



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 Constantine 1 Frères Mentouri
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة قسنطينة 1 الإخوة منتوري
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

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

Application de la technologie des puces à ADN pour l'identification des bactéries pathogènes d'origine alimentaire.

Présenté par : Boulahbal Isra

Le : 13/06/2024

Boukroune Kawther

Boukerzaza Kaouther Fatima zohra

Jury d'évaluation :

Président : BOUBEKRI. Karima (MCA - U Constantine 1 Frères Mentouri).

Encadrant : BOULTIFAT. Linda (MCB - U Constantine 1 Frères Mentouri).

Examineur : MERGOUD. Lilia (MAA - U Constantine 1 Frères Mentouri).

Année universitaire
2023 - 2024

Remerciements



Avant tout propos, nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à, ALLAH, pour nous avoir accordé la santé, la persévérance et la force morale nécessaires pour surmonter les épreuves et mener à bien nos études, concrétisant ainsi nos aspirations.

Nous exprimons nos remerciements et notre profonde gratitude à notre encadrante Mme. BOULTIFAT Linda, maître de conférences à l'université de Constantine 1, pour avoir accepté de diriger ce travail, sa précieuse aide, sa disponibilité et sa patience nous ont été d'un grand soutien. Nous sommes reconnaissantes d'avoir eu le privilège de bénéficier de son encadrement.

Nos sincères remerciements s'adressent également aux membres du jury Mme BOUBEKRI. Karima (MCA - U Constantine 1 Frères Mentouri) ainsi que Mme MERGOUD. Lilia (MAA - U Constantine 1 Frères Mentouri) d'avoir accepté de siéger dans notre jury afin d'évaluer notre travail.

Nous adressons nos sincères remerciements à l'ensemble du corps enseignant qui nous a transmis leur savoir et leur expertise tout au long de notre parcours universitaire. Leurs enseignements et leur guidance ont été essentiels à notre développement intellectuel et à l'acquisition des compétences nécessaires pour mener à bien ce travail.

Enfin, nous adressons notre gratitude et nos sincères remerciements à tous ceux qui, ont contribué, de près ou de loin, par leurs aides et encouragements dans la concrétisation de ce projet.

Dédicaces



Je dédie ce travail :

*À mes parents, **Mohamed et Leila***

Pour votre amour inconditionnel, votre soutien constant et vos sacrifices sans fin qui m'ont permis d'arriver jusqu'ici et plus. Qu'Allah vous donne la longue vie et la bonne santé.

*À mes frères **Chouaib, Oussama et Houssein***

Pour votre soutien, et votre encouragement continu.

*À mes sœur **Amina et Ilyada***

Mes belles-sœurs, mais aussi mes grandes Sœurs. Pour votre soutien, votre écoute et vos encouragements constants. Je vous aime profondément.

*À mes chères neveux **Anes** mon bien aimé, mon petit ange **Acil** et ma belle princesse **Rylam**,*

Je vous aime du fond du cœur.

*À toute **ma famille**, chacun en son nom.*

*À mes très chères amies en particulier **Kouka, kawther, Ines et Amani**,*

Votre amitié est un précieux trésor.

Sans oublier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail

Isra

Dédicaces



Je dédie ce travail :

*À mes merveilleux **parents**,*

Qui m'ont appris la valeur du travail acharné et de la persévérance. Vous êtes mes plus grandes sources d'inspiration. Je vous aime.

Mon éternel exemple, ma force qui ne se brise jamais, la personne la plus digne

*De mon estime et de mon respect, à toi **mon père** que dieu te garde.*

*À **ma maman**,*

Dont la force et le courage m'inspirent chaque jour. Merci pour tes sacrifices, ton amour inconditionnel et ta présence rassurante. Je t'aime de tout mon cœur.

*À **mes sœurs** adorées **Amira** et **Khaoula**,*

Dont la générosité et le dévouement n'ont jamais cessé de m'étonner. Votre présence et votre soutien ont été essentiels pour moi. Vous êtes les meilleures.

*À mes amis **Haithem**, **Hocine**, **Amani**, **Noufel**, qui ont toujours été là pour m'aider et me soutenir dans les moments de stress et de doute. Votre soutien et votre générosité sont inestimables. Merci de m'avoir accompagnée dans cette aventure académique*

*"À mes chères **Israa**, **Kaouther**, avec qui j'ai traversé les hauts et les bas de la vie universitaire. Votre amitié a été une ancre de stabilité et de réconfort. Merci pour votre fidélité et votre soutien constant.*

Kawther

Dédicaces



Je dédie ce travail :

*À mes chers **parents**, pour leur amour, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études.*

*Mon **père**, exemple éternel de force et de sagesse, qui a fait de moi la personne que je suis.*

*Ma **mère**, mon paradis, ma raison de vivre, le fil d'espoir qui allume mon chemin, je t'aime infiniment.*

*À mon frère **Abdellatif**, le compagnon de mes joies et de mes peines, pour sa présence rassurante et son soutien constant.*

*À mes sœurs, **Sara et Rayane**, qui ont toujours été là pour moi, dont le soutien sans faille a été un phare dans les moments sombres de mon parcours.*

*À mes petits anges, **Aous, Mouiz et Zayd**, ainsi qu'à mes deux princesses, **Mays et Oulfa**, qui apportent tant de joie à ma vie.*

*À mes amies **Soundous et Hanine**, les plus proches, complices de mes rêves et gardiens de mes secrets, pour leur amitié sincère et leurs encouragements sans faille.*

*À mes fidèles amies, **Israa, Kawther et Amani** qui ont été mes compagnes durant les moments difficiles et les succès de mon parcours universitaire. Que Dieu les bénisse, je leur souhaite encore plus de succès dans l'avenir.*

Mon amour pour vous est infini.

Kaouther

TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations et acronymes	i
Liste des figures	ii
Liste des tableaux.....	iii
Résumé	
Introduction.....	1
Chapitre 1 Bactéries pathogènes d'origine alimentaire	
1. Généralités	2
2. Principales bactéries pathogènes d'origine alimentaire	2
2.1. <i>Escherichia. coli</i>	2
2.1.1. Définition et classification	2
2.1.2. Pathologies liées à EHEC	4
2.1.3. Épidémiologie humaine et modes de transmission des EHEC	4
2.2. <i>Listeria monocytogenes</i>	5
2.2.1. Définition et classification	5
2.2.2. Pathologies liées à <i>Listeria monocytogenes</i>	6
2.2.3. Épidémiologie humaine et modes de transmission	6
2.3. <i>Salmonella enterica</i>	6
2.3.1. Définition et classification	6
2.3.2. Pathologies liées à <i>Salmonella enterica</i>	7
2.3.3. Epidémiologie humaine et modes de transmission	8
2.4. <i>Staphylococcus aureus</i>	9
2.4.1. Définition et classification	9
2.4.2. Pathologies liées aux <i>Staphylococcus aureus</i>	9
2.4.3. Épidémiologie humaine et modes de transmission	10
Chapitre 2 : Méthodes traditionnelles d'identification des bactéries pathogènes	
1. Introduction.....	11
2. Critères de la qualité microbiologique des aliments	11
3. Méthodes de contrôle microbiologique des aliments.....	12
4. Détection des bactéries pathogènes d'origine alimentaire	13
5. Limite des méthodes de détection et de dénombrement traditionnelles.....	16
Chapitre 3: Technologie des puces à ADN	
1. Introduction aux puces à ADN.....	18
1.1. Définition des puces à ADN.....	18
1.2. Historique.....	18
1.3. Principe des puces à ADN.....	19

1.4. Différents types de puces à ADN	19
1.4.1. Type de puce en fonction de la méthode de fabrication	20
1.4.2. Type de puce en fonction de la densité des spots	21
1.4.3. Type de puce en fonction de la nature des sondes.....	21
2. Fabrication des puces à ADN.....	22
2.1. Conception des sondes	22
2.1.1. Critères de sélection de sondes ADN	23
2.1.2. Outils informatiques pour la sélection des sondes	25
2.2. Les supports	26
2.3. Adressage de biopuces sur des surfaces	26
3. Hybridation des cibles.....	28
3.1. Préparation des cibles.....	28
3.1.1 Préparation des cibles pour l'analyse du transcriptome	29
3.1.2. Préparation des cibles pour l'analyse du génome	30
3.2 Hybridation et Lavage de la biopuce	31
4. Acquisition et analyse des données.....	31
4.1. Détection du signal.....	31
4.2 Analyse du signal	32
5. Domaines d'application des puces à ADN.....	32
5.1. Domaine de la médecine	32
5.1.1. Séquençage par hybridation SBH	32
5.1.2. Pharmacogénomique.....	33
5.1.3. Analyse médico-légale	33
5.2. Domaine de l'agroalimentaire.....	33
5.3. Domaine de l'environnement.....	33
5.4. Domaine de la microbiologie	34
6. Intérêts et les limites des puces à ADN.....	34
6.1. Intérêts.....	34
6.2. Limites	35
Chapitre 4 : Synthèse des résultats d'études publiées sur l'application des puces a ADN	
1. Introduction.....	36
2. Analyse de l'article 1	36
3. Analyse de l'article 2	38
Conclusion	Error! Bookmark not defined.
Références bibliographiques.....	Error! Bookmark not defined.
Annexe	51

Résumé

La mondialisation du commerce alimentaire, associée à l'évolution des habitudes de consommation, a engendré une chaîne alimentaire plus complexe et, par conséquent, a accru le risque de contamination par des bactéries pathogènes. L'identification rapide et précise de ces bactéries est essentielle pour la prévention des épidémies et la protection de la santé publique. Dans ce contexte, l'objectif visé par ce travail bibliographique est de mettre l'accent sur les méthodes actuelles de détection des bactéries pathogènes dans les aliments, en s'intéressant plus particulièrement aux évolutions récentes vers des approches plus rapides et plus performantes telle que la technologie des puces à ADN. Cette dernière est proposée comme alternative aux techniques microbiologiques fondamentales qui reposent sur des approches usuelles longues et laborieuses. De plus, elles peuvent manquer de spécificité, surtout lorsqu'il s'agit de distinguer des souches bactériennes proches. L'adoption de cette technique pour la détection des pathogènes d'importance majeure dans le domaine alimentaire, représente une avancée significative, offrant des solutions fiables en matière d'efficacité et de rapidité contribuant à une meilleure protection de la santé publique.

Mots clés : Bactéries pathogènes, sécurité alimentaire, identification bactérienne, puce à ADN, Hybridation moléculaire, sonde.

