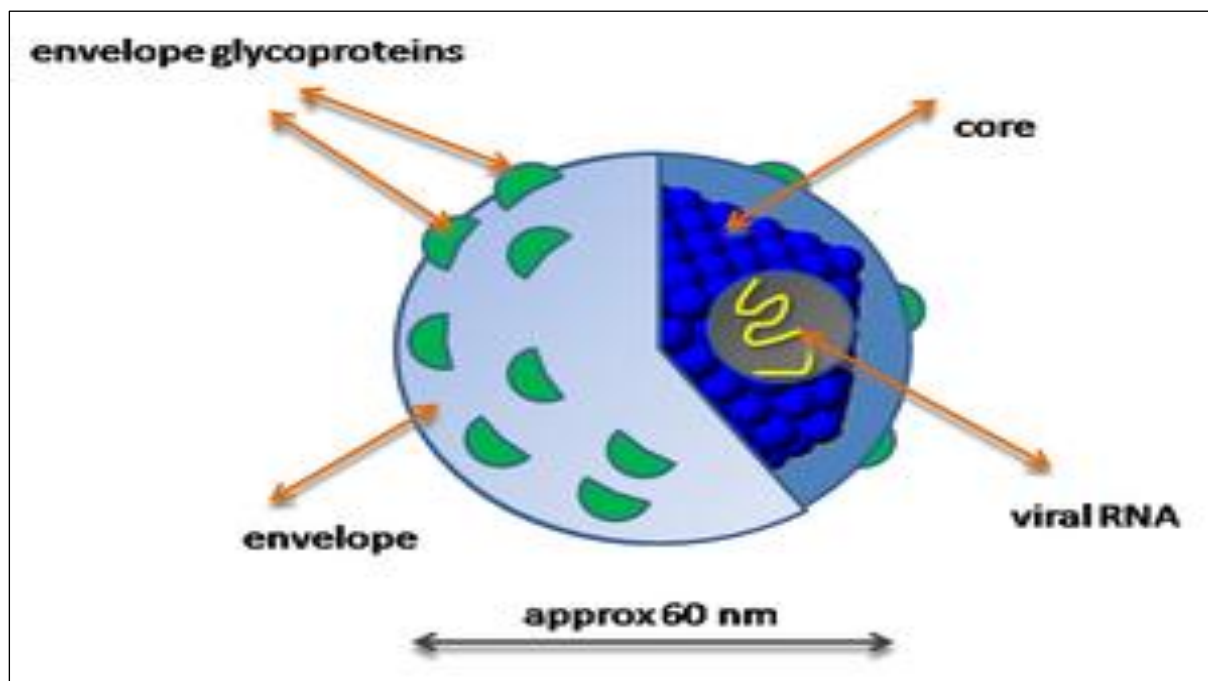


Figure 11. Structure physique du virus de l'hépatite C (VHC) (78)

Elle est mise en pratique grâce à des kits commercialisés accompagnés par des réactifs qui diminuent au maximum le risque de contamination et donc les chances d'apparition de résultats faussement positifs (cela est possible aussi dans le cas où le test est réalisé dans un automate).

Actuellement, la TMA (transcription mediated amplification) qui est une technique d'amplification isotherme qui vise l'ARN simple brin est utilisée dans le diagnostic clinique de l'hépatite C (79).

La mesure de la charge virale du VHC fait appel à des techniques spécifiques, généralement utilisées avant un traitement pour permettre le choix adéquat de l'antiviral. Elle est réalisée entre la 4^{ème} et 12^{ème} semaine de l'infection dans le but de donner un diagnostic bien précis pour l'infection hépatique.

Le génotypage est réalisé avant le traitement, il permet de s'informer sur le génotype du virus de l'hépatite C (6 génotypes) et par la suite établir le type et la période du traitement (77).

Résultats de l'étude

Cette étude qui a utilisé les techniques moléculaires (PCR), a été menée pour pouvoir proposer des alternatives dans l'amélioration de la détection du VHC chez les personnes hémodialysées tout en diminuant les premiers diagnostics réalisés par le test d'anticorps anti-VHC.

L'étude a concerné 112 patients hémodialysés. Ces derniers ont tous été testés négatifs au VHB et au VIH (par technique sérologique de routine). Les échantillons ont été analysés par technique ELISA pour la détection d'anticorps anti-VHC, L'ARN extrait a ensuite été retranscrit en ADN et par la suite amplifié par une nested PCR qui ciblait la région non codante 5'conservée.

Les résultats ont démontré qu'en raison de la PCR, malgré la faible spécificité et sensibilité par rapport à la sérologie (72,2% et 62,5%, respectivement), la présence du VHC a été détectée chez les patients déjà diagnostiqués négatifs par l'absence d'anticorps anti-VHC. Le patient n'a pas produit d'anticorps détectables par l'ELISA (Tableau 16).

Tableau 16. Résultats des tests sérologiques et moléculaires (74)

Tests	Sérologie (ELISA)	Biologie Moléculaire (PCR)
Résultats positifs	30,4 % (34/112)	28.2 % (22/78)
Résultats négatifs	69,6 % (78/112)	71,8 % (56/78)

En conclusion, l'étude a démontré l'efficacité de la détection de l'ARN virale par l'utilisation de la PCR sur les patients hémodialysés et surtout lorsque les tests sérologiques sont négatifs, c'est-à-dire une absence des anticorps anti VHC dans l'organisme (74).

1.2. Etude 2. Evaluation of a Rapid Diagnostic Assay for Detection of SARS-CoV-2 Antigen in Nasopharyngeal Swabs (80)

Le virus « SARS-CoV-2 » à l'origine de la pandémie Covid-19 (en cours), est responsable de la maladie à coronavirus ; cette maladie respiratoire aiguë sévère a entraîné des millions de cas confirmés et de décès dans le monde. Il se diffuse rapidement chez l'homme par le biais de gouttelettes respiratoires et de contact.

C'est un virus enveloppé à ARN, simple brin positif, avec un diamètre compris entre 60 et 140 nm. Il a été isolé et séquencé pour la première fois en Chine en janvier 2020 (Figure 12).

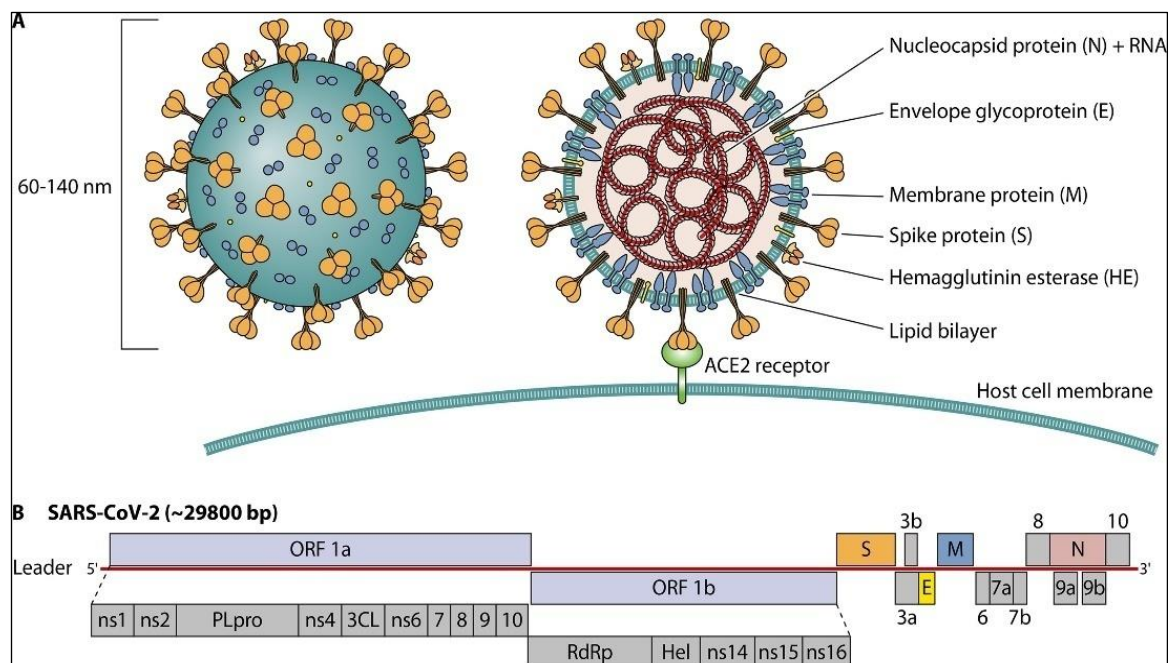


Figure 12. Structure physique et génomique du SARS-CoV-2 (81)

Pour son diagnostic, la cible principale diffère du génome viral (ARN) aux protéines codées selon les tests utilisés qu'ils soient des tests sérologiques avec une sensibilité d'environ 71% ou bien des tests moléculaires. La technique de la RT-PCR en premier lieu comme test de référence et la PCR multiplex sont considérés comme efficaces et rapides (trois à cinq heures) selon l'échantillon (soit des écouvillonnages nasaux ou bien la salive facile à prélever et offre moins d'interaction lors de l'échantillonnage) (81–83).

Résultats de l'étude

L'étude sous-mentionnée visait la détermination de l'efficacité d'un test de diagnostic rapide (COVID-19 Ag Respi-Strip) en le comparant au test de référence (RT-PCR).

138 prélèvements ont été testés lors de l'apparition des premiers symptômes, il s'agissait de sécrétions nasopharyngées. Quatre réactions de PCR ont été lancées (quatre kits commerciaux différents (RealStar [Altona Diagnostics], kit de détection du nouveau coronavirus Bosphore (2019-nCoV) [Anatolia Geneworks], Cobas 6800 [Roche], Nouveau test CoV Allplex 2019 [Seegene]). Plus d'un test de diagnostic sérologique rapide (COVID-19 Ag Respi-Strip (Coris)) (Tableau 17).

Tableau 17. Résultats qualitatifs de la détection de SRAS CoV 2 de chaque test et leur sensibilité (80)

Test	RT-PCR	Test sérologique rapide
Résultats positifs	68,8% (94/138)	34,1 % (47/138) « même échantillons positifs que la PCR »
Sensibilité	82,2%	50,0 %

Le test sérologique rapide a détecté la moitié des résultats positifs détectée par RT-PCR et il a présenté une faible sensibilité (50%) par rapport à la PCR avec une sensibilité de 82.2% et une spécificité de 100%.

La RT-PCR, a été plus efficace que la sérologie peut-être à cause des charges virales faibles, il est recommandé de l'utiliser avec des prélèvements des patients dans les quelques jours suivant l'apparition des symptômes (80).

2. Apport des techniques moléculaires dans le diagnostic des infections bactériennes

2.1. Etude 1. Molecular Diagnosis of Bacterial Definite Infective Endocarditis by Real-Time Polymerase Chain Reaction (84)

L'endocardite infectieuse (EI) est définie comme étant une infection ulcéro-végétante, souvent bactérienne, elle cible l'endocarde valvulaire (en cas de greffe) ou les prothèses intracardiaques (Figure 13).

C'est une pathologie rare avec un taux assez élevé de mortalité. Même avec le mérite du progrès scientifique et la prise en charge clinique des patients, les endocardites regroupent deux catégories de microorganismes, ceux qui ont une hémoculture positive, d'autres qui ne sont pas détectés par le test d'hémoculture (dans ce cas, le diagnostic clinique devra recourir à d'autres méthodes comme la sérologie ou la biologie moléculaire) (tableau 18).

L'EI se développe chez les personnes âgées de 60 ans et plus, les immunodéprimés ou ceux sous un immunosuppresseur dû à une greffe en particulier celle du cœur, les diabétiques et les toxicomanes (86).

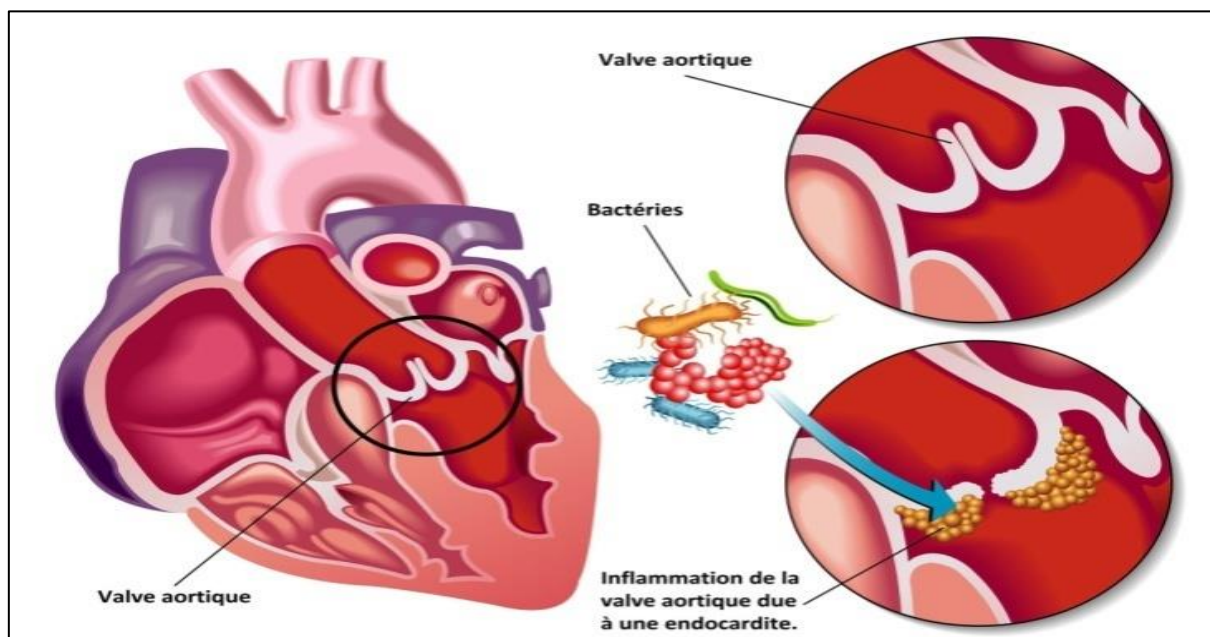


Figure 13. Localisation de l'infection par une endocardite au niveau du cœur (85)

Lors d'une suspicion d'une EI, plusieurs outils sont appliqués dans la détection de l'agent causal.

Tout d'abord une hémoculture est effectuée par trois prises sanguines du patient pendant la journée (24 h) avec une incubation de 3 à 4 semaines (dans le cas d'une hémoculture automatisée, le temps est réduit à une semaine), elle détecte généralement tous les microorganismes responsables de l'infection (surtout dans le cas d'un non-traitement antibiotique précoce).

Il existe des cas où les résultats de l'hémoculture sont négatifs, cela pourrait être expliqué de plusieurs façons :

- un traitement précoce du patient par antibiothérapie avant le prélèvement sanguin ;
- l'infection présente chez le patient n'est pas une endocardite ;
- présence de microorganismes non cultivables sur les milieux standards (87).