Abstract

The globalization of the food trade, coupled with changing consumer habits, has led to a more complex food supply chain and, consequently, increased the risk of contamination by pathogenic bacteria. The rapid and accurate identification of these bacteria is essential for preventing outbreaks and protecting public health. In this context, the aim of this literature review is to highlight current methods for detecting pathogenic bacteria in food, with a particular focus on recent developments towards faster and more effective approaches, such as DNA chip technology. This method is proposed as an alternative to fundamental microbiological techniques that rely on traditional, lengthy, and labor-intensive processes. Moreover, these traditional methods may lack specificity, especially when it comes to distinguishing closely related bacterial strains. Adopting this technique for detecting major pathogens in the food industry represents a significant advancement, providing reliable solutions in terms of effectiveness and speed, thus contributing to better public health protection.

Keywords: Pathogenic bacteria, food safety, bacterial identification, DNA chip, molecular hybridization, probe.

الملخص

عولمة التجارة الغذائية، المرتبطة بتطور العادات الاستهلاكية، قد أدت إلى سلسلة غذائية أكثر تعقيداً وبالتالي زادت من خطر التلوث بالبكتيريا المسببة للأمراض. إن التعرف السريع والدقيق على هذه البكتيريا أمر ضروري للوقاية من الأوبئة وحماية الصحة العامة. في هذا السياق، يهدف هذا العمل إلى التركيز على الأساليب الحالية للكشف عن البكتيريا الممرضة في الأغذية، مع إيلاء اهتمام خاص للتطورات الحديثة نحو نهج أسرع وأكثر كفاءة مثل تكنولوجيا رقائق الحمض النووي الدقيقة. تُقترح هذه الأخيرة كبديل للتقنيات الميكروبيولوجية الأساسية التي تعتمد على النهج التقليدي الطويل والشاق. بالإضافة إلى ذلك، قد تفتقر إلى التحديد الدقيق، خاصة عندما يتعلق الأمر بتمييز السلالات البكتيرية القريبة. يمثل اعتماد هذه التقنية للكشف عن البكتيريا المسببة للأمراض ذات الأهمية الكبرى في المجال الغذائي تقدماً مهماً، حيث تقدم حلاً موثوقاً من حيث الكفاءة والسرعة مما يساهم في حماية أفضل للصحة العامة.

الكلمات المفتاحية : البكتيريا المسببة للأمراض، سلامة الغذاء، الكشف على البكتيريا، رقاقة الحمض النووي الدقيقة، التهجين الجزيئي، المسبار.

Liste des abréviations et acronymes

ADN :	Acide Désoxyribonucléique
ADNc :	Acide Désoxyribonucléique complémentaire
AFM :	Microscope à Force Atomique
AFNOR :	Association française de normalisation
ARN :	Acide Ribonucléique
ARNm :	Acide Ribonucléique messenger
BLAST:	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CDS :	<i>Coding Sequence</i>
CH :	Colite hémorragique
Cy3 :	Cyanine 3
Cy5 :	Cyanine 5
DO :	Déclaration obligatoire
EHEC:	<i>Escherichia coli</i> entérohémorragiques
FDA:	<i>Food and Drug Administration</i>
HACCP:	Hazard Analysis & Critical Control Point
ISO:	<i>International organisation for standarization</i>
PCR:	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PMT:	Tube photomultiplicateur
PTT:	Purpura thrombotique thrombocytopénique
RT-PCR:	<i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
SBH :	<i>Sequencing by hybridization</i>
SE :	Entérotoxines staphylococciques
SHU :	Syndrome hémolytique et urémique
STEC:	<i>Shiga-toxin-Producing E. coli</i>
TIA :	Toxi-infections alimentaires
TIAC :	Toxi-infections alimentaires collectives
UFC :	Unité Formant Colonies
VTEC :	<i>Verotoxin-Producing E. coli</i>

Liste des figures

Figure 1 . Classification d' <i>Escherichia. coli</i> en trois groupes principaux : commensal, pathogène intestinal et pathogène extra-intestinal	3
Figure 2. Caractéristiques des infections aux EHEC : chronologie d’apparition des symptômes et leurs possibles degrés de gravité (Kooh, 2022).	4
Figure 3. Observation au microscope électronique de <i>Listeria monocytogenes</i> , 41 250X (White, 2002).	5
Figure 4. Classification de <i>Salmonella</i> (Dyan, 2022).	7
Figure 5. Nombre de cas confirmés de salmonellose pour 100 000 habitants par pays dans l’Europe (Centre européen de prévention et de contrôle des maladies, 2022).	9
Figure 6. Plan d’échantillonnage à deux classes (www.securite-alimentaire.public.lu).....	11
Figure 7. Plan d’échantillonnage à trois classes (www.securite-alimentaire.public.lu)	12
Figure 8. Protocole expérimental de l'analyse microbiologique quantitative (dénombrement sur milieu solide).....	14
Figure 9. Plan d'étude de <i>Salmonella</i> selon la norme EN/ISO 6579	15
Figure 10. Comparaison générale de l'estimation du temps nécessaire pour la détection des bactéries pathogènes : Approche traditionnelle vs. Puce à ADN.....	17
Figure 11. Principe des puces à ADN (Li et Liu, 2003).....	19
Figure 12. Les deux principes du transfert d’oligonucléotides sur un support solide (Fesseha et Tilahun, 2021).	20
Figure 13. Synthèse <i>in situ</i> base par base des oligonucléotides par photolithographie (Lipshutz et al., 1999).	21
Figure 14. Algorithme de base pour la recherche d'oligonucléotides (Rimour, 2006).	23
Figure 15. Utilisation du BLAST pour éviter les régions ayant une grande similitude avec d'autres transcrits (Wernersson, 2007).	24
Figure 16. Schéma représentant : à gauche : le principe du dépôt par activation laser, à droite : Dépôt des spots par adaptation de la technologie Jet d’encre (Colina <i>et al.</i> , 2005).	28
Figure 17. Protocole du marquage direct et indirect par les fluorochromes Cy3 et Cy5 (Yu <i>et al.</i> , 2002).	30
Figure 18. Principe d’hybridation sur une biopuce à ADN (Foncy, 2013)	31
Figure 19. Principe général de la détection du signal (Frouin et Gidrol, 2005).	32
Figure 20. Application de puce à ADN dans l’analyse microbiologique (phillipe, 2005).	34

Liste des tableaux

Tableau 1. Exemple des méthodes de recherche et de dénombrement des bactéries.....	13
Tableau 2. Différences entre les puces à ADNc et les puces à oligonucléotides (Binod.G, 2013).	22
Tableau 3. Classification des puces à ADN selon leur complexité et applications associées..	23
Tableau 4. Outils informatiques pour la sélection des sondes.	25
Tableau 5. Techniques d'adressage mécanique avec contact.	27
Tableau 6. Techniques d'adressage sans contact	27
Tableau 7. Les propriétés des cyanines Cy3 et Cy5 (https://www.biologie-journal.org/).	29

Introduction

La sécurité alimentaire, est une préoccupation mondiale majeure, en raison de son impact profond sur la santé publique et l'économie. Une alimentation de qualité est essentielle pour prévenir diverses maladies et garantir le bien-être général des populations. Avec l'augmentation constante de la population mondiale, l'importance de fournir des aliments sains et propres devient un enjeu crucial. L'accent est principalement mis sur la détection des agents pathogènes bactériens, potentiellement dangereux pour la santé humaine. La surveillance de ces agents tout au long de la chaîne de production est donc cruciale pour assurer la protection du consommateur.

Les méthodes conventionnelles de détection qui comprennent, l'isolement et l'identification des pathogènes nécessitent un temps d'analyse important. Le délai de réponse peut s'étaler de quelques jours à plusieurs jours, pour être complétées, en plus de présenter un risque d'erreurs positives ou négatives. Parallèlement, des méthodes alternatives, plus rapides, ont émergé, y compris une variété de techniques moléculaires très sensibles et extrêmement spécifiques. Parmi ces techniques, la puce à ADN semble apparaître comme une solution prometteuse à ce problème.

Les puces à ADN utilisent les principes de l'hybridation moléculaire pour identifier des séquences génétiques spécifiques, associées à divers pathogènes. Ces méthodes révèlent la présence d'acides nucléiques, qu'il s'agisse d'ADN ou d'ARN, servant de marqueurs de contamination. Elles sont non seulement plus rapides, mais également plus sensibles et capables de détecter plusieurs pathogènes en une seule analyse.

Dans ce contexte, l'objectif assigné à notre travail théorique est de mettre en exergue la technologie des biopuces comme outils puissants permettant la détection rapide, précise et sensible des bactéries pathogènes, notamment dans le domaine agroalimentaire. Cette étape d'identification et de différenciation d'agents pathogènes reste une étape cruciale pour la mise en place de mesures de contrôle adéquates afin de garantir une meilleure prévention de la contamination des aliments.

Ce manuscrit s'articule sur quatre chapitres structurés comme suit :

- Le premier présente les dangers liés aux bactéries pathogènes d'origine alimentaire.
- Le deuxième décrit les différentes approches usuelles appliquées pour l'identification des bactéries pathogènes d'origine alimentaire et leurs limites qui ont ouvert la voie vers des technique moderne plus rapide.

- Le troisième présente la technologie des puces à ADN, ces applications et les avantages qu'elle offre dans la détection des bactéries pathogènes.
- Le quatrième s'intéresse à une synthèse de quelques résultats d'études publiées, portant sur l'application de la technique des puces à ADN pour l'identification des bactéries pathogènes d'origine alimentaire.

Chapitre 1

Principales bactéries pathogènes d'origine
alimentaire

1. Généralités

La présence de bactéries pathogènes dans les aliments peut entraîner des risques importants d'infections dangereuses pour la santé du consommateur. Ainsi, la sécurité alimentaire est un objectif essentiel pour tous les experts du domaine alimentaire, dans le but de réduire les risques de contamination, d'infection ou de maladies.

Le terme "toxi-infections alimentaires" (TIA) désigne les maladies causées par des agents biologiques entéropathogènes. Elles deviennent collectives (TIAC) lorsqu'au moins deux cas sont identifiés comme étant liés à la même source de contamination alimentaire et exige une déclaration obligatoire (DO) ce qui permet aux médecins inspecteurs de santé publique de mener une enquête épidémiologique afin d'identifier les aliments responsables ainsi que les facteurs favorisants, dans le but de mettre en place des mesures spécifiques visant à prévenir de nouvelles occurrences ou récurrences de toxi-infections alimentaires. Parmi les maladies soumises à déclaration obligatoire figurent le botulisme, la brucellose, le charbon, le choléra, la listériose, les fièvres typhoïde et paratyphoïde, l'hépatite A et autres (Delmas *et al.*, 2010).

Le pouvoir pathogène de ces bactéries peut être résumé en quatre principaux aspects fondamentaux. Il y a des espèces qui ont une capacité infectieuse (infection), d'autres qui ont une capacité toxigène qui libèrent des toxines dans l'aliment (intoxication), d'autres qui ont une nature mixte (toxoinfection) et d'autres qui agissent en transformant l'aliment en toxique, ce qui entraîne des intoxications (Dubois et Guillier, 2020).

2. Principales bactéries pathogènes d'origine alimentaire

De nombreux micro-organismes tels que les bactéries, les virus et les parasites peuvent se retrouver dans une variété d'aliments, dont la consommation peut entraîner des infections potentiellement mortelles. Parmi les bactéries les plus couramment associées aux maladies d'origine alimentaire, on compte des agents pathogènes tels que *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus*.

2.1. *Escherichia coli*

2.1.1. Définition et classification

En 1885, l'allemand Theodor Escherich a décrit la bactérie *Escherichia coli* après l'avoir isolée dans des selles de nourrissons. Par la suite, Castellani et Chambers lui donnent son nom actuel en 1919 (Grimont, 1987). Les cellules bactériennes se présentent sous la forme de petits bâtonnets (2 à 4 μ de longueur 0.4 à 0.6 μ de large) mobiles grâce à des flagelles

péritriches, Gram négatives, aéro-anaérobie facultatives, non sporulées. Elles peuvent se multiplier à des températures comprises entre 4 °C et 46 °C, avec un optimum de croissance à 37 °C et à un pH compris entre 4,6 et 9,5 (Edwards et Ewing, 1986).

L'espèce *Escherichia coli* fait partie de la famille des Enterobacteriaceae, l'ordre des Entérobactéries, l'embranchement des Protéobactéries. Cette bactérie réside abondamment dans le tube digestif de l'être humain et des animaux à sang chaud (Pandey *et al.*, 1999).

Escherichia coli est l'un des indicateurs les plus recherchés de contamination fécale. Sa présence permet de déterminer si l'aliment est contaminé par des bactéries pathogènes d'origine digestive. La plupart des souches d'*E. coli* sont commensales, mais certaines d'entre elles sont liées à des maladies intestinales ou extra-intestinales (Leber et Burnham, 2023).

Plusieurs pathovars intestinaux ont été identifiés en fonction des éléments de pathogénicité et des symptômes cliniques qui les accompagnent (Figure 1). Parmi ces pathotypes, on trouve les *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC), qui sont des souches pathogènes de la bactérie *E. coli* présentes dans l'intestin. Ces bactéries sont également appelées « VTEC » (Verotoxin-Producing *E. coli*) ou « STEC » (Shiga-toxin-Producing *E. coli*). Elles produisent une shigatoxine qui affecte directement les cellules des muqueuses et les cellules endothéliales vasculaires dans la paroi de l'intestin grêle. Elles ont des effets toxiques sur les autres endothéliums vasculaires lorsqu'elles sont absorbées, ce qui peut entraîner des maladies graves (Ghafir et Daube, 2007 ; Bush et Vazquez, 2022).

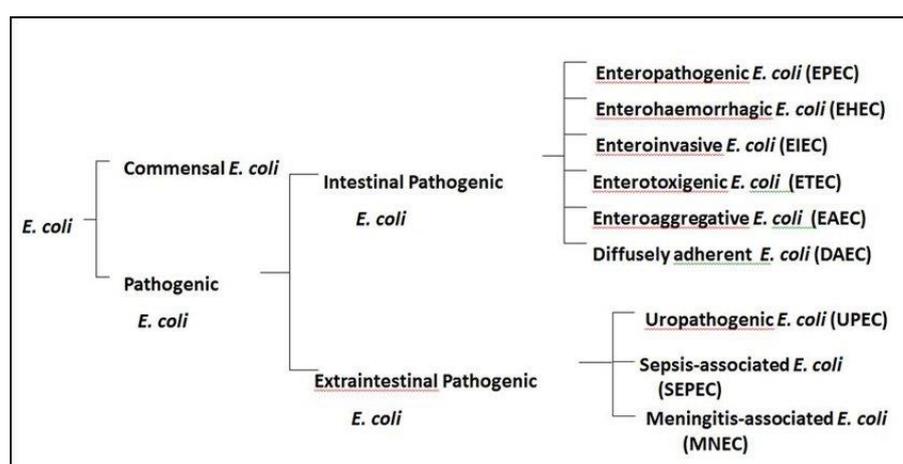


Figure 1 . Classification d'*Escherichia coli* en trois groupes principaux : commensal, pathogène intestinal et pathogène extra-intestinal

2.1.2. Pathologies liées à EHEC

La consommation d'aliments contaminés par les EHEC peut entraîner une diarrhée qui se transforme, dans 90 % des cas, en colite hémorragique (CH), caractérisée par des crampes abdominales et une diarrhée initialement aqueuse, puis sanglante, chez un patient apyrétique ou subfébrile. Ces colites peuvent entraîner des complications, telles que le syndrome hémolytique et urémique (SHU), qui se manifeste par une atteinte rénale et caractérisée par une anémie hémolytique microangiopathique avec fièvre. D'autre part, le purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT) est une autre maladie associée, se manifestant par une atteinte cérébrale et caractérisée par la formation de caillots sanguins anormaux dans les petits vaisseaux sanguins. Les conséquences de ces affections peuvent être mortelles (Figure 2) (Adingra *et al.*, 2011 ; Branchu, 2012).

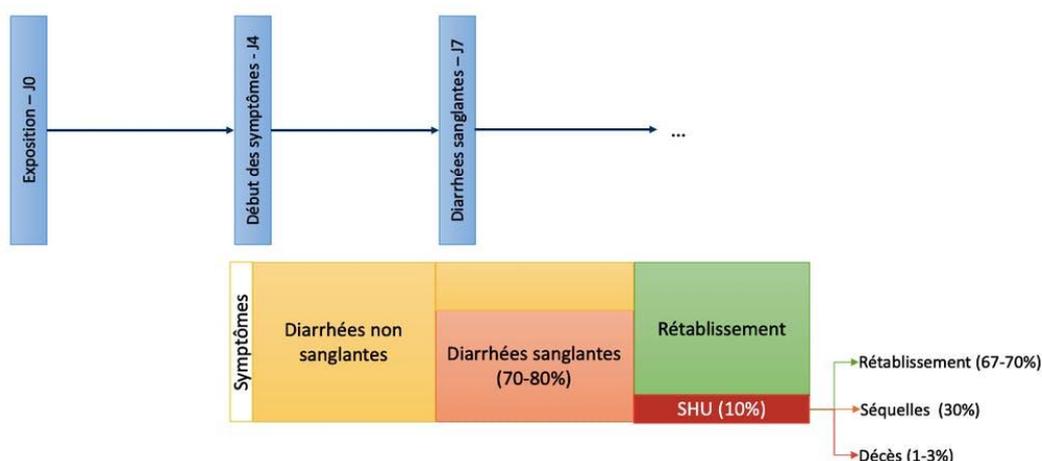


Figure 2. Caractéristiques des infections aux EHEC : chronologie d'apparition des symptômes et leurs possibles degrés de gravité (Kooh, 2022).

2.1.3. Épidémiologie humaine et modes de transmission des EHEC

Les infections sporadiques ou épidémies dues aux EHEC ont été rapportées dans le monde entier et affecte toutes les tranches d'âge, mais les groupes ayant une probabilité plus élevée que la moyenne de développer des symptômes ou des formes graves de la maladie sont les enfants de moins de 15 ans (surtout en dessous de 3 ans) et les personnes âgées. Cette infection est présente tout au long de l'année, mais s'intensifie en été et est plus courante dans les pays à climat tempéré (Raynaud *et al.*, 2006).

Les infections liées aux EHEC sont généralement causées par le sérotype O157 :H7 qui est principalement transmis à l'homme par la consommation ou la manipulation d'aliments contaminés tels que la viande crue ou mal cuite (le plus souvent), les produits laitiers crus non pasteurisés, les légumes crus et les graines germées, les produits d'origine végétale non pasteurisés (jus) et l'eau de boisson. La transmission est facilitée par une dose infectieuse faible, de moins de 100 bactéries (Solomon *et al.*, 2002).

D'autres sérogroupes tels que O26, O103, O111, O121, O145, O15 peuvent également être responsables de diverses manifestations cliniques : colite hémorragique, diarrhée non sanglante, syndrome hémolytique et urémique (SHU) chez les enfants ou purpura thrombocytopénique thrombotique (PTT) chez les adultes. Il est donc essentiel de diagnostiquer et de déclarer les infections à EHEC afin de détecter rapidement les épidémies et de mettre en place des mesures appropriées (Brisabois *et al.*, 2004).

2.2. *Listeria monocytogenes*

2.2.1. Définition et classification

Listeria monocytogenes est une bactérie ubiquiste, présente dans différents milieux tels que le sol, l'eau et les végétaux, pathogène pour l'Homme et les animaux. *L.monocytogenes* est une bactérie à Gram positif, en forme de bâtonnet régulier, ni sporulée ni capsulée, mobile à 20-25°C grâce à ses flagelles et immobile à 37°C (Figure 3). Elle est aéro-anaérobie facultative, catalase positive, oxydase négative, fermente de nombreux glucides. Cette bactérie présente une grande variabilité sérologique avec 13 sérotypes, dont trois responsables de 96% des cas de listériose humaine (Seeliger et Jones, 1987).

Sur le plan taxonomique, *L. monocytogenes* appartient au domaine Bacteria, au phylum Firmicutes, à la classe Bacilli, à l'ordre Bacillales, à la famille Listeriaceae, au genre *Listeria*, et à l'espèce *monocytogenes* (Cottin *et al.*, 1990).



Figure 3. Observation au microscope électronique de *Listeria monocytogenes*, 41 250X (White, 2002).

2.2.2. Pathologies liées à *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes est responsable de la maladie listériose. C'est une maladie infectieuse grave, qui affecte principalement les femmes enceintes, les nouveau-nés, et les personnes âgées ainsi que les personnes immunodéprimées (Foulhoux, 1994).

Ces symptômes incluent fièvre, frissons, douleurs musculaires, nausées, vomissements et diarrhée. Dans les cas les plus graves, la listériose peut entraîner des complications graves, telles que la bactériémie (infections du sang), la méningite (infection des membranes protectrices entourant le cerveau), la cérébrité (infection de cerveau) (Montenon, 2024).

2.2.3. Épidémiologie humaine et modes de transmission

La listériose humaine est essentiellement déterminée dans les pays industrialisés. *L. monocytogenes* a la capacité de coloniser des environnements humides (matériels, locaux, ... etc.) ce qui favorise son implantation progressive dans les usines alimentaires. De plus, cette bactérie peut se multiplier à basse température. Les aliments responsables de la transmission de la listériose peuvent être contaminés soit lors de la production, soit en cours de distribution (Tabi, 2014). En Algérie, les premiers cas humains de listériose ont été signalés en 1967, moins de 10 cas ont été déclarés par la suite. Depuis 1998, l'Algérie a imposé la déclaration obligatoire de la listériose (Hamdi *et al.*, 2007).