Pour remédier au dernier cas, d'autres méthodes sont utilisées. Les tests sérologiques et moléculaires sont considérés comme des alternatives lors d'une hémoculture négative, elles

permettent l'identification de plusieurs pathogènes surtout les bactéries comme les streptocoques (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus gallolyticus*...) et les staphylocoques (*Staphylococcus aureus*...) (figure 14).

Le diagnostic des endocardites par les techniques de biologie moléculaire se base essentiellement sur la réaction de PCR depuis un échantillon sanguin ou tissulaire (tissu cardiaque). La PCR en temps réel est la principale technique d'amplification utilisée.

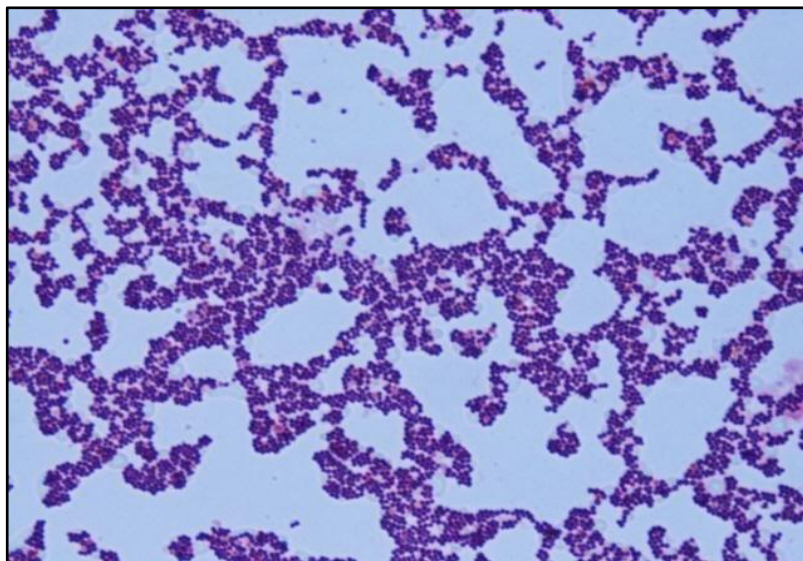


Figure 14. Observation microscopique de *Staphylococcus aureus* (1000X) (88)

Dans le cas des endocardites infectieuses, l'agent causal est mis en évidence par l'amplification de l'ADN ribosomal. Chez les bactéries, les gènes codant pour les ARN 5S, 23S et 16S sont considérées comme des séquences cibles, car elles possèdent des régions conservées propres à chaque espèce. Après amplification, les amplicons sont comparés aux séquences enregistrées dans les banques de données (Gen-Bank) (89).

L'étude que nous avons traitée a été réalisée sur 20 échantillons de sang total de patients atteints d'endocardite définitive selon les critères de DUKE. D'abord trois séries d'hémocultures ont été effectuées sur les 20 échantillons, puis une PCR en temps réel a été appliquée en utilisant des amorces complémentaires aux gènes de bactéries connues comme responsables d'endocardites infectieuses bactériennes (annexe 7) (annexe 8).

Tableau 18. Microorganismes responsables d'endocardite infectieuse (90)

Résultat hémoculture	Espèces	Exemples	Fréquences	
Hémoculture positive	Stréptocoque D	- <i>S.gallolyticus</i> - <i>S.infantarius</i>	25%	
	Streptocoques oraux	- <i>S.mitis</i> - <i>S.sanguis</i>	17%	
	Streptocoques pyogènes	- <i>S.agalactiae</i> (B) - <i>S.pyogenes</i> (A)	6%	
	Staphylocoques	- <i>S.aureus</i> -SNC (staphylocoques à coagulase négative)	78% 22%	
	Entérocoques	- <i>E.faecalis</i> - <i>E.durans</i>	8%	
	Autres micro-organismes	- <i>Enterobacter aerogenes</i> - <i>Klebsiella oxytoca</i> - <i>Legionella spp.</i>	5%	
	Hémoculture négative	Germes à culture difficile	-HACEK	3%
			- <i>Bartonella spp.</i>	3%
			- <i>Abiotrophia spp.</i> - <i>Granulicatella spp.</i>	1 à 2%
			- <i>Brucella spp.</i>	1 à 3%
- <i>Coxiella brunetii</i>			3 à 5%	
- <i>Tropheryma whipplei</i> - <i>Legionella pneumophila</i> - <i>Chlamydia spp</i> - <i>Mycoplasma spp</i>			Cas rare	

Résultats de l'étude

Les résultats des hémocultures ont donné un cas positif sur 19, identifié comme *Streptococcus viridans*.

Après une amplification des échantillons par PCR en temps réel, une courbe a été tracée mettant en évidence 13 échantillons positifs et 7 négatifs (figure 15) (tableau 19).

Dans cette étude, la PCR en temps réel a montré une grande sensibilité et spécificité (65% et 100% respectivement) par rapport à l'hémoculture (5% et 100%) concernant la sensibilité. En plus, d'autres études ont démontré que les bactéries à Gram positif sont les agents majoritairement responsables d'endocardites infectieuses, ils sont identifiés grâce à des échantillons de tissus des valves du cœur ou comme cette étude du sang total en utilisant la PCR en temps réel, ce qui a procuré une efficacité de détection dans une courte durée par rapport à la méthode de culture conventionnelle (84).

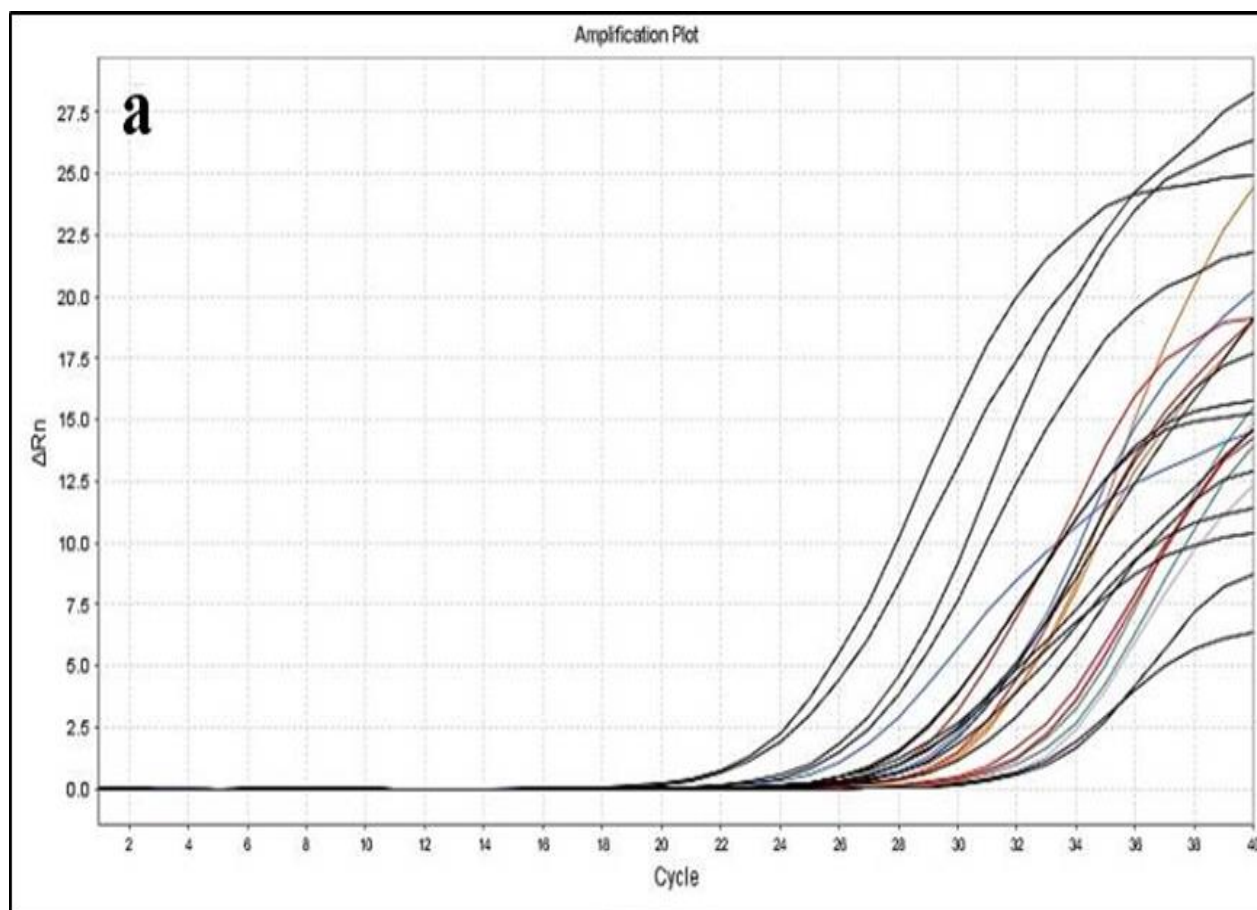


Figure 15. Courbes d'amplification de 13 échantillons de sang total positifs (84)

Tableau 19. Résultats de la PCR en temps réel et de l'hémoculture chez 20 patients atteints d'endocardite infectieuse définie (84)

N° patient	Antécédent d'antibiothérapie	Hémoculture	PCR en temps réel
1	OUI	Négatif	Négatif
2	OUI	Négatif	<i>E. faecalis</i>
3	OUI	Négatif	<i>S. aureus</i>
4	OUI	Négatif	Négatif
5	OUI	Négatif	<i>E. faecalis</i>
6	OUI	Négatif	Négatif
7	OUI	<i>Streptocoques viridans</i>	<i>S. sanguines</i>
8	OUI	Négatif	<i>E. faecalis</i>
9	OUI	Négatif	Négatif
10	OUI	Négatif	<i>S. gallolyticus</i>
11	OUI	Négatif	Négatif
12	OUI	Négatif	<i>S. mutans</i>
13	OUI	Négatif	<i>E. faecalis</i>
14	OUI	Négatif	<i>E. faecalis</i>
15	OUI	Négatif	<i>E. faecalis</i>
16	OUI	Négatif	Négatif
17	OUI	Négatif	<i>S. gallolyticus</i>
18	OUI	Négatif	<i>S. salivarius</i>
19	OUI	Négatif	Négatif
20	OUI	Négatif	<i>E. faecalis</i>

2.2. Etude 2: Diagnostic efficacy of a real time-PCR assay for *Chlamydia trachomatis* infection in infertile women in north India (91)

Chlamydia trachomatis (CT) est une bactérie intracellulaire obligatoire et la cause des infections bactériennes sexuellement transmissibles les plus fréquentes dans le monde, ciblant les cellules épithéliales pavimenteuses de l'endocol et du tractus génital supérieur chez les

femmes, ainsi que la conjonctive, l'urètre et le rectum chez les hommes et les femmes (Figure 16).

CT a un cycle infectieux de deux formes de développement (biphasique) ; un corps élémentaire (CE) qui est métaboliquement inactif, il s'adsorbe à la cellule hôte puis il pénètre dans une vacuole où il se transforme en corps réticulé (CR) actif métaboliquement qui utilisera ensuite la machinerie de l'hôte pour se répliquer et former un nouveau CE, qui pourra alors infecter plus de cellules (Figure 17).

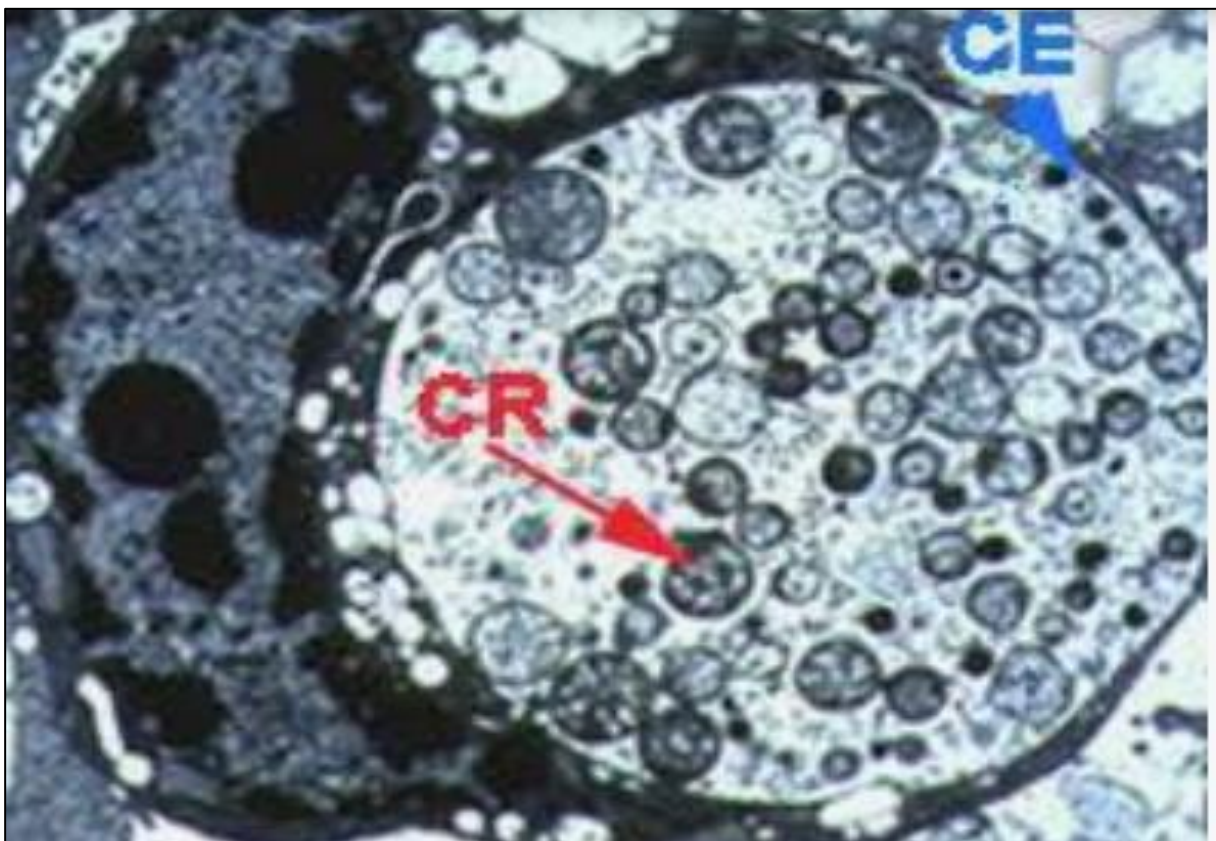


Figure 16. Observation microscopique de *Chlamydia trachomatis* (92)

Chlamydia trachomatis a plusieurs sérovars se manifestant de la manière suivante.

- A, B et C, responsables du trachome ;
- D et K, responsables d'infections oculaires, génitales et pulmonaires, à transmission sexuelle et périnatale ;
- L1, L2, L3, responsables de la lymphogranulomatose vénérienne (LGV), à transmission sexuelle .