La bactérie est principalement transmise par voie alimentaire, représentant 99 % des cas. Les aliments contaminés, tels que les fromages ou les charcuteries, sont les principaux vecteurs de transmission (Aureli *et al.*, 2000). La contamination croisée peut également se produire lors de la préparation, de la manipulation ou du stockage des aliments qui peut favoriser la multiplication de *Listeria monocytogenes* (Ricci *et al.*, 2018). De plus la transmission directe de la mère à l'enfant, appelée transmission materno-fœtale, peut se produire *in utero* par passage transplacentaire des bactéries ou lors de l'accouchement par passage dans les voies génitales contaminées (Mead *et al.*, 1999).

2.3. *Salmonella enterica*

2.3.1. Définition et classification

Salmonella enterica, isolée pour la première fois en 1884 par le vétérinaire américain Daniel Salmon, est l'un des pathogènes bactériens d'origine alimentaire les plus fréquents chez l'homme (Chong *et al.*, 2021). Elle appartient au domaine des Bacteria, la classe des

Gammaproteobacteria, l'ordre *des* Enterobacteriales, la famille des Enterobacteriaceae et du genre *Salmonella*, avec une espèce spécifique, *Salmonella enterica* (Knodler et Elfenbein, 2019).. Cette bactérie pathogène asporulée à Gram négatif présente une forme bacillaire et une structure cellulaire typique des bactéries de ce type, avec une double membrane lipidique et une fine couche de peptidoglycane. Elle est mobile dans son environnement grâce à une ciliature péritriche (Giannella *et al.*, 1996).

Les salmonelles se distinguent par leur caractère oxydase négatif, leur réaction positive pour la réduction du nitrate, elles sont des bactéries aéro-anaérobies facultatives qui fermentent le glucose (Bourgeois, 1996). Ce genre comprend plusieurs espèces ainsi que de nombreux sérotypes différents (Figure 4), chacun caractérisé par des variations antigéniques dans ses structures de surface. L'antigène flagellaire (H), l'antigène oligosaccharidique (O) et l'antigène polysaccharidique (Vi) jouent un rôle essentiel dans la classification des sérotypes de *Salmonella* (Bernard et Wormser, 2006)

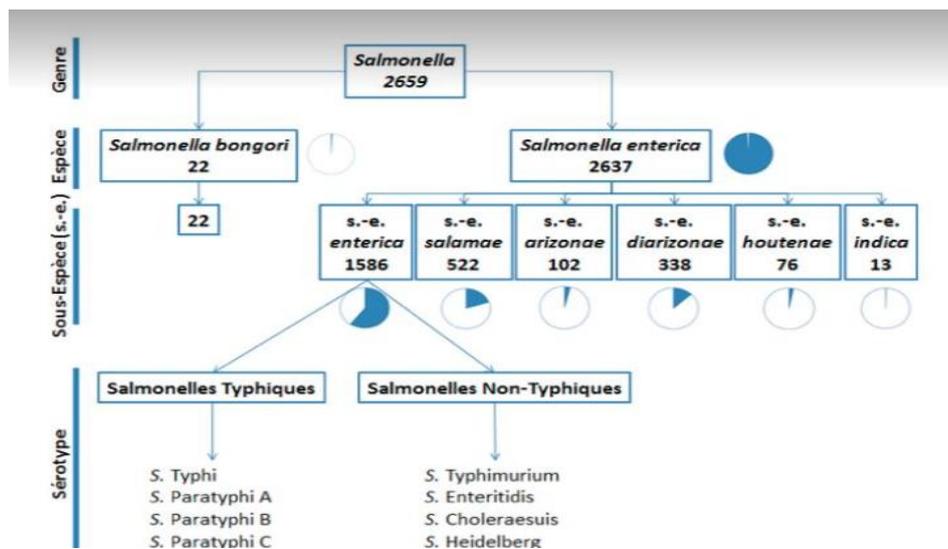


Figure 4. Classification de *Salmonella* (Dyan, 2022).

2.3.2. Pathologies liées à *Salmonella enterica*

Au cœur des préoccupations sanitaires mondiales se trouvent les *Salmonella enterica*, de redoutables bactéries responsables d'un large éventail de maladies d'origine alimentaire : la gastro-entérite, la fièvre entérique et bactériémie sont les plus courantes chez les enfants de

moins de 5 ans, chez les adultes de 20 à 30 ans et chez les patients de 70 ans et plus (Ray et Ryan, 2004).

- Gastro-entérite : connue également sous le nom de salmonellose est une intoxication alimentaire caractérisée par des symptômes tels que la diarrhée, les nausées, les vomissements, les crampes abdominales et parfois la fièvre allant jusqu'à 39 °C.
- Fièvre entérique (Fièvre typhoïde) : une infection systémique plus grave causée par la souche *Salmonella enterica* serovar Typhi, caractérisée par une fièvre élevée, des maux de tête, des douleurs abdominales et une éruption cutanée.
- Bactériémie : veut dire la présence de *Salmonella* dans le sang, qui peut entraîner des infections généralisées et potentiellement mortelles, en particulier chez les personnes immunodéprimées.

2.3.3. Epidémiologie humaine et modes de transmission

Les infections à *Salmonella enterica* surviennent partout dans le monde. Cette bactérie se transmet par ingestion d'aliments tels que la viande, la volaille, les œufs et les produits laitiers, d'eau contaminés ou par contact direct avec des individus ou des animaux infectés. Elles représentent l'une des principales raisons de souffrance et du décès de nombreuses personnes à l'échelle mondiale (Knodler et Elfenbein, 2019).

Dans le monde, environ 1,3 milliard de cas de salmonellose non typhique sont enregistrés chaque année touchant couramment les pays industrialisés (Figure 8), tandis que la fièvre entérique affecte principalement les pays en développement (en Asie en particulier). Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, la fièvre typhoïde est responsable de 17 millions des cas et de plus de 500 000 décès chaque année. Le pic de la maladie se situe en été et à l'automne et touche principalement les enfants (Chimalizeni *et al.*, 2009).

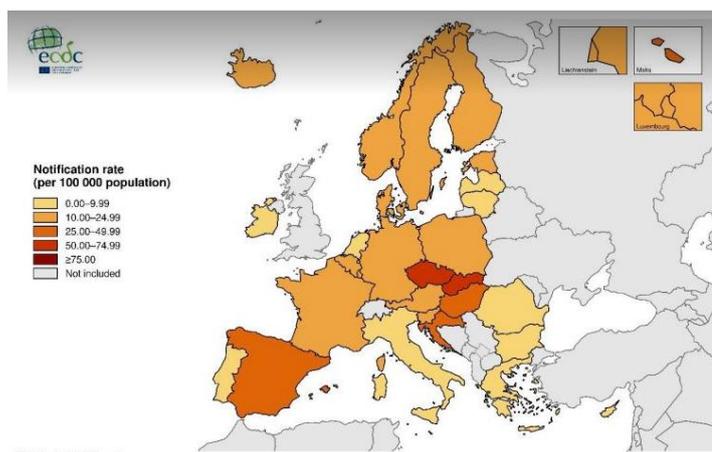


Figure 5. Nombre de cas confirmés de salmonellose pour 100 000 habitants par pays dans l'Europe (Centre européen de prévention et de contrôle des maladies, 2022).

2.4. *Staphylococcus aureus*

2.4.1. Définition et classification

Staphylococcus aureus a été observé par Robert Koch, puis Louis Pasteur et ses collaborateurs en 1880 sous la forme d'un "amas de grains". La même année, ce microorganisme fut isolé pour la première fois par le chirurgien écossais Sir Alexander Ogston (1844-1929) à partir de pus de 88 abcès humains (Kénanian, 2018), cette bactérie est la souche de staphylocoque la plus fréquemment rencontrée en pathologie humaine responsable d'intoxications alimentaires (Orenstein, 2013). *S.aureus* est une coque d'un diamètre de 0,5 à 1 μm , Gram positif, immobile, non sporulé, aéro-anaérobie facultative, et possédant une catalase et une coagulase. *Staphylococcus aureus* est appelé "doré" en raison de l'apparence dorée ou jaune de ses colonies lorsqu'elles sont cultivées sur un milieu de culture en laboratoire, cette coloration est due à la production de pigments caroténoïdes. Le terme "aureus" vient du latin qui signifie "or" (Liu *et al.*, 2005).

Sur le plan taxonomique, *Staphylococcus aureus* est classé dans le domaine Bacteria, le phylum Firmicutes, la classe Bacilli et l'ordre Bacillales, la famille Staphylococcaceae, au genre Staphylococcus et à l'espèce aureus (Yves et Michel, 2009).

2.4.2. Pathologies liées aux *Staphylococcus aureus*

Certaines souches de *S.aureus* produisent des toxines qui peuvent causer une intoxication alimentaire (pas une infection). La majorité des individus développent des symptômes de maladie dans les 30 minutes à 6 heures suivant l'ingestion d'un aliment

contenant la toxine (Gotfried, 2023). Les aliments contaminés par *S.aureus* contiennent des entérotoxines staphylococciques (SE) qui sont produites par certaines souches de *S. aureus*. Ces toxines sont résistantes à la chaleur et aux enzymes digestives, ce qui maintient leur activité toxique même après la cuisson des aliments (Loir *et al.*, 2003).

L'intoxication staphylococcique alimentaire est une forme de gastro-entérite qui se caractérise par des manifestations soudaines et violentes telles que des nausées, des crampes, des douleurs abdominales, des vomissements et une diarrhée (Gotfried, 2023).

2.4.3. Épidémiologie humaine et modes de transmission

Staphylococcus aureus est une bactérie très répandue, cette bactérie a été découverte dans de nombreux pays d'Europe (Figure 6) (Suisse, Suède, Royaume-Uni, Pays-Bas), d'Asie (Japon, Chine, Singapour, Hong-Kong), au Brésil et en Uruguay (Tristan *et al.*, 2007).

Les infections alimentaires à *Staphylococcus aureus* peuvent survenir tout au long de l'année et les personnes les plus susceptibles de développer ces infections sont celles dont le système immunitaire est affaibli (Les patients sous hémodialyse, les utilisateurs de drogues injectables, les patients diabétiques...), les jeunes enfants, les personnes âgées et les femmes enceintes (Del Río *et al.*, 2009).

La transmission des staphylocoques peut se faire de deux manières principales : par transmission directe d'homme à homme via le contact manuel et par transmission indirecte via le matériel ou l'environnement contaminé. Cette bactérie peut contaminer les aliments de diverses manières, notamment lors d'une manipulation ou d'une préparation incorrecte. Par exemple, les aliments peuvent être contaminés lorsque des personnes porteuses de la bactérie sur leur peau ne se lavent pas correctement les mains avant de manipuler les aliments. Si ces aliments sont ensuite laissés à température ambiante ou insuffisamment cuits, les bactéries peuvent se multiplier rapidement et produire des toxines. Les aliments les plus souvent associés à ces contaminations sont ceux à base de crème (exemple, les pâtisseries), le lait, la viande et le poisson (Gotfried, 2023).

Chapitre 2

Méthodes traditionnelles d'identification des
bactéries pathogènes d'origine alimentaire

1. Introduction

Le contrôle des bactéries pathogènes présentes dans les aliments est une question cruciale de sécurité alimentaire. La gestion de la qualité microbiologique implique différentes étapes permettant de vérifier la conformité de l'hygiène des aliments et vise à évaluer les niveaux de contamination par des micro-organismes observés lors des processus de production jusqu'aux produits de consommation finaux passant par le contrôle des matières premières brutes, l'environnement de production (air, matériel,...) et l'identification des principaux points critiques du système de production /distribution, généralement en appliquant une méthode HACCP . Ces dernières sont la clé de la prévention et de l'identification des problèmes liés à la santé et la sécurité sanitaire du consommateur (Murat, 2024).

2. Critères de la qualité microbiologique des aliments

L'objectif de l'analyse microbiologique est de contrôler la qualité d'un aliment. Plusieurs normes et critères définissent la qualité hygiénique et commerciale courante (Annexe 1). Selon les critères microbiologiques, il s'agit de garantir l'absence de germes pathogènes ou de leurs toxines. Les résultats des analyses microbiologiques sont interprétés en fonction de la méthode employée afin de se conformer à la réglementation en vigueur. Deux méthodes, appelées "plans", sont utilisées : le plan à 2 classes et le plan à 3 classes

- Plan à deux classes : qualifier simplement chaque unité d'échantillonnage comme acceptable ou inacceptable. Le résultat est satisfaisant lorsque la valeur observée est inférieure ou égale à m , tandis que la qualité est insatisfaisante lorsque la valeur observée dépasse m (Figure 6).

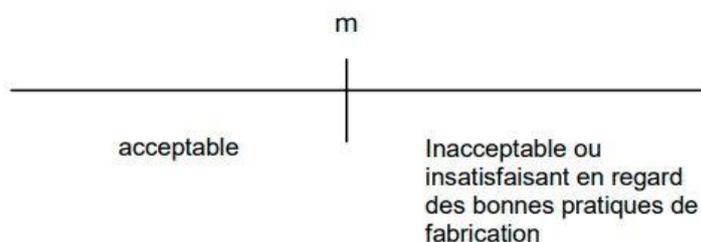


Figure 6. Plan d'échantillonnage à deux classes (www.securite-alimentaire.public.lu)

- Plan à trois classes : Un résultat N est satisfaisant (acceptable) si $N < m$. Un résultat N est non satisfaisant si $N > M$. un résultat N est jugée comme étant de qualité médiocre s'il se situe entre m et M (Figure 7).

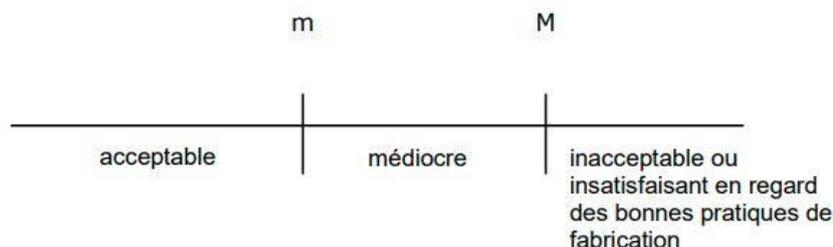


Figure 7. Plan d'échantillonnage à trois classes (www.securite-alimentaire.public.lu)

3. Méthodes de contrôle microbiologique des aliments

Les méthodes traditionnelles de détection et de dénombrement des bactéries à partir des matrices alimentaires sont basées sur la culture bactérienne dans un milieu spécifique à chaque germe, la composition du milieu et la température d'incubation permettent de cultiver de manière sélective une population bactérienne (Vidic et Auger, 2019). Les laboratoires de microbiologie alimentaire bénéficient de l'accès à un large éventail de méthodes d'essai normalisées et validées. Des organismes internationaux comme l'ISO (Organisation internationale de normalisation), des organismes nationaux tels que la FDA (Food and Drug Association des États-Unis d'Amérique), ainsi que l'AFNOR (Association française de normalisation) publient des méthodes dites standardisées, c'est-à-dire des techniques de référence reconnues à l'échelle nationale ou internationale. Ces techniques sont régulièrement mises à jour pour suivre les avancées scientifiques et technologiques, assurant ainsi des méthodes de détection et de quantification toujours plus précises et efficaces pour garantir la sécurité alimentaire et la qualité des produits (Tableau 1)(Ghafir, 2007).

Tableau 1. Exemple des méthodes de recherche et de dénombrement des bactéries

Germe	Matrice	Méthode	Intitulé
Dénombrement des germes totaux aérobies à 30°C	Toutes denrées	ISO 4833-2	Méthode horizontale pour le dénombrement des micro-organismes
Dénombrement des coliformes totaux	Toutes denrées	ISO 4832	Technique horizontale pour le dénombrement des coliformes -- Méthode par comptage des colonies
Recherche d' <i>Escherichia coli</i> O157	Produits carnés, produits laitiers, fruits et légumes, aliments composites	AFNOR BRD 07/14-09/07	Rapid'E coli O157:H7
Recherche de <i>Salmonella spp</i>	Toutes denrées + échantillons de l'environnement de manutention des aliments	ISO 6579-1	Méthode horizontale pour la recherche, le dénombrement et le sérotypage des <i>Salmonella</i>
Recherche de <i>Listeria spp</i>	toutes denrées	AFNOR BIO 12/02-06/94	VIDAS Listeria

4. Détection des bactéries pathogènes d'origine alimentaire

Il existe de nombreux types d'analyses en microbiologie alimentaire dites « classiques », deux approches principales sont utilisées pour détecter les bactéries pathogènes, sont : les analyses qualitatives et quantitatives. Cette dernière consiste à dénombrer les germes présents dans un produit alimentaire, fournissant ainsi une estimation précise de la charge microbienne. Ces résultats, exprimée en unité de masse (UFC) ou de volume d'échantillon (UFT) permet d'évaluer si les niveaux de contamination respectent les critères établis (Figure 8) (Guiraud, 1998).

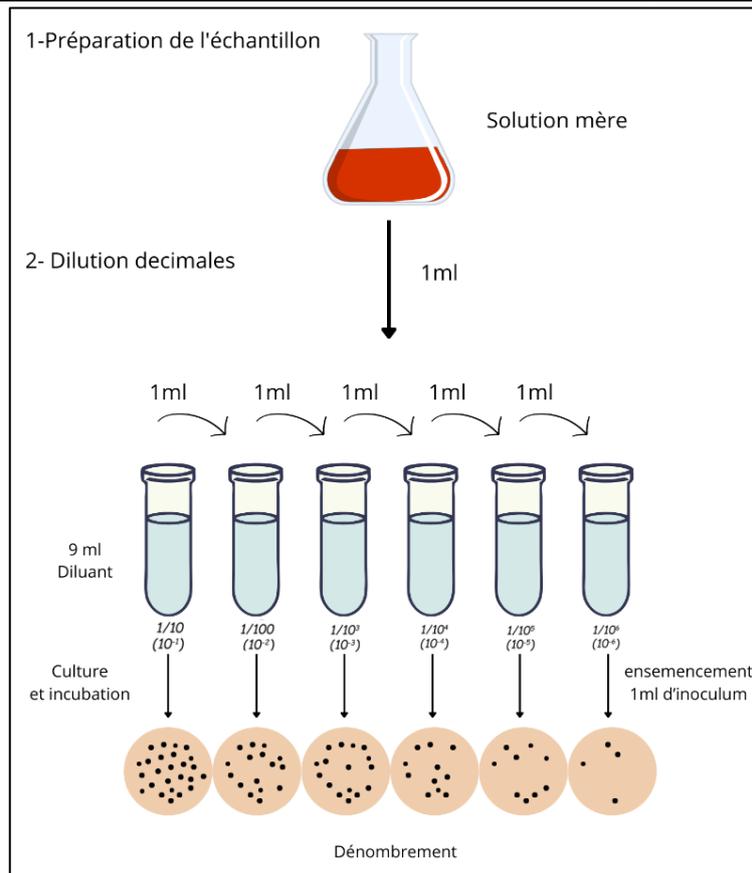


Figure 8. Protocole expérimental de l'analyse microbiologique quantitative (dénombrement sur milieu solide).

En analyse qualitative, l'objectif est souvent de déterminer la présence ou l'absence de certains germes, où la seule présence d'un germe tel que les salmonelles, suffit à qualifier l'échantillon de non acceptable.

L'analyse qualitative est réalisée par culture sur milieu sélectif après enrichissement, certaines bactéries comme *salmonella enteria* (Figure 9), *listeria monocytogenes* (Annexe 2), *Escherichia coli O157* et d'autres pathogènes nécessitent d'abord un pré-enrichissement, où les cellules bactériennes sont revivifiées pour faciliter leur croissance ultérieure dans des milieux d'enrichissement appropriés la bactérie. Ces analyses servent à identifier les différentes espèces de micro-organismes présents dans l'aliment, où après la préparation de la suspension mère. Le microorganisme est isolé par des ensemencements en surface dans les milieux de culture spécifiques. Après 24h d'incubation, les colonies qui apparaissent sur la surface de milieu de culture font l'objet d'une identification pour la confirmation par des examens macroscopiques, microscopiques et des tests biochimiques (Guiraud, 1998).