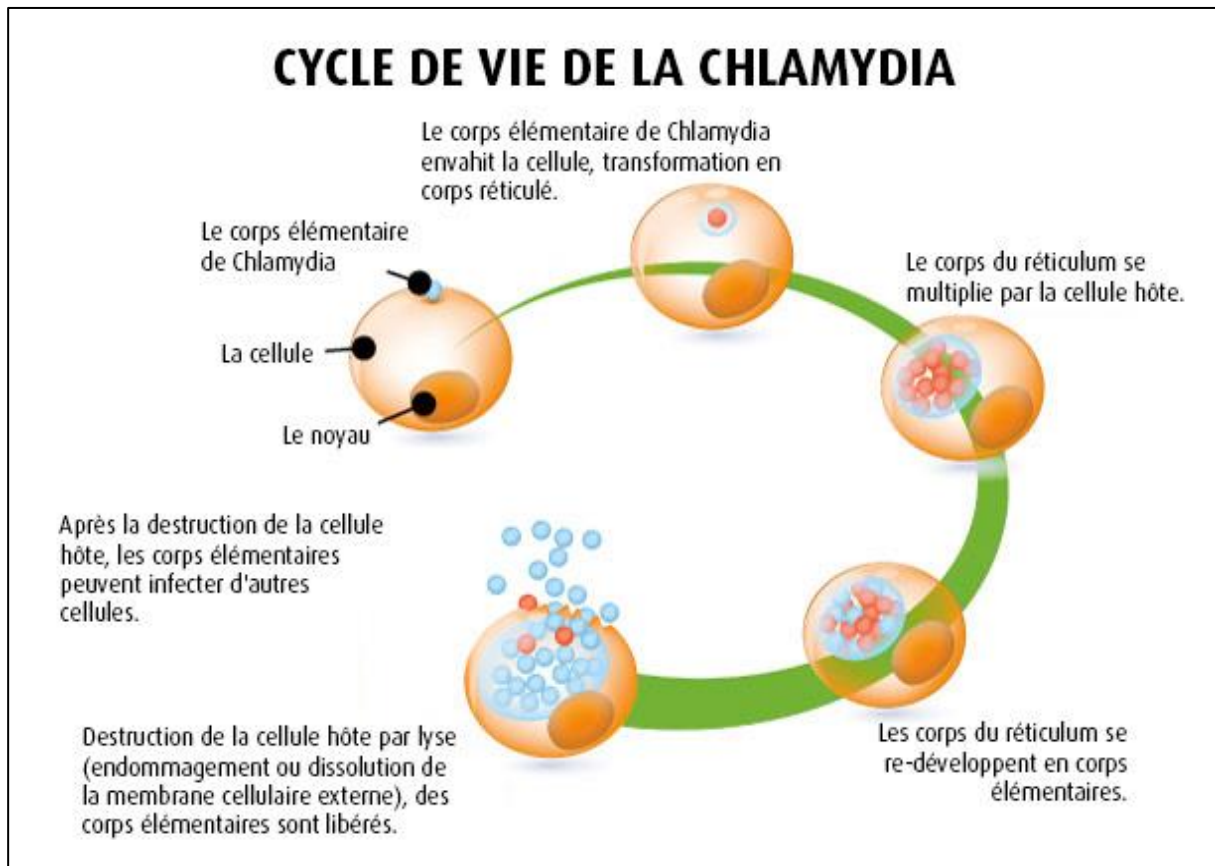


Figure 17. Cycle de vie de *Chlamydia trachomatis* (93)

Son diagnostic de référence est la culture cellulaire en utilisant un prélèvement effectué au niveau de l'endocol et de l'urètre. La durée de résultats varie entre 48 et 72 heures avec une spécificité de 100% mais elle présente une faible sensibilité : de 35% à 85% selon l'étude. Cependant il s'agit d'une technique lourde réservée aux laboratoires spécialisés.

D'autres techniques peuvent être réalisées avec le même prélèvement comme l'immunofluorescence directe sur lame (spécificité : 85 à 98%, sensibilité : 40% à 95%) et l'immuno-enzymologie (spécificité : 85 à 100%, sensibilité : 22 à 89%).

La biologie moléculaire est le test de choix pour le diagnostic de la maladie. Elle existe généralement en une recherche qualitative seulement car la quantification ne présente aucun intérêt clinique. Les techniques d'amplification utilisées sont divisées en 3 groupes selon la cible amplifiée (Tableau 20).

Mais il existe quelques problèmes rencontrés lors de la recherche de CT par biologie

moléculaire et qui peuvent fausser les résultats.

Parmi les faux négatifs, les inhibiteurs d'amplification, lors de l'analyse des urines, 5 à 20% des prélèvements contiennent des inhibiteurs de l'amplification, souvent de nature non déterminée et l'existence de variantes génétiques de CT : un nouveau variant de CT ; portant une délétion de 377 pb dans le plasmide cryptique, a amené à des résultats faussement négatifs. Les faux positifs généralement trouvés lors du traitement aux antibiotiques, où le corps bactérien de CT est éliminé, mais pas l'acide nucléique. Cela aboutit à des résultats faussement positifs en utilisant les techniques d'amplification car elles ne différencient pas entre un ADN issus de bactéries vivantes des bactéries mortes (94).

Tableau 20. Techniques d'amplification pour la détection de *chlamydia sp.* et leurs cibles (94)

Type d'amplification	Techniques moléculaires	Cible d'amplification
Techniques d'amplification de la cible	- PCR classique	°ADN plasmidique (plasmide cryptique)
	- PCR en temps réel	°Soit ADN plasmidique °ADN plasmidique et le gène <i>OmpA</i> ° <i>OmcB</i>
	- TMA	°ARN ribosomal 16S
	- SDA	°ARN plasmidique
Techniques d'amplification du signal	- Hybridation direct	° Gène <i>OmpA</i>

Résultats de l'étude

Cette étude a été réalisée pour évaluer l'efficacité du diagnostic par PCR en temps réel « maison » dans la détection de l'infection à CT chez les femmes infertiles, où elle est comparée à un kit commercial.

Des écouvillonnages vaginaux (endocervicaux) chez 200 femmes infertiles ont été testés par trois types de tests : un test de fluorescence directe (DFA), un dosage immuno-enzymatique (EIA) et trois réactions de PCR sachant que la première est une PCR en temps réel ciblant le

plasmide cryptique et les deux autres sont des réactions de PCR conventionnelles basées sur le gène *omp1* et le plasmide cryptique.

Les TAAN sont ensuite comparés à un kit commercial (PCR en temps réel test COBAS Taqman *C. trachomatis*, version 2.0).

Les résultats des 4 tests sont bien éclaircis après comparaison avec les résultats du kit commerciale dans le tableau 21.

En considérant le test par le kit commercial comme référence, la PCR en temps réel « maison » a montré une excellente spécificité et sensibilité de 100 % dans la détection de CT chez les femmes infertiles (a même pu détecter 10 copies d'ADN de CT par réaction) (91).

Tableau 21. Comparaison de la PCR en temps réel, de la PCR classique du plasmide cryptique et du gène *omp1*, du test de fluorescence directe (DFA) et du test immunoenzymatique (EIA) pour *C. trachomatis* avec le test COBAS Taqman CT, v 2.0 (91)

Table I. Comparison of real time-PCR, conventional cryptic plasmid and <i>omp1</i> gene PCR, direct fluorescence assay (DFA) and enzyme immunoassay (EIA) assays for <i>C. trachomatis</i> with COBAS Taqman CT Test, v 2.0 (n=57)								
Assay	Result	Cobas Taqman CT Test, v2.0 Results		Sensitivity % (95% CI)	Specificity % (95% CI)	Positive predictive value % (95% CI)	Negative predictive value % (95% CI)	Diagnostic accuracy % (95% CI)
		Positive	Negative					
Real time-PCR	Positive	27	0	100 (87.5-100)	100 (88.7-100)	100 (87.5-88.6)	100 (88.7-100)	100 (93.6-100)
	Negative	0	30					
Conventional Cryptic plasmid and/ or <i>omp1</i> gene PCR	Positive	23	0	85.2 (67.5-94.1)	100 (88.6-100)	100 (85.7-100)	88.2 (73.4-95.3)	93 (88.3-97.2)
	Negative	4	30					
DFA	Positive	18	0	66.7 (47.8-87.3)	100 (88.6-100)	100 (82.4-100)	76.9 (61.7-87.4)	84.2 (72.6-91.5)
	Negative	9	30					
EIA	Positive	13	0	48.1 (30.7-66)	100 (88.7-100)	100 (77.2-100)	68.2 (53.4-80)	75.4 (62.9-84.8)
	Negative	14	30					

3. Apport de la biologie moléculaire dans le diagnostic des infections fongiques

3.1. Etude 1. Application de la PCR en temps réel au diagnostic des candidémies (95)

Les *Candida* sont des champignons microscopiques de forme levurienne, responsables des mycoses les plus fréquentes dans le monde. Certaines espèces vivent dans le corps humain en endosymbiose. Toutefois elles peuvent envahir et provoquer des infections nocives, surtout chez les immunodéprimés où elles causent des candidoses profondes ou candidémies (Figure 18).



Figure 18. Illustration en 3D du genre *Candida sp.*(96)

En clinique, le diagnostic des candidoses invasives est souvent difficile. Qu'il soit par culture de prélèvement non sanguin car la distinction entre l'agent pathogène et la contamination est presque impossible, ou bien par hémoculture qui présente une faible sensibilité de 50% malgré sa spécificité élevée.

Il est possible aussi d'utiliser la sérologie dans la détection de *Candida sp.*, mais elle dépend de la durée d'existence des antigènes sériques et de la cinétique des anticorps.

A l'heure actuelle, l'apport de la biologie moléculaire dans la détection de *Candida sp.*

est devenu plus important. Généralement les TAAN sont les techniques les plus utilisées en particulier la PCR *Candida*. La performance de cette dernière est influencée par quelques facteurs comme la nature du prélèvement, la séquence à amplifier et la technique de PCR à appliquer.

Résultats de l'étude

Les résultats exposés dans ce travail sont encourageants. Les techniques de PCR en temps réel sur automate Light Cycler™ qui amplifie la région d'ADNr 5,8 S du genre *Candida sp* sont très efficaces et posent uniquement des problèmes de mise au point. Elles ont montré en pratique leur intérêt car elles sont rapides et facilement réalisables pour des grandes séries du fait de leur automatisation.

Elles proposent également la possibilité de donner des résultats en quantification avec la technique employée qu'est le SYBR Green™ mais également avec des sondes Taqman ou FRET, technologies encore plus spécifiques.

Cependant des travaux devront être effectués pour standardiser le choix du prélèvement à analyser (sérum, plasma, sang total, urines, LCR ...) et leur traitement avant extraction. En effet, les techniques classiques utilisées pour les bactéries ou les cellules eucaryotes sont peu ou non efficaces à cause de la localisation intracellulaire possible du champignon et surtout en raison de la structure et la composition des parois fongiques (95).

3.2. Etude 2. *Aspergillus* PCR-Based Investigation of Fresh Tissue and Effusion Samples in Patients with Suspected Invasive Aspergillosis Enhances Diagnostic Capabilities (97)

L'espèce *Aspergillus sp.* représente un champignon filamenteux qui est retrouvé dans notre environnement. Bien qu'il soit considéré comme inoffensif, il peut causer des pathologies chez les patients immunodéprimés comme la maladie de l'aspergillose qui possède trois formes d'infection (les formes chroniques, les formes invasives et les formes allergiques) (figure 19).

En clinique, peu d'outils permettent le diagnostic de l'*Aspergillus sp* par manque de spécificité et de sensibilité des techniques classiquement utilisées ce qui amène à recourir à d'autres méthodes ; la biologie moléculaire précisément (98).

Résultats de l'étude

Cette investigation a pour but l'amélioration de la capacité du diagnostic de l'*Aspergillus* par la technique de la PCR.

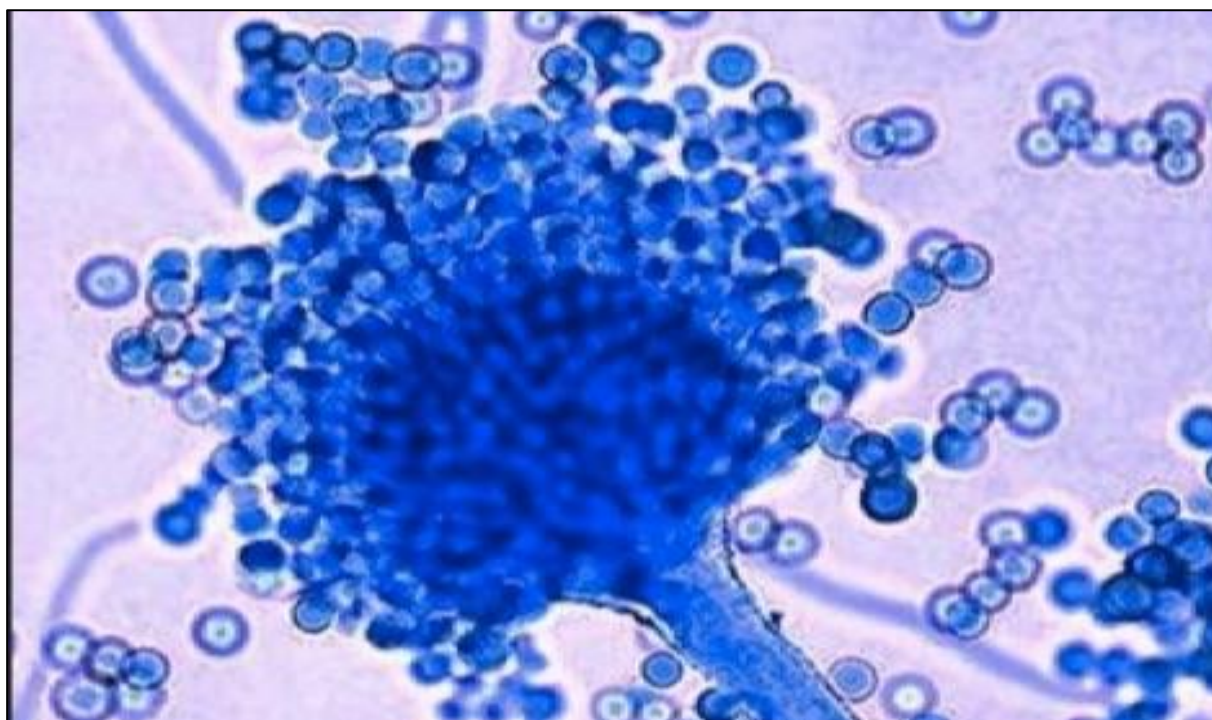


Figure 19. Observation microscopique du genre *Aspergillus* (400X) (99)

Selon des échantillons de tissu frais (59 prélèvements) et d'épanchement pleural (47 prélèvements) de patients immunodéprimés, une PCR nichée spécifique a été réalisée dans la détection de l'*Aspergillus sp.*

Les résultats obtenus ont démontré la performance de la PCR dans le diagnostic de l'*Aspergillus* par une excellente sensibilité de 86% accompagnée d'une spécificité de 100% surtout dans les échantillons de tissus (sensibilité plus faible dans les échantillons d'épanchement pleural).