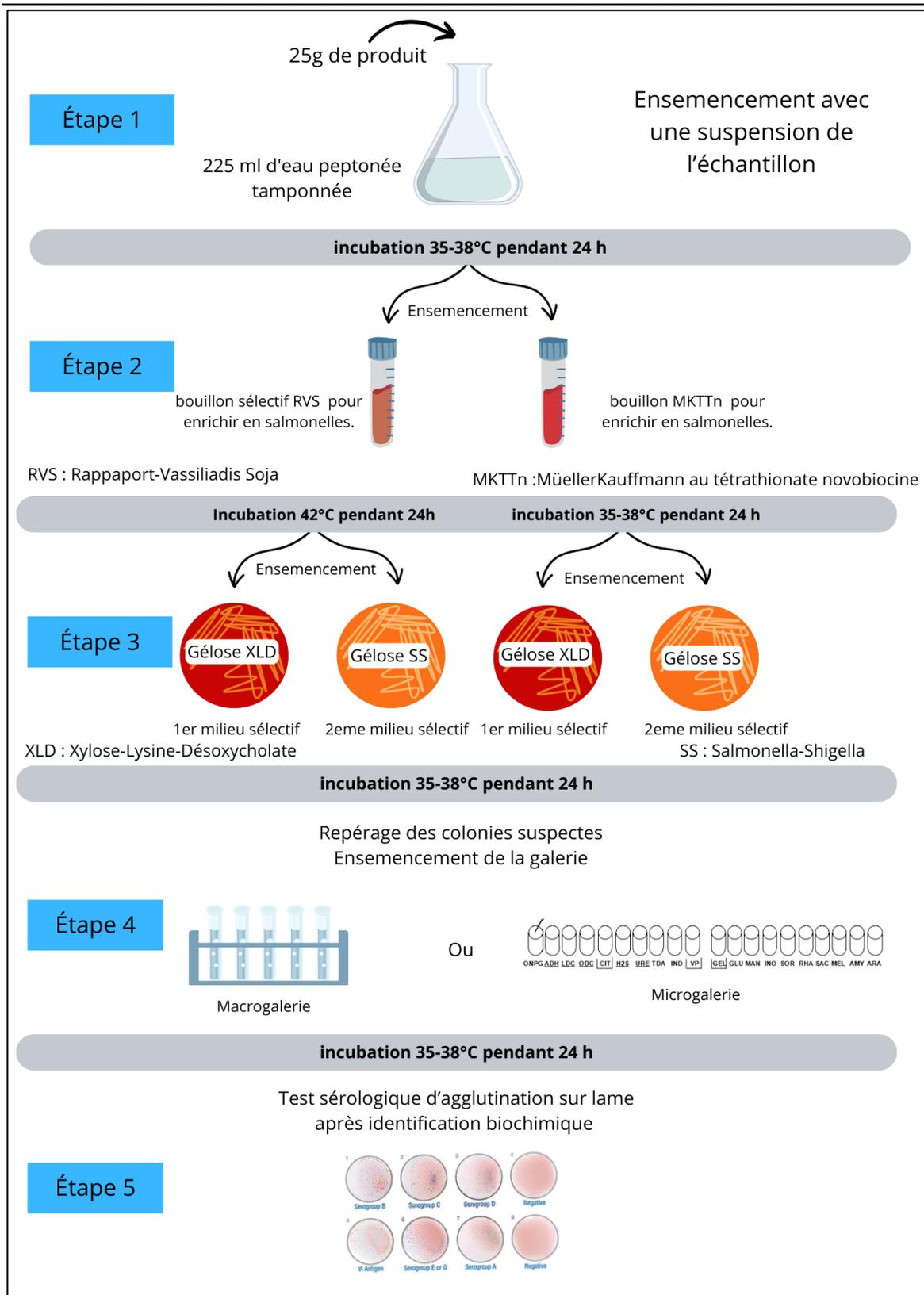


Figure 9. Plan d'étude de *Salmonella* selon la norme EN/ISO 6579

5. Limite des méthodes de détection et de dénombrement traditionnelles

Les méthodes microbiologiques traditionnelles basées sur la culture bactérienne demandent à la fois beaucoup de temps de travail et de matériels (un grand nombre de boîtes de Pétri, de supports, de matières plastiques...etc.). Le procédé d'analyse est long passe par une étape de culture sur milieu sélectif qui peut durer de 24 à 48 heures, voire plus, et qui peut être précédée par des étapes de pré-enrichissement et d'enrichissement de 24 heures ou plus durant lesquelles les bactéries sont revivifiées et multipliées, par la suite, il est possible d'utiliser des tests biochimiques supplémentaires afin d'identifier et de confirmer de manière précise l'espèce bactérienne. Par exemple, la détection de *L. monocytogenes* selon la méthode officielle ISO 11290 implique deux étapes d'enrichissement dans un milieu avant l'étalement bactérien sur la gélose sélective, puis une confirmation par des tests biochimiques et/ou moléculaires (Vidic et Auger, 2019).

Les méthodes traditionnelles d'analyse microbiologique, qui nécessitent des délais d'incubation longs (allant de 48 heures à 5 jours), ne permettent que des contrôles *a posteriori* de la qualité des aliments. En raison de ces délais de réponse analytique, il est souvent impossible de répondre en temps utile aux exigences de consommation et de distribution de ces produits alimentaire. Il est donc essentiel de disposer de techniques modernes, rapides et fiables qui tiennent compte des avancées technologiques (Figure 10)(Panisset, 2003).

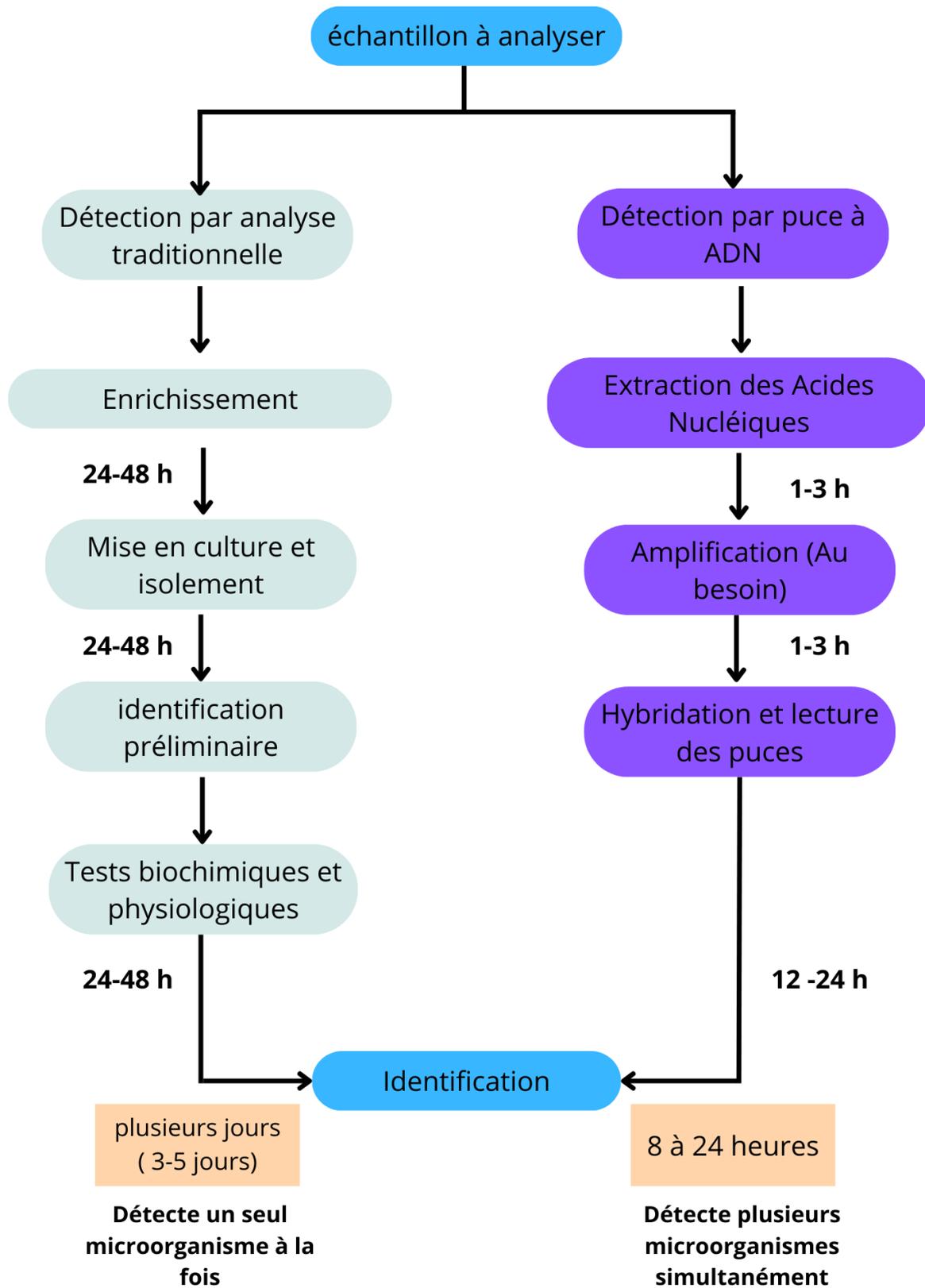


Figure 10. Comparaison générale de l'estimation du temps nécessaire pour la détection des bactéries pathogènes : Approche traditionnelle vs. Puce à ADN

Chapitre 03

Technologie des puces à ADN

1. Introduction aux puces à ADN

1.1. Définition des puces à ADN

Une puce à ADN, également connue sous le nom de biopuce ou puce à gène, ou les termes anglais « *DNA chip, DNA-microarray, biochip* », est un dispositif miniaturisé constitué de milliers à des millions de fragments d'ADN (ou d'ARN) immobilisés sur une surface solide, tels que du verre ou du silicium, disposés dans un arrangement ordonné. Ces fragments d'ADN, appelés sondes, représentent différents gènes ou régions génomiques et permettent de détecter simultanément la présence, l'expression ou les variations de ces séquences dans un échantillon biologique. L'analyse se fait généralement par hybridation des sondes avec des acides nucléiques marqués provenant de l'échantillon, suivie de la détection des signaux de liaison (Schena *et al.*, 1995).

1.2. Historique

Depuis les années 1960, la capacité de certaines molécules comme les anticorps, les enzymes ou les acides nucléiques, à se lier spécifiquement les unes aux autres a été utilisée à des fins diagnostiques, comme dans le diagnostic de certaines maladies. L'idée d'appliquer ce principe à l'ADN a été proposée dans les années 1980 ce qui a permis à ce dernier de reconnaître une séquence spécifique d'oligonucléotides complémentaires (Ekins et Chu, 1999).

Les techniques de Southern et Northern blot ont été décrites comme les premières méthodes permettant la détection d'ADN par hybridation sur un support solide, suite aux observations de Edward Southern en 1975 concernant l'hybridation entre des séquences complémentaires d'ADN, cette approche a mis en place les bases du concept de puce à ADN.

La première puce ADN a été développée en 1989 par Stephen Fodor, chercheur dans le laboratoire de *Affymax Research Institute* à Palo Alto en Californie. Fodor a mis au point une technique révolutionnaire pour fixer des milliers de demi-brins d'ADN en tant que sondes moléculaires sur un support de quelques centimètres carrés. Cette innovation a permis de reconnaître les demi-brins complémentaires présents dans un échantillon et venus s'y appaier (Toullec, 2022).