L'efficacité de la PCR comme outil de renforcement de la probabilité d'une infection a *Aspergillus* a été prouvée du fait qu'il améliore la capacité du diagnostic (97).

4. Apport des techniques moléculaires dans le diagnostic des infections parasitaires

4.1. Etude 1. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with polymerase-Chain-reaction test on Amniotic Fluid (100)

Toxoplasma gondii est un parasite uni-intracellulaire obligatoire. Son installation peut durer toute une vie lorsqu'il infecte le corps humain de façon asymptomatique chez les immunocompétents car le système immunitaire empêche son envahissement (101) (Figure 20).

La détection est réalisée par sérologie et confirmée par incubation chez la souris. Mais la PCR peut être utilisée en étudiant le liquide amniotique ou le sang total au lieu de la technologie d'incubation de souris pour un diagnostic rapide (44).

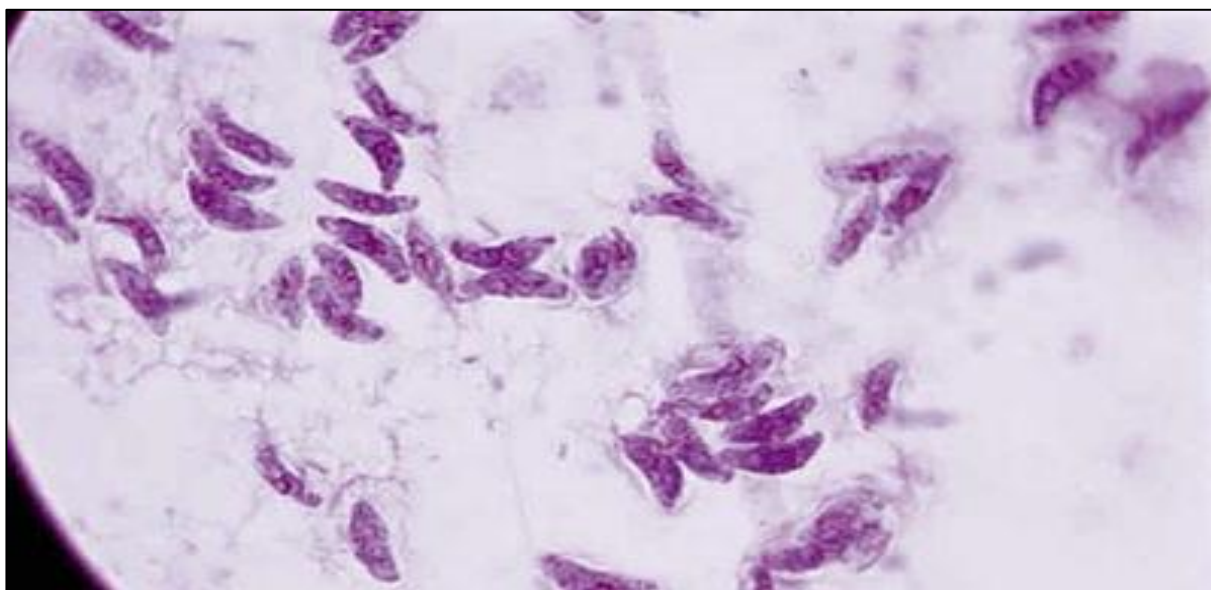


Figure 20. Observation microscopique de *Toxoplasma gondii* (400X) (102)

Résultats de l'étude

Ce travail a été réalisé dans le but de développer une nouvelle approche pour le dépistage de l'infection congénitale à *Toxoplasma gondii* pendant la grossesse.

Parmi 2632 femmes atteintes d'une infection parasitaire et ayant subi une échographie et une amniocentèse, seules 339 ont passé un test de PCR compétitive à partir du liquide amniotique. Le TAAN a ciblé le gène B1 de *T.gondii* tout en assurant la qualité de l'analyse par un contrôle interne (tableau 22).

Le taux de positivité a été faible pour les deux techniques, mais, la PCR a donné de meilleurs résultats comparés aux tests conventionnels grâce à sa rapidité, sa précision et sa sûreté. Ce qui prouve son efficacité dans le dépistage de ce genre d'infection par ce parasite (100).

Tableau 22. Résultats obtenus par les deux tests (100)

	Résultats positifs	Faux positifs	Faux négatifs	Sensibilité
Tests conventionnels	10,0% (34/339)	-	-	89,5%
Test moléculaire (PCR)	10,9%(37/339)	-	1	97,4%

4.2. Etude 2. Real-time PCR for diagnosis of imported Schistosomiasis (103)

La schistosomiase est une maladie aigue ou chronique provoquée par un parasite du genre *Schistosoma* qui est un ver microscopique généralement retrouvé dans les eaux douces. L'infection par ce trématode est établie par sa pénétration dans la peau des hôtes (Figure 21).

Le diagnostic actuel est basé sur la détection des œufs du parasite dans les sels et les urines en phase d'état. Cependant, en phase d'invasion, le dépistage favorise les tests sérologiques comme l'ELISA et la biologie moléculaire surtout la techniques de la PCR en utilisant des échantillons sanguins, urinaire ou vaginaux (104).



Figure 21. Illustration en 3D du genre *Schistosoma* (105)

Résultats de l'étude

L'étude avait comme objectifs la détermination de l'efficacité de deux PCR en temps réel « maison » dans la détection de deux espèces de *Schistosoma* (*S.mansoni* « Sm » et *S. haematobium* « Sh »).

A partir de 412 échantillons (194 sérums, 124 urines, 86 selles et 8 biopsies) deux réactions d'amplifications par PCR ont été pratiquées avant et après un traitement antiparasitaire, puis une comparaison des résultats a été effectuée avec ceux obtenus par les tests microscopiques et sérologiques (ELISA, hémagglutination indirecte « HA » et test Western Blot « WB »).

La PCR a augmenté la sensibilité du dépistage comparée à la microscopie comme c'est mentionné dans le tableau 23.

Tableau 23. Sensibilité des tests selon l'échantillon analysé (103)

	Urines (Sh)	Selles (Sm)	Sérum
Etude microscopique	4%	33,7%	72,7%
PCR	10,5%	48,8%	94,1%

La spécificité de la PCR a été estimée à 98.9%. Après traitement, le taux de résultats positifs a diminué différemment d'une technique à une autre mais la PCR est considérée comme la technique la plus rapide (Figure 22).

L'utilisation de la PCR combinée au test Western Blot, qui est considéré comme la méthode de référence pour la détection de genre *Schistosoma sp*, serait plus efficace (103).

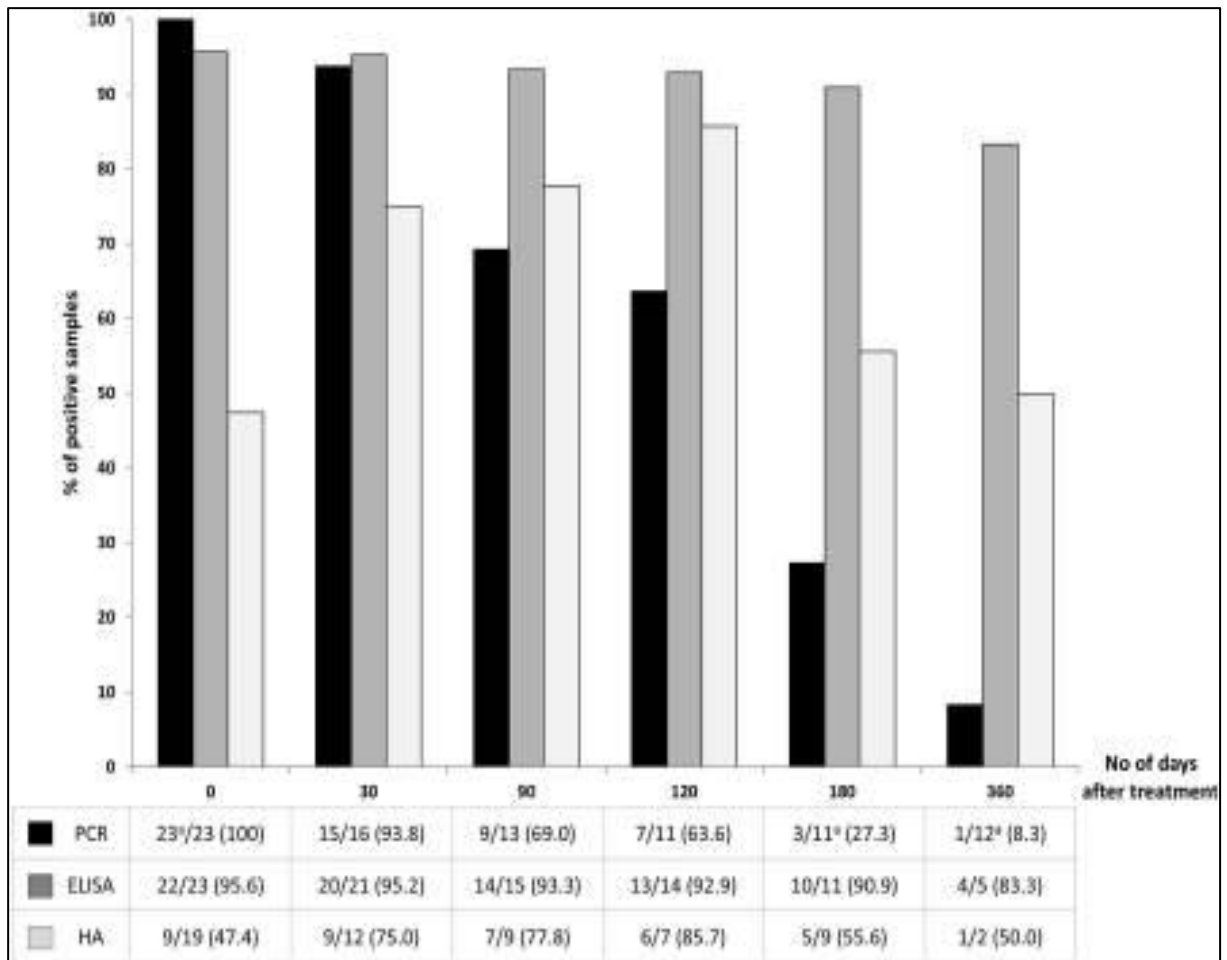


Figure 22. Cinétique des taux de positivité (PCR, ELISA et HA après traitement) (103)

CONCLUSION

La biologie moléculaire est devenue un élément incontournable dans la microbiologie clinique. Son application possède une ampleur dans le domaine du diagnostic médical.

Actuellement la biologie moléculaire s'intègre de plus en plus rapidement dans la microbiologie pratique présentant des indications plus en moins spécifique à chaque microorganisme, en particulier dans le domaine de virologie.

La biologie moléculaire possède l'habileté d'améliorer le diagnostic microbiologique en diminuant les limites des techniques et présentant des résultats plus précis.

Dans le cas des pays en voie de développement, la biologie moléculaire est limitée aux laboratoires spécialisés tandis que les laboratoires de routine se résument aux techniques traditionnelles (culture et sérologie), par manque de moyens ou de personnel qualifié.

Ce travail nous a permis d'exposer les particularités, les atouts, les limites, et les applications des différentes techniques de biologie moléculaire dans le domaine de la microbiologie concernant les différents microorganismes pathogènes qu'ils soient fréquents (hépatites C et B, *Chlamydia trachomatis*) ou plus rares.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Morange M. Histoire de la biologie moléculaire. Paris. La Découverte. **2003**. 378p.
2. Morange M. Séminaire de philosophie et mathématiques. Naissance de la biologie moléculaire. **1993** ; école normale supérieure ; p.1-9.
3. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, et *al.* Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Sciences*. **1985**; 230 (4732): 1350-4.
4. Lamoril J, Bogard M, Ameziane N, Deybach JC, Bouizegarène P. Biologie moléculaire et microbiologie clinique en 2007: Généralités-Partie 1. Immuno-analyse & Biologie Spécialisée. **2007** ; 22(1) : 5-18.
5. Tellaa R. Apport de la biologie moléculaire dans le diagnostic des infections fongiques invasives. Thèse de doctorat, Université Mohammed v, Rabat, Maroc ; **2013**. 2 p
6. Ameziane N, Bogard M, amoril J. Principes de biologie moléculaire en biologie clinique. Paris : Edition Dragos Bobu ; **2006**. 724p.
7. Auréa W. (**2016**). La technique PCR [en ligne]. (page consultée le 1/6/2021). https://wiki.aurea.eu/index.php/La_technique_PCR
8. Uhel F, Zafrani L. Nouvelles techniques de biologie moléculaire. *Med Intensive Réa*. **2019** ; 28(6) :464-72.
9. Futura sciences. RT-PCR [en ligne]. (page consultée le 2/6/ 2021). <https://www.futura-sciences.com/sante/definitions/medecine-rt-pcr-13491/>
10. Green MR, Sambrook J. Nested Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harb Protoc*. **2019**.
11. Goode T, ZheHo W, O'Connor T, Busteed S, Douglas SD, Shanahan F, et *al.* Nested RT-PCR: Sensitivity Controls are Essential to Determine the Biological Significance of Detected mRNA. *Springer Link*. **2002**. 193:65-79.
12. Green MR, Sambrook J. Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harb Protoc*. **2019**.
13. Mounayar AL, Chaussade H, Bouvet D, Robert S, Goudeau A, Marchand-Adam S. La

- PCR multiplex : un outil diagnostique d'infections respiratoires basses chez l'adulte. EM-Consulte. **2014**.
14. Sue MJ, Yeap SK, Omar AR, Tan SW. Application of PCR-ELISA in Molecular Diagnosis. *BioMed Research International*. **2014**; 1-6.
 15. Zentilin L, Giacca M. Competitive PCR for precise nucleic acid quantification. *Nat Protoc*. **2007**; 2(9): 2092-104.
 16. Lindsay D. (1999). Competitive PCR Guide [en ligne]. Takara (page consultée le 3/6/2021). <https://www.gene-quantification.de/competitive-pcr-takara.pdf>
 17. Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical Microbiology and Infection*. **2004**; 10(3):190-212.
 18. Kuypers J, Jerome KR. Applications of Digital PCR for Clinical Microbiology. *J Clin Microbiol*. **2017**; 55(6):1621-8.
 19. Thermo Fisher. Real-Time vs. Digital PCR vs. Traditional PCR [en ligne] (page consultée le 7/6/2021). <https://www.thermofisher.com/dz/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/real-time-vs-digital-vs-traditional-pcr.html>.
 20. Vassias I. TMA (transcription mediated amplification). EMC- Biologie Médicale. **2007**.
 21. Vassias I. Amplification par déplacement de brin (SDA). EMC-Biologie Médicale. **2007**.
 22. Manna R. Towards development of an integrated system for diagnosis of infectious diseases of the blood. Mémoire de Master: Indian Institute of Technology Bombay, India; **2019**.
 23. Johne R, Müller H, Rector A, van Ranst M, Stevens H. Rolling-circle amplification of viral DNA genomes using phi29 polymerase. *Trends Microbiol*. **2009**; 17(5):205-11.
 24. Mothershed EA, Whitney AM. Nucleic acid-based methods for the detection of bacterial pathogens: Present and future considerations for the clinical laboratory. *Clinica Chimica Acta*. **2006**; 363(1-2): 206-20.

25. Nilsson M, Dahl F, Larsson C, Gullberg M, Stenberg J. Analyzing genes using closing and replicating circles. *Trends Biotechnol.* **2006**; 24(2):83-8.
26. Bhatt R, Scott B, Whitney S, Bryan RN, Cloney L, Lebedev A. Detection of Nucleic Acids by Cycling Probe Technology on Magnetic Particles: High Sensitivity and Ease of Separation. *Nucleosides and Nucleotides.* **1999**; 18(6-7):1297-9.
27. Vassias I. ADN branché ou bDNA. EMC-Biologie Médicale. **2012**
28. Peyton CL, Schiffman M, Lörincz AT, Hunt WC, Mielzynska I, Bratti C, et al. Comparison of PCR- and Hybrid Capture-Based Human Papillomavirus Detection Systems Using Multiple Cervical Specimen Collection Strategies. *J Clin Microbiol.* **1998**; 36(11) : 3248-54.
30. Kaplan J, Delpech M. *Biologie Moléculaire et Médecine.* 3^{ème} éd. Paris : Flammarion SA ; **2007**.
31. Glaser P. Les puces à ADN vont-elles révolutionner l'identification des bactéries ?. *Med Sci.* **2005**; 21(5):539-44.
32. Kovacevic N. *Magnetic Beads Based Nucleic Acid Purification for Molecular Biology Applications.* Springer Nature Experiments. **2016**: 53-67.
33. Haukanes BI, Kvam C. Application of Magnetic Beads in Bioassays. *Bio/Technology.* **1993**; 11(1): 60-3.
34. Lamoril J, Ameziane N, Deybach JC, Bouizegarène P, Bogard M. Les techniques de séquençage de l'ADN : une révolution en marche. Première partie. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée.* **2008** ; 23 (5) : 260-79.
35. Diène SM. Génomique et métagénomique bactériennes: applications cliniques et importance médicale. *Rev Med Suisse.* **2014** ; 10: 2155-61
36. Boffa MC. Hybridation in situ. *La Revue de Médecine Interne.* **1996** ; 17(6) : 505-7.
37. Filion G. (2008). Détection rapide de spores de Bacillus par hybridation in situ en fluorescence. université Laval Québec. [en ligne]. (page consultée le 4/6/2021). <https://corpus.ulaval.ca/jspui/handle/20.500.11794/20077>

38. Duyckaerts C, Fouret P, Hauw JJ.(**2003**). Anatomie pathologique. Médecine Sorbonne université. [en ligne]. (page consultée le 7/6/2021).
<http://www.chups.jussieu.fr/polys/anapath/Cours/POLY.Chp.3.10&IMG52.html>
39. Maréchal V. LiPA : Line Probe Assay ou hybridation inverse. EMC - Biologie Médicale. **2006** ; 1 :1-2.
40. Nelson NC. Rapid Detection of Genetic Mutations Using the Chemiluminescent Hybridization Protection Assay (HPA): Overview and Comparison with Other Methods. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. **1998** ; 35(5) : 369-414.
41. Menet MC. Principes de la spectrométrie de masse. *Revue Francophone des Laboratoires*. **2011** ; 437: 41-53.
42. Stéphanie S. Microbiologie clinique et spectrométrie de masse. Thèse de Doctorat Université René Descartes, Paris, France ; **2013**. 4, 5,10p.
43. Assi Kacou H. Evaluation du contrôle de qualité des analyses biomédicales dans les laboratoires privés et publics d'Abidjan. Thèse de Doctorat, Université de Cocody, Abidjan, Cote d'Ivoire. **1999**; 147p.
44. Lamoril J, Bogard M, Ameziane N, Deybach JC, Bouizegarène P. Biologie moléculaire et microbiologie clinique en 2007. Partie 2. Immuno-Analyse & Biologie Spécialisée. **2007** ; 22(2) :73-94.
45. Spmareul (**2016**). Hépatite C .biominis. [en ligne]. (page consultée le 27/6/ 2021).
https://www.eurofins-biominis.com/referentiel/liendoc/precis/HEPATITE_C.pdf
46. Zoulim F. Nouveaux tests virologiques et leurs applications dans la prise en charge de l'hépatite B chronique. *La Presse Médicale*. **2006** ; 35 (2) : 317-26.
47. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*. **2000**; 28(12):63.
48. Grosjean J, Pasquier C. *Bactériologie et Virologie Pratique*. Bruxelles : 2^{ème} édition de boeck ; **2011**. 290 p.
49. Organisation Mondiale de la Santé (**2019**). Des tests de diagnostic moléculaire de

- l'infection à VIH destinés à améliorer l'accès à la mesure de la charge virale et au diagnostic du VIH chez le nourrisson [en ligne]. (page consultée le 27/6/ 2021). <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331805>
50. Gibriel AA, Adel O. Advances in ligase chain reaction and ligation-based amplifications for genotyping assays: Detection and applications. *Mutat Res.* **2017**; 773: 66-90.
51. Organisation mondiale de la Santé (2020). Papillomavirus humain (PVH) et cancer du col de l'utérus [en ligne]. (page consultée le 9/7/ 2021). [https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-\(hpv\)-and-cervical-cancer](https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-(hpv)-and-cervical-cancer)
52. Dasinieres L (2020). Test HPV : c'est quoi, positif ou négatif, résultats, âge, prix... [en ligne]. (page consultée le 9/7/ 2021). <https://sante.journaldesfemmes.fr/fiches-anatomie-et-examens/2586190-test-hpv-definition-frottis-age-positif-negatif-laboratoire-prix-remboursement/>
53. Département Prévention Cancer et Environnement (2021). Infections à HPV [en ligne]. (page consultée le 12/6/2021). <https://www.cancer-environnement.fr/610-Infections-a-HPV.ce.aspx#Le%20test%20HPV>
54. Sanchez JD. (2018). Chlamydia [en ligne]. (page consultée le 15/6/2021). https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=14870:sti-chlamydia&Itemid=3670&lang=en
55. Sanchez JD. (2018). Gonorrhoea [en ligne]. (page consultée le 15/6/ 2021). https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=14872:sti-gonorrhoea&Itemid=3670&lang=en
56. Mohseni M, Sung S, Takov V. (2021) Chlamydia. Treasure Island (FL). [en ligne]. (page consultée le 15/6/2021). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537286/>
57. Ng LK, Martin IE. The laboratory diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae*. *Can J Infect Dis Med Microbiol.* **2005**; 16(1):15-25.
58. Mayo Clinic (2020). *Chlamydia trachomatis*: Symptoms and causes [en ligne]. (page consultée le 11/6/2021). <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/chlamydia/symptoms-causes/syc-20355349>

59. Mishori R, McClaskey EL, WinklerPrins V. *Chlamydia Trachomatis* Infections: Screening, Diagnosis, and Management. *AFP*. **2012**; 86(12):1127-32.
60. Centers for Disease Control and Prevention (**2017**). Caractéristiques - Gonorrhée - [en ligne].(page consultée le 13/6/2021). <https://www.cdc.gov/std/gonorrhea/lab/ngon.htm>
61. Johnson RE, Newhall WJ, Papp JR, Knapp JS, Black CM, Gift TL, et al. Screening tests to detect *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections. *MMWR Recomm Rep*. **2002**; 51(15):1-38.
62. Organisation mondiale de la Santé (**2020**). Tuberculose [en ligne]. (page consultée le 19 /6/2021). <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>
63. Thouraya C (**2019**). 557 cas de tuberculose recensés en 2018 à Tlemcen [en ligne]. (page consultée le 19/6/ 2021). <https://www.aps.dz/sante-science-technologie/87374-sante-557-cas-de-tuberculose-recenses-en-2018-a-tlemcen>
64. Fu LM, Fu-Liu CS. Is *Mycobacterium tuberculosis* a closer relative to Gram-positive or Gram-negative bacterial pathogens? *Tuberculosis*. **2002**; 82(2): 85-90.
65. Garcia-Hermoso D. Diagnostic microbiologique des mucormycoses. *Med Sci*. **2013**; 29:13-8.
66. Demidov VV. Rolling-circle amplification in DNA diagnostics: the power of simplicity. *Expert Rev Mol Diagn*. **2002**; 2(6):542-8.
67. Paugam A. Apports et limites de la biologie moléculaire en mycologie médicale. *Revue Française des Laboratoires*. **1999** ; (315) :39-42.
68. Pihet M, Marot A. Diagnostic biologique des candidoses. *Revue Francophone des Laboratoires*. **2013**. (450) :47-61.
69. Bertholom C. Le diagnostic des infections fongiques invasives .*EM-Consulte-mycologie médicale* .**2009** ; 20 (417) :18-19
70. Organisation mondiale de la santé (**2020**). Paludisme [en ligne]. (page consultée le 24 /6/2021). <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/malaria>

71. Bergeron E. (2012) Toxoplasmose : qu'est-ce que c'est ? [en ligne]. (page consultée le 25/6/2021).https://www.passeportsante.net/fr/Maux/Problemes/Fiche.aspx?doc=toxoplasmose_pm
72. Le bioterrorisme (2009). Eléments de réflexion au 26 septembre 2001 [en ligne]. (page consultée le 26/6/ 2021). <http://www.docteurinfo.com/1083-le-bioterrorisme-elements-de>
73. Pelletier N, La Scola B. Molecular and immunological detection of bacteria applied to bio-terrorism. *Med Mal Infect.* **2010**; 40(9): 506-16.
74. Caramelo C, Bartolomé J, Albalade M, de Sequera P, Navas S, Bermejillo T, et al. Undiagnosed hepatitis C virus infection in hemodialysis patients: value of HCV RNA and liver enzyme levels. *Kidney Int.* **1996** ; 50(6) :2027-31.
75. Institut Pasteur (2015). Hépatites virales [en ligne]. (page consultée le 1/7/ 2021). <https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/hepatites-virales>
76. Campus de microbiologie médicale (2021). Les virus des hépatites. [en ligne]. (page consultée le 1/7/ 2021). <http://www.microbes-edu.org/etudiant/hepatites.html#4>
77. Lab tests online (2009).Sérologie Hépatite C [en ligne]. (page consultée le 8/7/ 2021). <http://www.labtestsonline.fr/tests/HepatitisC.html>
78. Raza A, Zafeer M, Arshad B, Shakeel S. Mutational Analysis of Various Sub-Genomic Regions of HCV and Their Role in Interferon Therapy Response. *Int J Sci Emerging Tech.* **2012**; 4: 159-66.
79. Association Française de Formation Médicale Continue en Hépatogastro-Entérologie (2002) . Outils de la biologie moléculaire pour les hépatites C et D [en ligne] . (page consultée le 1/7/ 2021). <https://www.fmcgastro.org/postu-main/archives/postu-2002-nantes/outils-de-la-biologie-moleculaire-pour-les-hepatites-c-et-d/>
80. Lambert-Niclot S, Cuffel A, Le Pape S, Vauloup-Fellous C, Morand-Joubert L, Roque-Afonso A-M, et al. Evaluation of a Rapid Diagnostic Assay for Detection of SARS-CoV-2 Antigen in Nasopharyngeal Swabs. *J Clin Microbiol.* **2020**; 58(8): 977-20.
81. Safiabadi Tali SH, LeBlanc JJ, Sadiq Z, Oyewunmi OD, Camargo C, Nikpour B, et al. Tools and Techniques for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-

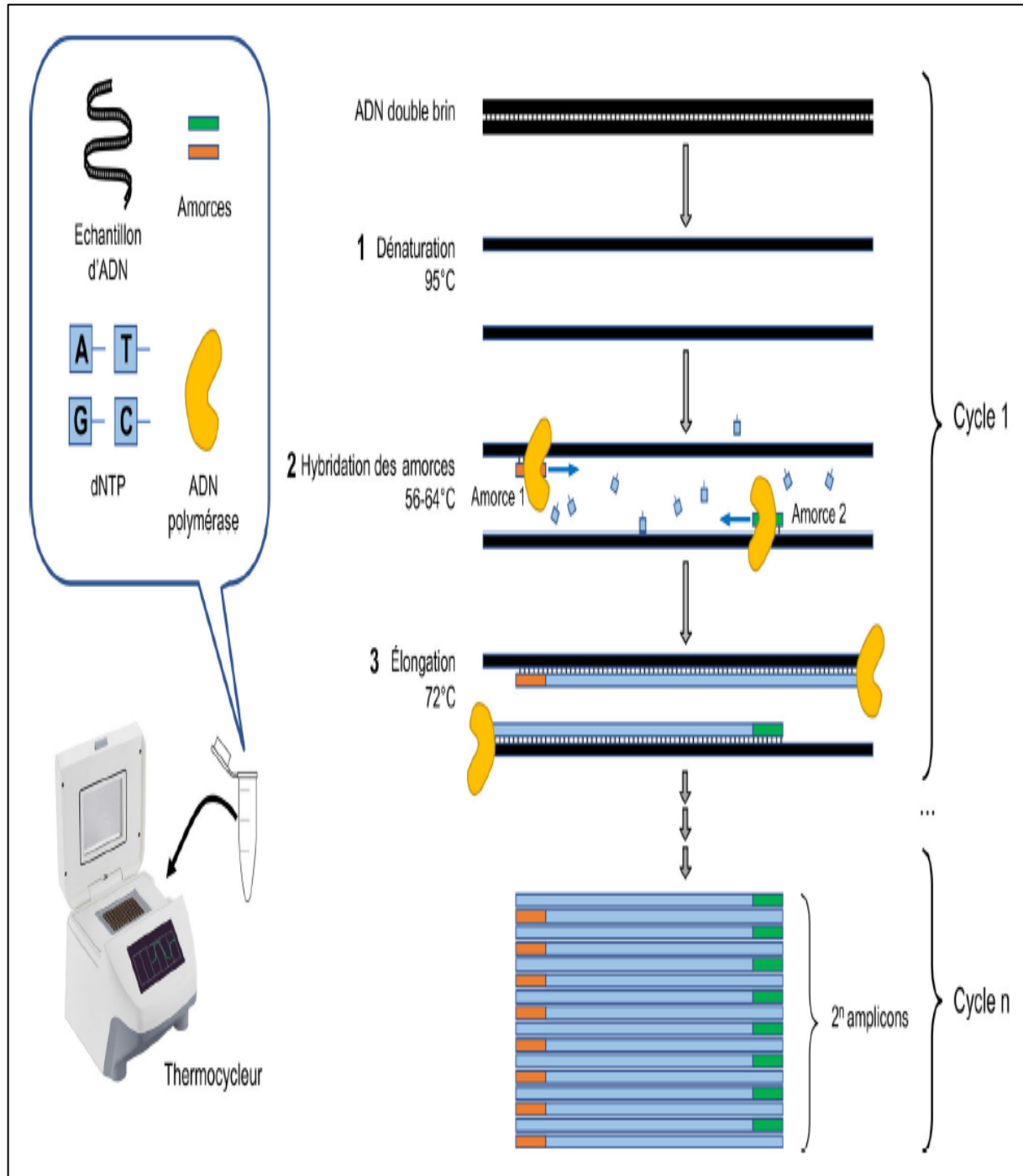
- CoV-2)/COVID-19 Detection. Clin Microbiol Rev. **2021** ; 34(3) : 228-20.
82. Institut Pasteur (2020). Les tests pour le diagnostic des infections par le SARS-CoV-2 [en ligne]. (page consultée le 8/7/ 2021).<https://www.pasteur.fr/fr/espace-presse/documents-presse/tests-diagnostic-infections-sars-cov-2>
83. Datta M, Singh DD, Naqvi AR. Molecular Diagnostic Tools for the Detection of SARS-CoV-2. Int Rev Immunol. **2021**; 40(1-2):143-56.
84. Faraji R, Behjati-Ardakani M, Faraji N, Moshtaghioun SM, Kalantar SM, Pedarzadeh A, et al. Molecular Diagnosis of Bacterial Definite Infective Endocarditis by Real-Time Polymerase Chain Reaction. Cardiol Res. **2018** ; 9(2) :99-106.
85. Fondation Suisse de Cardiologie. Maladies cardiaques inflammatoires [en ligne]. (page consultée le 30/6/ 2021). <https://www.swissheart.ch/fr/maladies-cardiaques-avc/maladies/endocardite/maladies-cardiaques-inflammatoires.html>
86. VIDAL. (2020). Endocardite infectieuse - symptômes, causes, traitements et prévention [en ligne]. (page consultée le 1/7/ 2021). <https://www.vidal.fr/maladies/coeur-circulation-veines/endocardite-infectieuse.html>
87. Armstrong G.(2020) Endocardite infectieuse - Troubles cardiovasculaires [en ligne]. (page consultée le 1/7/ 2021).<https://www.msdmanuals.com/fr/professional/troubles-cardiovasculaires/endocardite/endocardite-infectieuse>
88. Singh C, Mathur M, Dadhich H, Ganguly S. Molecular Characterization of Staphylococcus aureus of Camel (Camelus dromedarius) Skin Origin. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. **2018**; 7:3846-3490.
89. Podglajen I, Mainardi JL. Apport des techniques de biologie moléculaire dans le diagnostic des endocardites infectieuses. Réanimation. **2007** ; 16(3) : 193-9.
90. Fraperie P, Maye-lasserre M. Bactériémies. [en ligne]. (page consultée le 8/7/ 2021). <https://microbiologiemedicale.fr/diagnostic-laboratoire-endocardites-hemoculture/>
91. Dhawan B, Rawre J, Ghosh A, Malhotra N, Ahmed MM, Sreenivas V, et al. Diagnostic efficacy of a real time-PCR assay for Chlamydia trachomatis infection in infertile women in north India. Indian Med Res. **2014**; 140(2):252-61.