En 1991, la société Affymetrix (une division de Affymax) a développé industriellement le procédé de Stephen Fodor, marquant ainsi le début d'une révolution dans le domaine de la génétique et de la biotechnologie. Cette innovation a permis aux chercheurs d'analyser des

milliers de séquences d'ADN simultanément, ouvrant la voie à des avancées majeures dans la compréhension du génome humain et des organismes vivants (Leroy, 2009).

Les puces à ADN ont été initialement développées sur de grandes membranes poreuses en nylon ou des macroarrays. La miniaturisation, facilitée par les avancées de la robotique, a ensuite donné naissance aux microarrays qui sont des puces avec des surfaces plus petites, comme une lame de microscope (Meur, 2005).

Ainsi, l'évolution des techniques de détection et d'analyse des acides nucléiques, combinée aux progrès technologiques dans la fabrication des puces à ADN, a ouvert la voie à une compréhension approfondie de l'expression génique et des processus biologiques complexes.

1.3. Principe des puces à ADN

Le fonctionnement des puces à ADN repose sur le principe de l'hybridation moléculaire par complémentarité des bases (G-C et A-T), où les acides nucléiques s'hybrident sélectivement avec leurs brins complémentaires (Ducray *et al.*, 2007). Ceci permettra l'identification des acides nucléiques de l'échantillon appelés « cibles » (*target*) marqué par un radioélément ou par une molécule fluorescente, avec les « sondes » (*probe*) qui sont des fragments nucléiques (des séquences d'ADN ou d'ARN) déposés sur un support solide (Figure 11). Cette réaction particulière permet de repérer et de reconnaître la ou les séquence(s) présentes dans l'échantillon (Berthet, 2013).

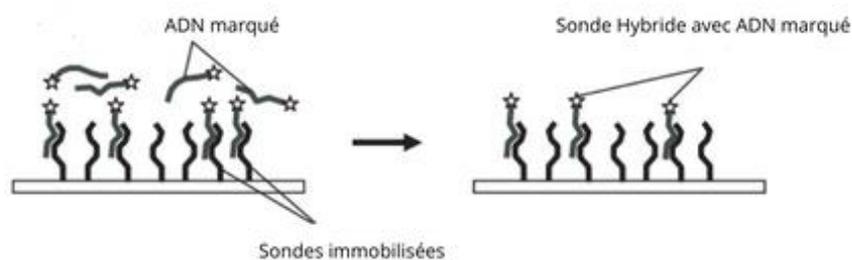


Figure 11. Principe des puces à ADN (Li et Liu, 2003).

1.4. Différents types de puces à ADN

Les types de puces à ADN sont distingués en fonction de plusieurs caractéristiques, notamment la densité des spots, le mode de fabrication, ainsi que la nature des fragments fixés à la surface (Sondes).

1.4.1. Type de puce en fonction de la méthode de fabrication

Les deux technologies dominantes sont : les puces dites « spottées » par un dépôt robotisé des sondes, ou puces à oligonucléotides synthétisés *in situ*, ces puces sont produites en synthétisant directement des oligonucléotides sur la puce elle-même (Marc, 2005).

- Puce spottées: Dans ce type de puce, des oligonucléotides préalablement synthétisés par un synthétiseur automatique sont déposés ou "spottés" sur la surface de la puce (Figure 12). Ces fragments peuvent être des séquences spécifiques de gènes, des clones d'ADNc, des fragments d'ADN génomique, ou des produits de PCR amplifiés. Les puces dites spottées ou « *spotted microarrays* » sont souvent utilisées pour des applications personnalisées où les chercheurs peuvent imprimer leurs propres séquences d'intérêt sur la puce (Derisi *et al.*, 1996).

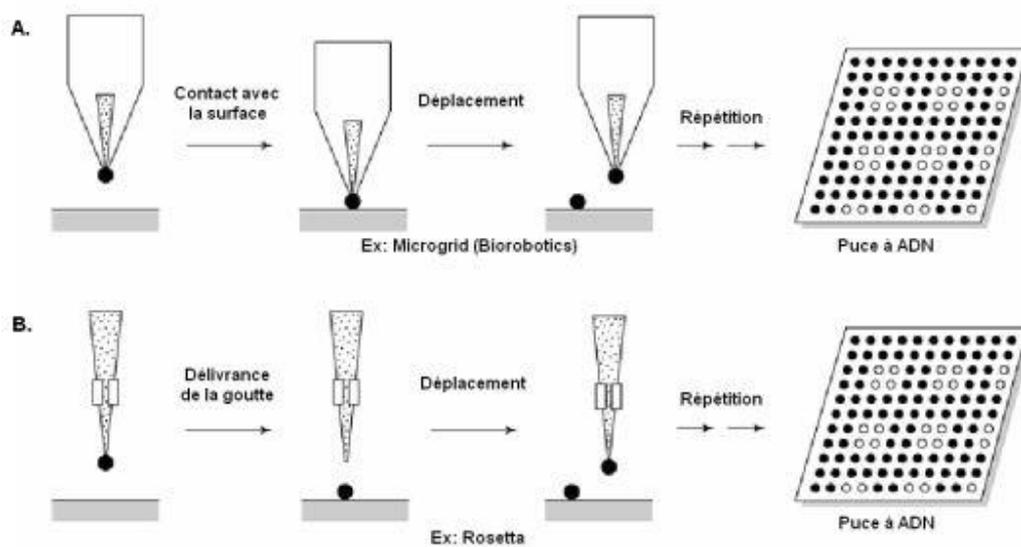


Figure 12. Les deux principes du transfert d'oligonucléotides sur un support solide (Fesseha et Tilahun, 2021).

A) Dispositif de transfert par touche d'une aiguille sur un support solide. B) Dispositif de type jet d'encre.

- Puces à ADN à oligonucléotides synthétiques ou 'Synthèse in situ' : Dans ce type de puce, des sondes d'ADN synthétiques courtes, appelées oligonucléotides, sont fabriquées directement sur la surface de la puce en utilisant la technique de photolithographie

(Figure 13). Ces oligonucléotides sont conçus pour être complémentaires à des séquences spécifiques d'ADN cible (Lipshutz *et al.*, 1999).

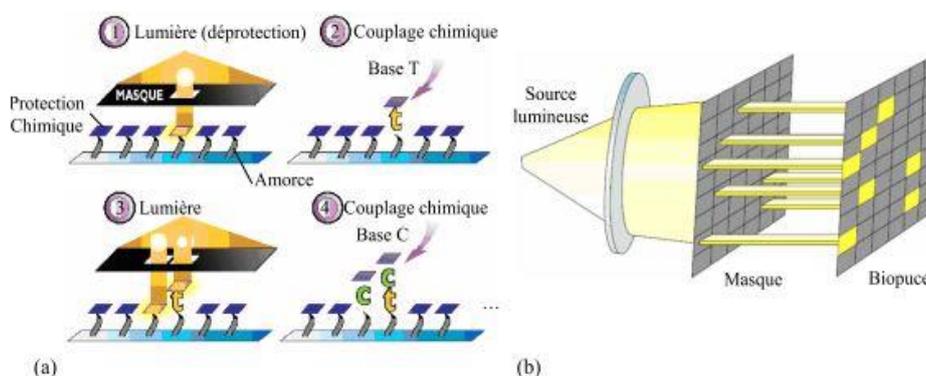


Figure 13. Synthèse *in situ* base par base des oligonucléotides par photolithographie (Lipshutz *et al.*, 1999).

1.4.2. Type de puce en fonction de la densité des spots

Selon la structure et la nature du support, on peut distinguer des puces à faible densité (centaines de dépôts), moyenne densité (milles de dépôts) et haute densité (dizaines de milliers de dépôts répartis). Les puces à ADN peuvent être classées en différentes catégories (Lagoda et Regad, 2000) :

- Les macroarrays : ont une densité de fragments d'ADN d'environ 25 spots/cm² et les dépôts se font sur une membrane en nylon,
- Les microarrays : la densité du dépôt est plus élevée, atteignant environ 1000 spots/cm² et se fait sur une lame en verre.

1.4.3. Type de puce en fonction de la nature des sondes

Les puces à ADN font appel à une variété de sondes spécifiquement conçues pour détecter et analyser les séquences génétiques cibles. Parmi les types de sondes les plus couramment utilisés, on trouve les sondes oligonucléotidiques, les sondes ADNc, les sondes ARN...etc., chacune d'entre elles possédant des caractéristiques spécifiques (Tableau 2) qui les rendent adaptés à diverses applications en biologie moléculaire et génomique.

- ADNc : Ont été les premières puces à être développées, qui fonctionnent avec des micros-points contenant des fragments d'ADNc synthétisé à partir d'ARNm par une réaction de transcription inverse sur un support en verre. Il est également possible d'utiliser de l'ADNc dans le but de couvrir la quasi-totalité du génome, soit environ

30000 gènes. Ces sondes sont extrêmement sensibles, mais elles ont une spécificité plus faible (Reymond, 2004).

- Oligonucléotides de synthèse : l'utilisation des oligonucleotides comme sondes est devenue populaire parce qu'ils ont généralement une meilleure spécificité que les ADNc et ont également la capacité de distinguer les polymorphismes de nucléotide unique (SNPs). Leur taille varie de 50 à 70 nucléotides (Beri-Dexheimer, 2005).

Tableau 2. Différences entre les puces à ADNc et les puces à oligonucléotides (Binod.G, 2013).

Caractéristique	ADNc	Oligonucléotide
Composition	ADN synthétisé à partir d'ARNm	Courtes séquences d'ADN simple brin ou d'ARN
Longueur	Typiquement longue (500-2000 nucléotides)	Typiquement court entre 25 et 70 nucléotides
Spécificité	Moins spécifique en raison d'un risque potentiel d'hybridation croisée	Très élevée, car conçue pour cibler des séquences spécifiques
Sensibilité	Plus sensible en raison de la longueur plus importante de la séquence	Moins sensible

2. Fabrication des puces à ADN

2.1. Conception des sondes

Deux types de sondes peuvent être utilisées pour les biopuces : les sondes ADN (produits *PCR*, ADNc et ADN génomiques), et les sondes oligonucléotidiques, qui peuvent être greffés ou synthétisés directement sur le support. Leur taille est conditionnée par la méthode de synthèse employée et par l'utilisation éventuelle de la puce ADN ou ARN. Toutes les sondes ont une séquence connue et une adresse spécifique sur le support (Baaj, 2008).

Le choix des séquences à utiliser pour les sondes est un point crucial dans le processus global des expériences de puces à ADN. D'une manière plus générale, on cherchera à éviter les séquences de faible complexité, sinon les sondes risquent de présenter une faible spécificité (un critère représentant la notion d'une reconnaissance unique entre une sonde et une cible) (Missaoui, 2009). Plus la complexité de la puce à ADN est élevée, plus elle est capable d'analyser un grand nombre de gènes (Tableau 3).