92. Berhonde S. Prévalence des infections à *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* et *Mycoplasma genitalium* chez les femmes consultant au centre d'orthogénie du CHU de Bordeaux. Thèse de Doctorat Université de Bordeaux, France. **2015** ; 78p.
93. Rawer C.(**2018**). Dangereuses chlamydias. [en ligne]. (page consultée le 1/7/ 2021). <https://www.avogel.ch/fr/votre-sante/themes-de-sante/chlamydias.php>
94. Lamoril J, Bogard M. La biologie moléculaire en pratique clinique en 2008 : Un exemple d'application en microbiologie : la recherche de *Chlamydia trachomatis*. Les technologies de laboratoire. **2008** ; 3(11) : 25-9.
95. Béréziat O. Application de la PCR en temps réel au diagnostic des candidémies. Thèse de Doctorat. Université Henri Poincaré Nancy 1, Nancy, France, **2004** : 195p.
96. Lafaurie L. (**2020**). Qu'est-ce que le *Candida albicans* ? [en ligne]. (page consultée le 9 /7/2021). <https://www.doctissimo.fr/sante/mycoses/principales-mycoses/candida-albicans-definition-symptome-traitement>
97. Reinwald M, Spiess B, Heinz WJ, Heussel CP, Bertz H, Cornely OA, et al. Aspergillus PCR-Based Investigation of Fresh Tissue and Effusion Samples in Patients with Suspected Invasive Aspergillosis Enhances Diagnostic Capabilities. J Clin Microbiol. **2013** ; 51(12): 4178-85.
98. Rossignol D. Diagnostic moléculaire des aspergilloses invasives : mise en place et évaluation d'une méthode de PCR en temps réel au CHU de Grenoble. Thèse de Doctorat. Université Joseph Fourier, Grenoble, France, **2013** :131p.
99. World today news (**2020**). Life-threatening fungus, *Aspergillus fumigatus*, discovered in quarter corona patients in ICU [en ligne]. (page consultée le 9/7/ 2021). <https://www.world-today-news.com/life-threatening-fungus-aspergillus-fumigatus-discovered-in-quarter-corona-patients-in-icu>
100. Hohlfeld P, Daffos F, Costa JM, Thulliez P, Forestier F, Vidaud M. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with a polymerase-chain-reaction test on amniotic fluid. N Engl J Med. **1994**; 331(11):695-9.
101. Centers for Disease Control and Prevention. (**2020**) .Prevention C-C for DC and CDC -

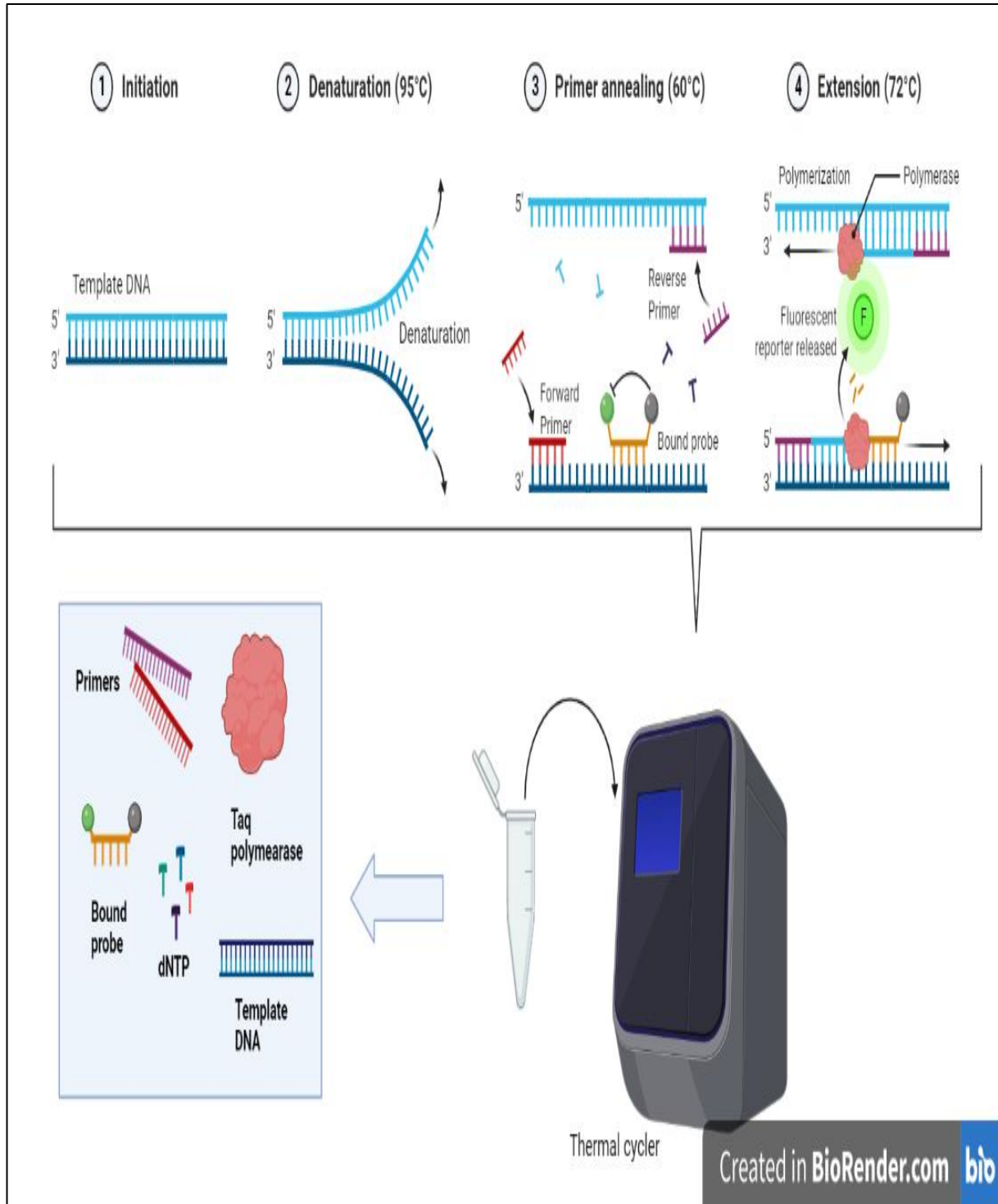
- Toxoplasmosis - General Information - Frequently Asked Questions (FAQs) [en ligne]. (page consultée le 7/7/2021).
https://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/gen_info/faqs.html
102. Roussakis M.(2017) Life Under the Microscope : Toxoplasma gondii [en ligne]. [page consultée le 8/7/ 2021]. <https://mykindofscience.com/2017/01/14/life-under-the-microscope-toxoplasma-gondii/>
103. Guegan H, Fillaux J, Charpentier E, Robert-Gangneux F, Chauvin P, Guemas E, et al. Real-time PCR for diagnosis of imported *schistosomiasis*. PLOS Neglected Tropical Diseases. 2019 ; 13(9) : 1-18.
104. Aubry P. Schistosomoses ou bilharzioses. Centre René Labusquière, Institut de Médecine Tropicale, Université de Bordeaux. 2019 ; 10 p.
105. Maya M. (2014). *Schistosoma haematobium* Model 3D [en ligne]. (page consultée le 8 /7/2021).<https://www.turbosquid.com/pl/3d-models/schistosoma-haematobium-3d-obj/1079786>
106. Somma M. Analyse d'échantillons alimentaires pour la présence d'organismes génétiquement modifiés : extraction et purification d'ADN. World Health Organization.2006 ; 19 p.
107. Denis F, Edouard B, Christian M, Marie-Cécile P, Roland Q. Bactériologie médicale : techniques usuelles. 2^e éd. 2011. 631 p.
108. Sacace biotechnologie. SaMag Extraction kit User Manual: SaMag Viral Nucleic Acid Extraction Kit (SM003) [en ligne]. (page consultée le 28/6/2021). http://www.peramed.com/peramed/docs/SM003_EN.pdf
109. Plateforme génomique. qPCR : comprendre les résultats qPCR [en ligne]. (page consultée le 28/6/2021).https://genomique.irc.ca/resources/files/Comprendre_les_resultats_qPCR.

ANNEXES

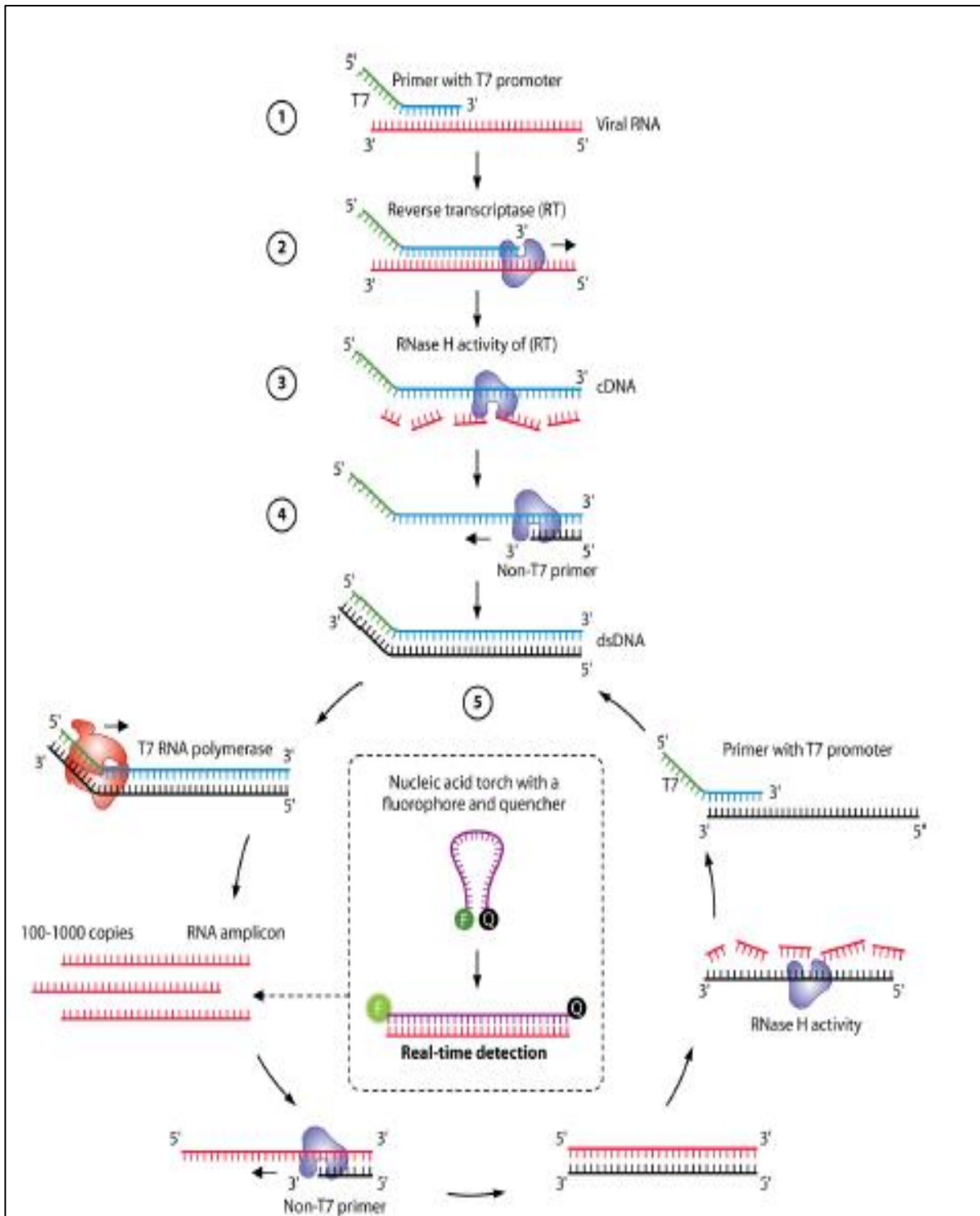
Annexe 1. Principe de la PCR classique (8)

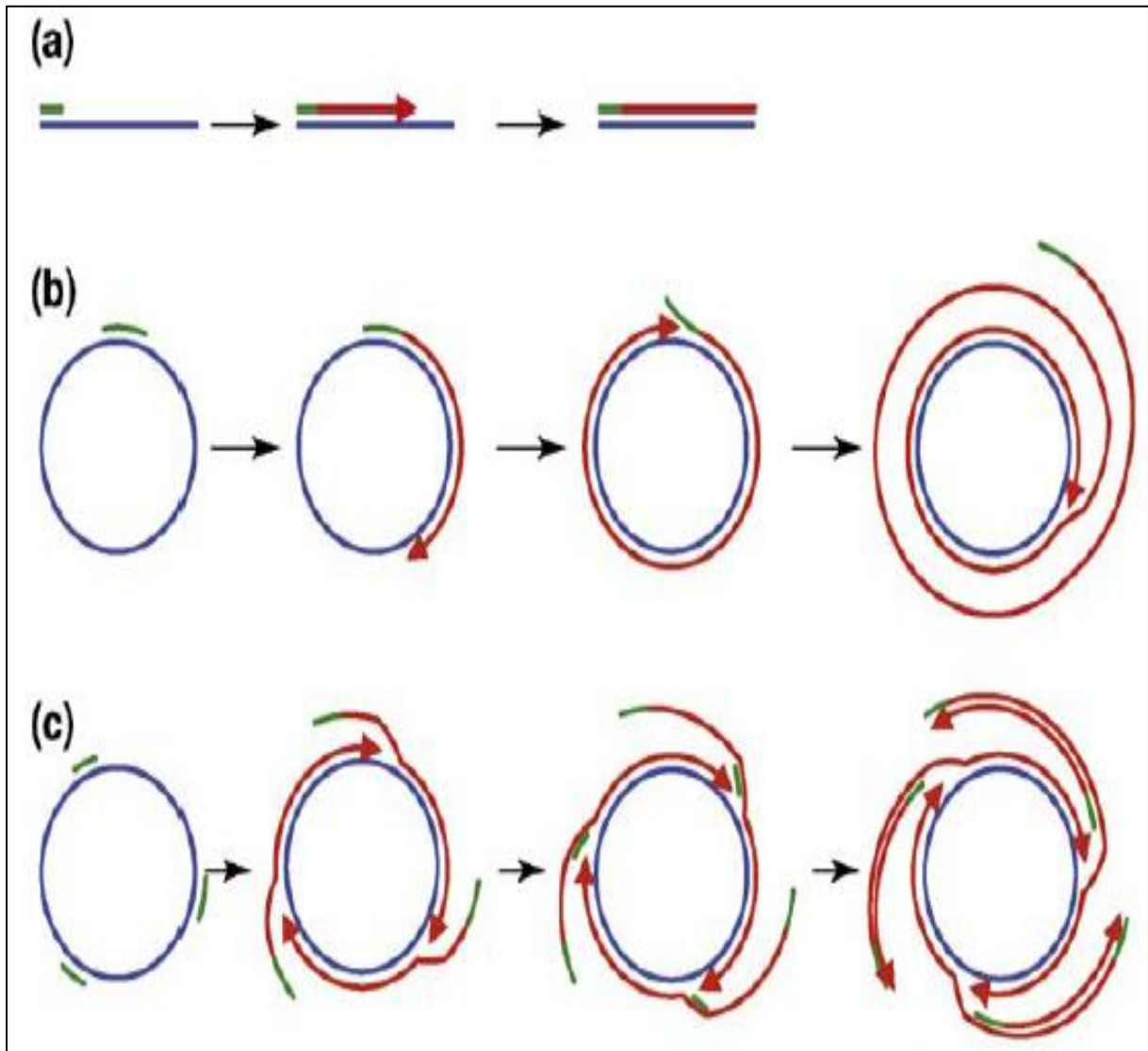


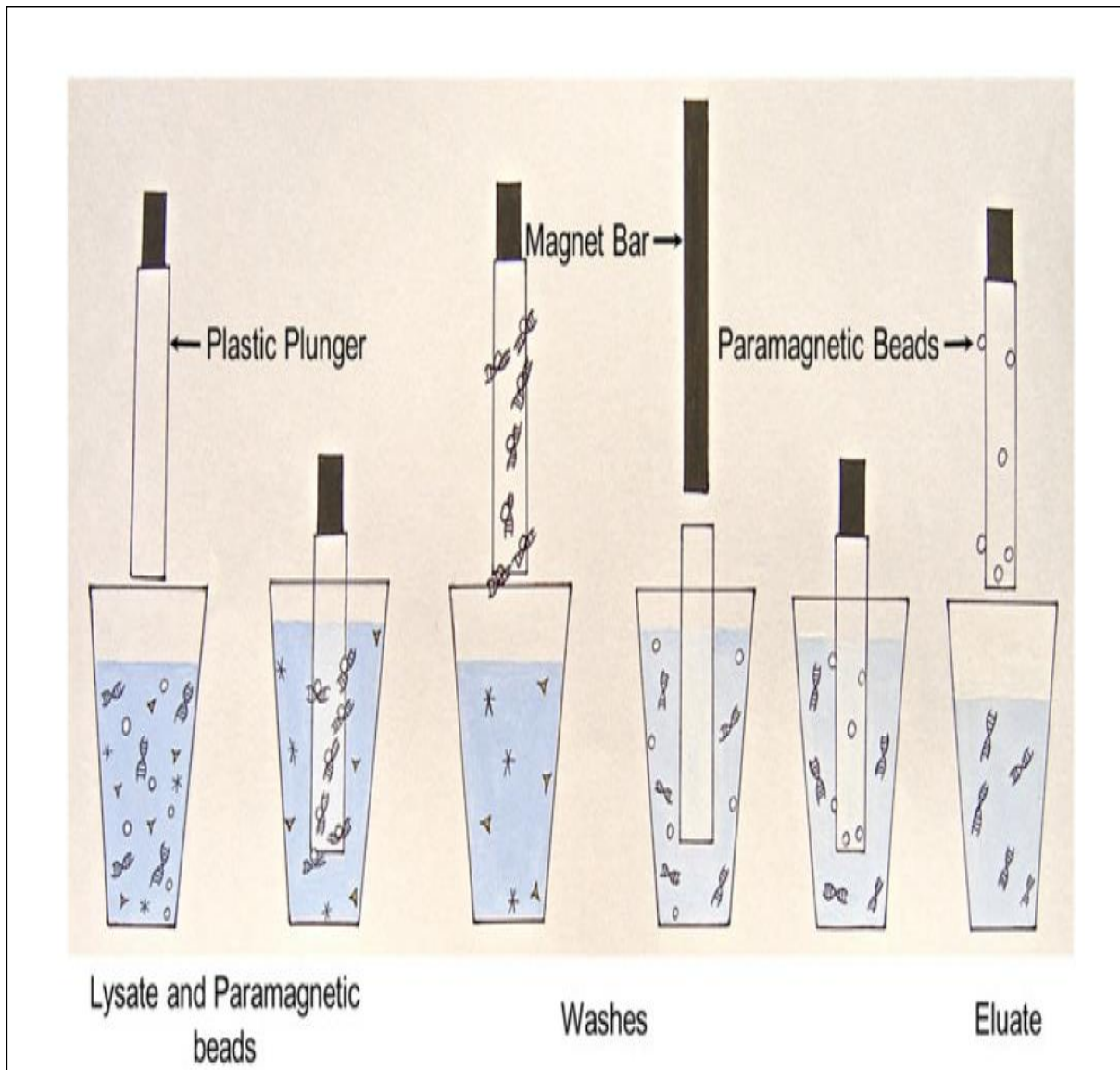
Annexe 2. Principe de l'amplification par PCR en temps réel



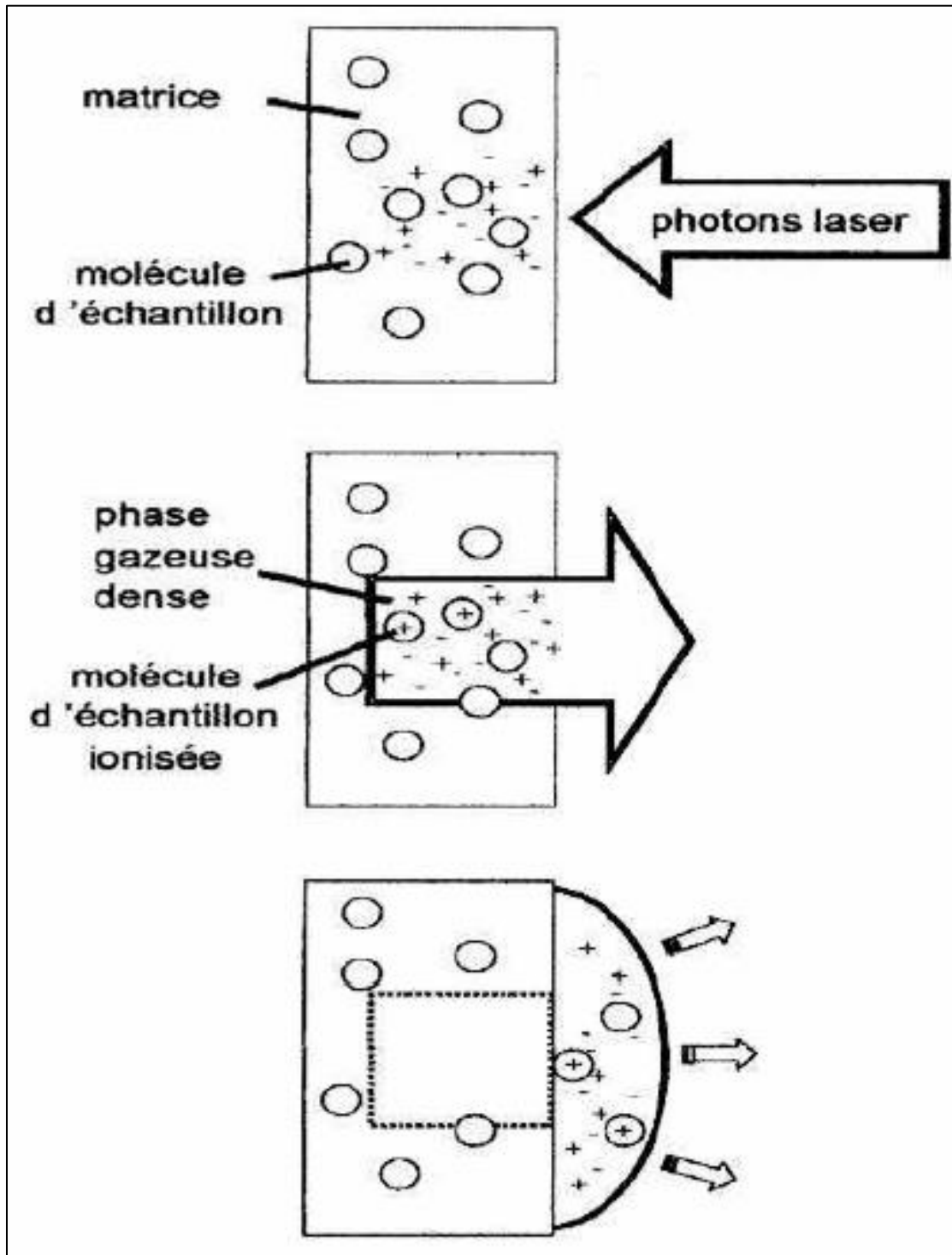
Annexe 3. Principe de la technique isotherme TMA (81)



Annexe 4. Principe de l'amplification par la technique RCA (23)

Annexe 5. Extraction de l'acide nucléique par l'utilisation des billes magnétiques (32)

Annexe 6. Principe de la spectrométrie de masse (42)



Annexe 7. Critères de Duke pour le diagnostic d'une endocardite infectieuse (90)

Critères de Duke modifiés	
Endocardite certaine si	<p>1 des 2 critères suivants :</p> <p>Critère pathologique : culture ou examen histologique +</p> <p>Critère clinique : association de</p> <ul style="list-style-type: none"> - 2 critères majeurs - ou de 1 critère majeur et de 3 critères mineurs - ou de 5 critères mineurs
Endocardite possible si	<p>Critère clinique : association de</p> <ul style="list-style-type: none"> - 1 critère majeur et de 1 critère mineur, - ou de 3 critères mineurs
Endocardite exclue si	<p>Aucun diagnostic certain</p> <p>Résolution en moins de 4 jours sous antibiotiques</p> <p>Absence d'évidence à la chirurgie ou à l'autopsie après 4 jours d'antibiotiques</p> <p>Aucun critère d'endocardite</p>

Annexe 8. Définition des critères de Duke pour le diagnostic d'une endocardite infectieuse (90)

Définition des critères
<p>CRITÈRES MAJEURS</p> <p>Hémocultures positives :</p> <ul style="list-style-type: none"> – 2 hémocultures positives à : streptocoques non groupables, <i>Streptococcus gallolyticus</i>, HACCEK, <i>S. aureus</i>, Entérocoque communautaire. – hémocultures persistantes au même microorganisme : 2 hémocultures + à 12h d'intervalle, ou toutes les hémocultures (si 3) ou une majorité (si plus de 4). <p>Sérologie de <i>C. burnetii</i> : avec des IgG en phase I ≥ 800 en IF (immunofluorescence)</p> <p>Atteinte de l'endocarde, signes échographiques et cliniques</p> <ul style="list-style-type: none"> – Échographique + : végétation, abcès ou désinsertion d'une valve prothétique – Clinique + : nouveau souffle cardiaque
<p>CRITÈRES MINEURS</p> <p>Clinique : Cardiopathie préexistante, toxicomanie, fièvre $>38^{\circ}\text{C}$, phénomènes vasculaires, immunologiques (glomérulonéphrite, nodules d'Osler, taches de Roth, facteur rhumatoïde..)</p> <p>Microbiologie : hémocultures positives (mais n'entrant pas dans la définition du critère majeur), sérologie positive pour une bactérie connue pour être responsable d'endocardite infectieuse.</p>

Annexe 9. Etude moléculaire réalisée au niveau de l'hôpital militaire de Constantine

1. Cadre d'étude

Dans le but de connaître quelles sont les techniques de Biologie moléculaire utilisées dans un laboratoire de microbiologie clinique en Algérie, nous avons mené cette étude au laboratoire de microbiologie à l'hôpital militaire universitaire régional de Constantine.

Au niveau de cet hôpital, la mesure de la charge virale des quelques virus est effectuée : le virus de l'hépatite C (VHC), le virus de l'hépatite B (VHB), le virus du sida (VIH), le cytomégalovirus (CMV), le virus d'Epstein-Barr (EBV), JCV, BKV).

Notre étude a duré un mois (du 03 mai 2021 au 02 juin 2021) et n'a concerné que la mesure de la charge virale du VHC par la technique de PCR en temps réel.

Par manque de résultats non fournis par l'hôpital militaire, notre travail pratique se résume uniquement en la description de la technique.

2. Principe (mesure de la charge virale)

Ce test de quantification virale comporte deux principales étapes :

2.1. Extraction de l'acide nucléique viral

C'est une lyse de l'entité virale suivie d'une purification qui permet la séparation de la séquence des débris, pour cela la technique doit être à la fois efficace contre les éléments complexes mais aussi pouvoir préserver l'acide nucléique cible (106).

2.2. Mesure de la charge virale

Après amplification par PCR en temps réel ou la réaction d'amplification est réalisée en cycle fermé, la température est automatiquement contrôlée par un thermocycleur et le suivi de la réaction est effectué grâce à des sondes fluorescentes dont l'intensité est proportionnelle à la quantité d'amplicons produits pendant la réaction de polymérisation (107).

3. Contrôle de qualité

Pour assurer le bon fonctionnement de la technique il est recommandé d'utiliser des contrôles :

3.1. Contrôle positif et contrôle négatif ; évitent les résultats faussement positifs. Dans ce type d'étude (quantification) il est indiqué, l'ajout de deux contrôles avec deux valeurs différentes.

3.2. Contrôle interne : éviter les résultats faussement négatifs.

3.3. RNA carrier (dans le cas d'échantillons de faible quantité).

4. Echantillonnage

Un prélèvement de bonne qualité est effectué sur 5 patients différents pour obtenir 5 échantillons sanguins. Une centrifugation à 3000 tours/s est réalisée sur les 5 prélèvements, puis le sérum est récupéré dans un tube ETDA et conservé soit par congélation à -6°C ou bien par réfrigération de courte durée à 4°C selon l'examen.

5. Pré-PCR

Tout le test est effectué par un kit semi-automatisé et selon des conditions spécifiques du fournisseur (Sacace biotechnologie).

5.1 Pré-extraction

- Récupérer les 5 échantillons ensuite allumer la hôte (MSC 12 STD Jouan industrie) avec le centrifugeur (CAPP 'RPM *100') et vortex (CYANCL 001).
- Procéder au nettoyage de la hôte et préparer les réactifs.
- Dans chaque tube de réactif lyophilisé, une quantité de liquide Invitrogene (10977-035 500 ml) est ajoutée (tableau).
- Puis ces derniers sont brièvement vortexés et centrifugés pendant 5s à 60 tours/s.
- La conservation des réactifs se fait à 4°C
- Dans un portoir contenant des tubes et avec une micropipette de 400 µl, les échantillons sont prélevés puis les contrôles et les calibrateurs provenant du kit HCV Real-TM Quant DX (Sacace biotechnologie), de manière à avoir 12 tube : 5 échantillons, 2 tubes contrôle positif, 1 tube contrôle négatif et 2 tubes de chaque calibrateur (2 tubes du premier et 2 tubes du deuxième).

- Dans chaque tube le contrôle interne et le RNA carrier (qui est récupéré du kit SaMag viral nucleic acid extraction kit (Sacace biotechnologie)) sont ajoutés (10 μ l et 20 μ l respectivement) (figure).

- Puis devant chaque tube une cupule contenant le milieu réactionnelle de PCR est mise dans le portoir.

Tableau. Dosage du liquide invitrogène dans les tubes contenant les réactifs de l'extraction

RÉACTIF LYOPHILISÉ	CONTRÔLE (μ l)
CALIBRATEUR 1	1200
CALIBRATEUR 2	1200
CONTRÔLE POSITIF	1200
CONTRÔLE NÉGATIF	1200
CONTRÔLE INTERNE	300 (déjà préparé)
RNA CARRIER	1000

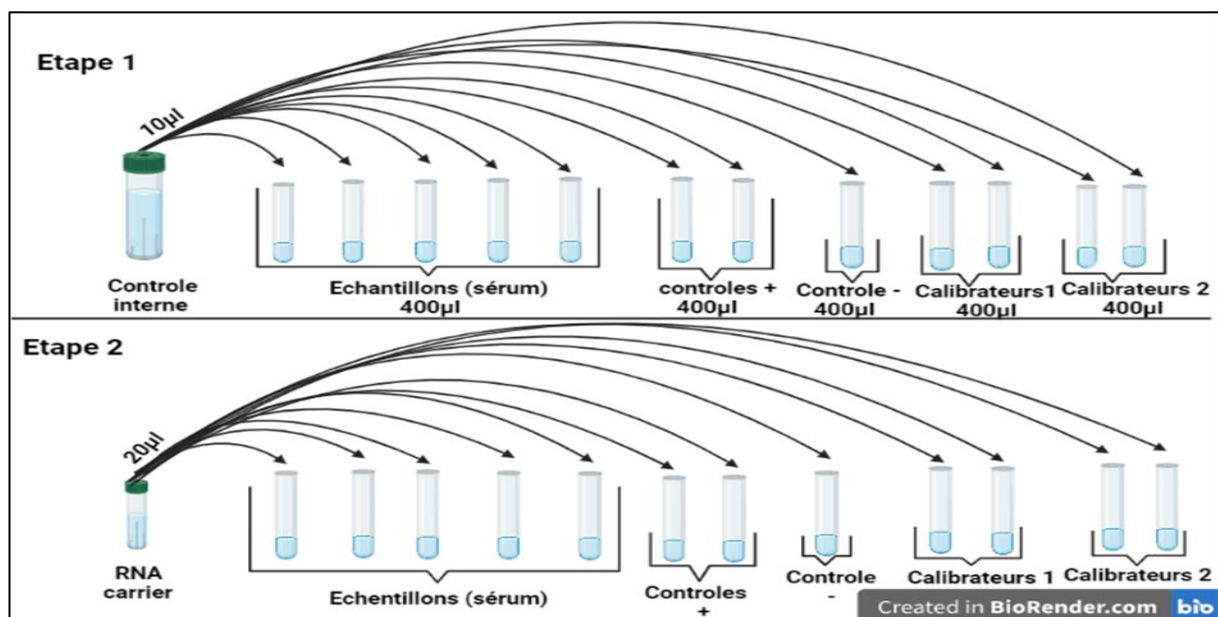


Figure . Préparation des réactifs pour l'extraction

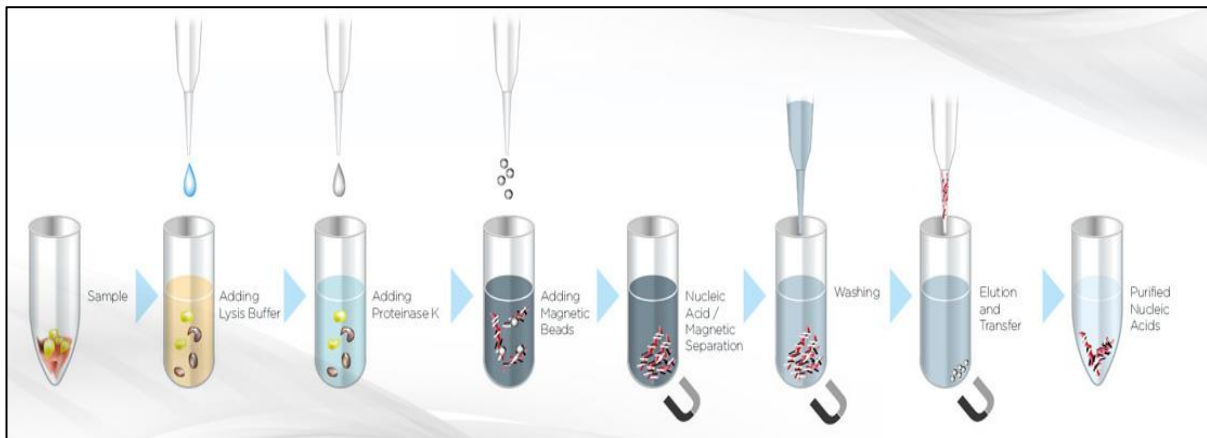


Figure . Les étapes de l'extraction de l'ADN (108)

5. réaction de polymérisation en chaine en temps réel quantitative (RT-PCR)

- Pour la réalisation de la PCR, un thermocycleur SaCycler-96 real time PCR system (Sacace biotechnologie) est utilisé.
- On débute par la mise des cupules dans le thermocycleur dans un ordre bien précis (échantillons-contrôles-calibrateurs).
- Grâce au logiciel SaCycler96, on procède à une programmation qui comporte tout d'abord la sélection du test (quantification de l'ARN viral du HCV), puis l'indication du nombre d'échantillons, contrôles et calibrateurs. Dans le cas de la PCR temps réel quantitative, on choisit la lampe Hex parmi les autres lampes, ensuite grâce à des valeurs indiquées dans le kit spécifique au VHC, on règle les calibrateurs mis en place dans le thermocycleur.
- On lance le programme d'amplification PCR qui permet l'organisation automatique de la distribution des températures pendant 47 cycles incluant les 2 cycles de PCR hot-Start et 45 cycles de PCR temps réel, tout cela pendant 2 h et huit minutes (tableau).

6. Lecture des résultats

- Les résultats sont interprétés par le logiciel SaCycler96.
- Le thermocycleur mesure après 47 cycles, les valeurs de fluorescences produite au cours de

chaque cycle. Au début des premiers cycles, la fluorescence est indétectable (faible quantité d'amplicons) mais par amplification du nombre d'amplicons, l'intensité de fluorescence augmente proportionnellement, ce qui induit une courbe représentant l'intensité de la fluorescence par rapport aux nombres de cycles comportant une phase exponentielle et une phase plateau.

Tableau . Programmation de la réaction de PCR en temps réel quantitative

	Températures	temps	Nombre de cycle
PCR hot-Start	50C°	15 minutes	1
	95C°	15 minutes	1
PCR temps réel	95C°	5 minutes	5
	60C°	20 minutes	
	72C°	15 minutes	
PCR temps réel	95C°	5 minutes	40
	60C°	30 minutes	
	72C°	15 minutes	

- Les résultats sont collectés en phase exponentielle de la courbe d'amplification par un croisement entre cette dernière et la ligne seuil qui est la ligne de détection de la fluorescence et début de la phase exponentielle. L'intersection entre ces deux dernières donne la valeur du cycle seuil Ct, et donc le Ct est la mesure relative de la concentration de l'acide nucléique à amplifier c'est-à-dire que plus le nombre de Ct est élevé moins l'acide nucléique cible est détectable, au contraire si le Ct est à nombre faible cela signifie que l'acide nucléique cible est à grande quantité et fortement exprimé (109).

Dans le cas du virus de l'hépatite C, un intervalle de détection est compris entre 30 et 10⁷ UI/ml dans un échantillon de 400 µl (1UI = 4 copies).

RESUMES

Résumé

La biologie moléculaire joue un rôle important dans la biologie médicale surtout dans l'étude des microorganismes. Plusieurs travaux ont été réalisés prouvant sa valeur dans le diagnostic clinique, en particulier celle basée sur la technique de PCR. Mais suite à quelques problèmes, des modifications ont été appliquées selon la performance, la qualité, la spécificité et la sensibilité de la technique. On compte les techniques d'amplification thermique, isothermique et les techniques de détection. Chaque technique possède différentes indications permettant aux laboratoires le choix de la technique selon le type de prélèvement à analyser et le microorganisme à identifier.

La biologie moléculaire possède plusieurs atouts qui la rendent nettement supérieure aux méthodes classiques appliquées dans les laboratoires cliniques mais la majorité des laboratoires favorise encore les méthodes classiques.

Ainsi, notre travail vise à améliorer la perspective de la biologie moléculaire en microbiologie clinique en exposant ses attributs et ses diverses applications dans le domaine clinique.

Mots clés : Biologie moléculaire, Microbiologie clinique, PCR, Techniques moléculaires

ملخص

تلعب البيولوجيا الجزيئية دورًا مهمًا في علم الأحياء الطبي، وخاصة في دراسة الكائنات الحية الدقيقة. حيث تم إجراء العديد من الدراسات التي تثبت قيمتها في التشخيص السريري ولا سيما تلك التي تعتمد على تقنية تفاعل البوليميراز المتسلسل. ولكن بسبب بعض المشاكل، تم إجراء تعديلات على الأداء والجودة والنوعية وحساسية التقنية. حيث أصبح هناك تقنيات التضخيم الحراري، تقنيات التضخيم ثابت الحرارة وتقنيات الكشف حيث كل تقنية لها مؤشرات مختلفة تسمح للمختبرات باختيار التقنية وفقًا لنوع العينة المراد تحليلها والكائنات الحية الدقيقة المراد تحديدها.

للبيولوجيا الجزيئية العديد من المزايا التي تجعلها تتفوق بوضوح على الطرق التقليدية المطبقة في المختبرات السريرية ولكن غالبية المختبرات لا تزال تفضل الطرق التقليدية. وبالتالي، يهدف عملنا إلى تحسين منظور البيولوجيا الجزيئية في علم الأحياء الدقيقة الإكلينيكي من خلال الكشف عن سماته وتطبيقاته المختلفة في المجال السريري.

الكلمات المفتاحية: البيولوجيا الجزيئية، علم الأحياء الدقيقة السريري، تفاعل البوليميراز المتسلسل، التقنيات الجزيئية

Abstract

Molecular biology plays an important role in medical biology, especially in the study of microorganisms. Several studies have been carried out proving its value in clinical diagnosis, in particular that based on the PCR technique. However, following some problems, modifications were applied according to the performance, quality, specificity and sensitivity of the technique. There are thermal amplification techniques, isothermal amplification and detection techniques. Each technique has different indications allowing laboratories to choose the technique according to the type of sample to be analysed and the microorganism to be identified.

Molecular biology has several advantages, which make it clearly superior to the classical methods applied in clinical laboratories, but the majority of laboratories still favour classical methods.

Thus, our work aims to improve the perspective of molecular biology in clinical microbiology by exposing its attributes and various applications in the clinical field.

Keywords: Molecular biology, Clinical microbiology, PCR, Molecular techniques

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

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biologie moléculaire des microorganismes

La biologie moléculaire en microbiologie clinique

Résumé :

La biologie moléculaire joue un rôle important dans la biologie médicale surtout dans l'étude des microorganismes. Plusieurs travaux ont été réalisés prouvant sa valeur dans le diagnostic clinique, en particulier celle basée sur la technique de PCR. Mais suite à quelques problèmes, des modifications ont été appliquées selon la performance, la qualité, la spécificité et la sensibilité de la technique. On compte les techniques d'amplification thermique, isothermique et les techniques de détection. Chaque technique possède différentes indications permettant aux laboratoires le choix de la technique selon le type de prélèvement à analyser et le microorganisme à identifier.

La biologie moléculaire possède plusieurs atouts qui la rendent nettement supérieure aux méthodes classiques appliquées dans les laboratoires cliniques mais la majorité des laboratoires favorise encore les méthodes classiques.

Ainsi, notre travail vise à améliorer la perspective de la biologie moléculaire en microbiologie clinique en exposant ses attributs et ses diverses applications dans le domaine clinique.

Mot clés : Biologie moléculaire, Microbiologie clinique, PCR, Techniques moléculaires

Devant le jury d'évaluation :

Présidente du jury : Mme ABDELAZIZ Wided (MCB- UFM Constantine 1).

Rapporteur : Mme HECINI-HANNACHI Abla (MCA- U Salah Boubnider Constantine 3).

Examinatrice : Mme GUERGOURI Ibtissem (MAA- UFM Constantine).

Elaborée par : M^{elle}. Bouarioua Racha
M^{elle}. Gouah Meissa Cheima

Soutenu le 19/09/2021

Année universitaire : 2020-2021