Tableau 3. Classification des puces à ADN selon leur complexité et applications associées (Bidan, 2003).

Degré de complexité	Nombre de plots d'hybridation	Application vise
Basse complexité	10-1 000	Diagnostic
Moyenne complexité	1 000-10 000	Etude de mutation, génotypage
Haute complexité	10 000-100 000	Séquençage des genes

Les séquences utilisées dans l'application traditionnelle des puces à ADN (étude de l'expression des gènes) sont les séquences codantes d'un gène, en anglais « *“Coding Dna Sequences (CDS)”* » (Figure 14). En réalité, elles sont complémentaires des séquences ADNc présentes dans le mélange cible et peuvent donc être sélectionnées comme des sondes (Rimour, 2006).

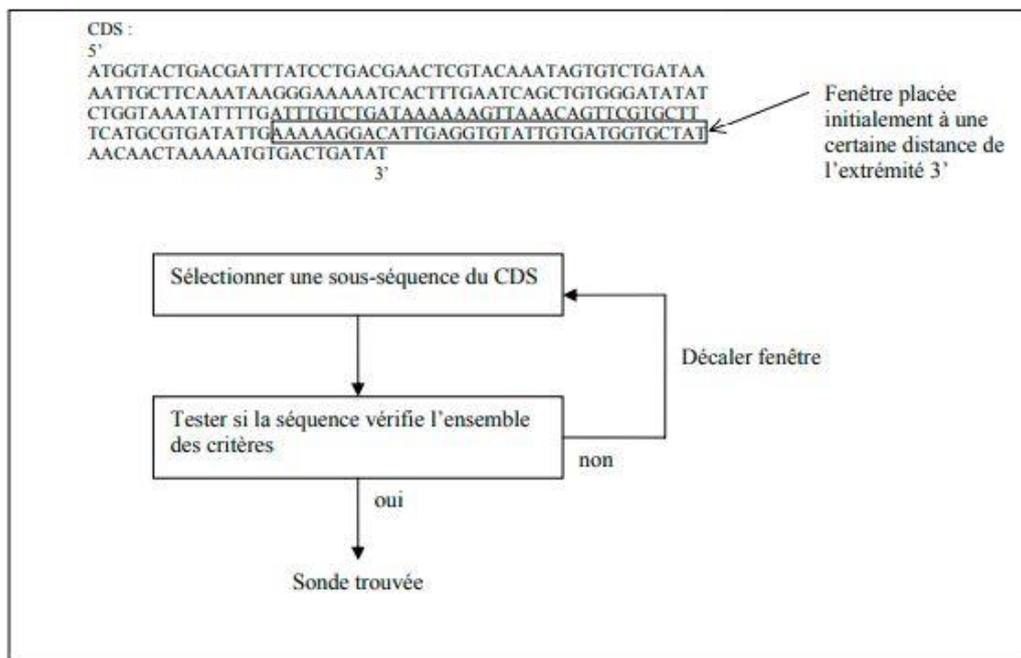


Figure 14. Algorithme de base pour la recherche d'oligonucléotides (Rimour, 2006)

2.1.1. Critères de sélection de sondes ADN

Les critères clés que l'oligonucléotide doit respecter sont : la spécificité, la sensibilité et l'uniformité (Dugat-Bony *et al.*, 2011).

- Spécificité de la séquence

L'unicité, également connue sous le nom de spécificité de l'oligonucléotide, signifie qu'une sonde spécifique s'hybride exclusivement avec sa séquence cible, et non avec d'autres

séquences présentes dans le mélange. On dira alors que la séquence de l'oligonucléotide est spécifique de sa cible.

On parlera d'hybridation croisée lorsqu'une séquence non-cible vient s'hybrider à une sonde oligonucléotidique, pour éviter ce problème une étude de Michael D. Kane, en 2000 sur la spécificité des oligonucléotides de 50 mers a défini deux conditions pour qu'une sonde soit spécifique :

- Les séquences cibles ne doivent pas présenter une similarité de séquence supérieure à 75-80% avec les séquences non cibles, en particulier sur une longueur de 50 bases.
- La région cible de 50 bases ne doit pas inclure une sous-séquence de plus de 15 bases consécutives strictement identiques avec d'autres séquences présentes dans le mélange d'hybridation (Kane *et al.*, 2000).

Tous les outils de la conception des sondes utilisent le logiciel BLAST « *basic local alignment search tool* » Cela facilite la recherche rapide dans des bases de données des séquences répertoriées présentant des zones de similarité avec la séquence d'entrée (Figure 15) (Liu, 2010).

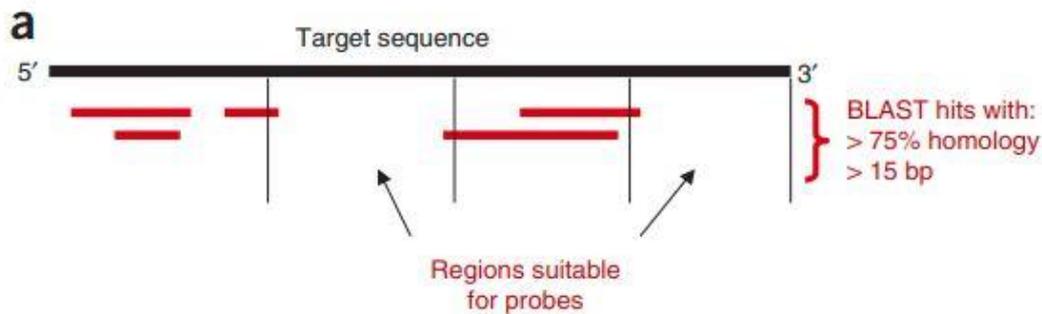


Figure 15. Utilisation du BLAST pour éviter les régions ayant une grande similitude avec d'autres transcrits (Wernersson, 2007).

- Sensibilité

C'est la capacité à détecter la présence de la cible même à faible concentration. Elle dépend étroitement de deux facteurs principaux : la longueur des oligonucléotides et leur concentration. Des études récentes ont révélé qu'une longueur accrue des oligonucléotides favorise une meilleure sensibilité (Relógio, 2002).

- Uniformité

La technologie de biopuce repose sur l'hybridation simultanée de plusieurs sondes dans les mêmes conditions (concentration de sel, température, etc.), il est important de s'assurer que les sondes sélectionnées ont des comportements thermodynamiques aussi uniformes que possible. La méthode la plus simple consiste à choisir des sondes avec des caractéristiques structurales homogènes comme la longueur de la sonde, la concentration en G + C, la température de fusion (T_m) (Dugat-Bony *et al.*, 2011).

2.1.2. Outils informatiques pour la sélection des sondes

Les principaux outils informatiques utilisés dans la sélection des sondes sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 4. Outils informatiques pour la sélection des sondes.

Logiciel	Description	URL	Référence
BLAST	Algorithme pour l'alignement des séquences, utilisé pour évaluer le risque de cross-hybridation des sondes.	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	(Johnson <i>et al.</i> , 2008).
OligoWiz 2.0	Outil permettant la sélection de sondes en intégrant des annotations de séquences et en évaluant plusieurs critères de qualité.	http://www.cbs.dtu.dk/service/s/OligoWiz/	(Wernersson et Nielsen, 2005).
OligoArray 2.1	Il utilise une approche thermodynamique pour calculer la spécificité des oligonucleotide	http://berry.engin.umich.edu/oligoarray2_1/	(Li <i>et al.</i> , 2005).
OligoCalc	Calculateur en ligne pour la détermination de la température de fusion (T _m) des sondes.	http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html	(Kibbe, 2007).

2.2. Les supports

La puce à ADN est constituée de deux éléments : un support solide réactif et des sondes fixées sur ce support. Les supports sur lesquels les sondes sont fixées peuvent être planes ou poreuses (percées de puits) composé de matériaux tels que :

- Le verre

Le verre est l'un des supports les plus traditionnellement utilisés pour la fabrication des puces à ADN, les avantages du verre sont nombreux. Ce matériau est solide, abordable, non polaire et stable et Il peut supporter de hautes températures (Situma *et al.*, 2006). Les sondes d'ADN sont fixées sur une surface en verre à l'aide de diverses techniques, telles que la synthèse *in situ* (Derisi *et al.*, 1996).

- Les polymères

Les polymères sont très utilisés pour la fabrication de biopuce. Simples à utiliser et ils conviennent à la production à faible coût. Les sondes d'ADN sont fixées sur une matrice polymère à l'aide de techniques de synthèse chimique. Elles peuvent avoir une densité de sondes plus faible et une stabilité à long terme moins élevée (Proudnikov *et al.*, 1998).

- Les membranes en nylon

Certaines puces à ADN sont fabriquées en fixant les sondes d'ADN sur des membranes poreuses, telles que des membranes en nylon ou en nitrocellulose. Elles sont souvent utilisées dans les applications de criblage de mutations et de diagnostic rapide (Bertucci *et al.*, 1999 ; Cao *et al.*, 2002).

- Le silicium

Les puces à ADN en silicium offrent une grande précision spatiale et une reproductibilité élevée, ce qui les rendent idéales pour les applications nécessitant une grande densité de sondes. En fixant les sondes d'ADN sur une surface de silicium à l'aide de techniques de lithographie et de chimie de surface (Beattie *et al.*, 1993).

2.3. Adressage de biopuces sur des surfaces

L'adressage des sondes consiste à déposer les sondes oligonucléotidique de manière précise et contrôlée sur le support de la puce, en utilisant des motifs prédéfinis. Le but est de concevoir une structure organisée de spots ronds ou carrés sur des surfaces planes

fonctionnelles, l'automatisation des dépôts permet de faciliter la fabrication des puces à ADN (Fodor *et al.*, 1991)

- Dépôt par contact

Consiste à utiliser des micro-pointes à dépôt physique avec la surface de la puce pour déposer les sondes d'ADN, cette technique consiste à déposer les sondes d'ADN sur la puce à l'aide de robots ou de systèmes automatisés (Tableau 5)

Tableau 5. Techniques d'adressage mécanique avec contact.

Méthode	Le dépôt par contact avec des aiguilles	Le dépôt à l'aide de la pointe d'un AFM	Le dépôt à l'aide de microleviers (Robot Bioplume)
Description	Des aiguilles en acier inoxydable sont trempées dans la solution à déposer, puis mises en contact avec la surface cible pour déposer le liquide (Yershov <i>et al.</i> ,1996).	Une pointe très fine est plongée dans la solution contenant les substances à déposer, puis déplacée avec précision vers la surface de la biopuce pour le dépôt (Ginger <i>et al.</i> ,2004).	Des microleviers à canal sont trempés dans la solution à déposer, puis mis en contact avec la surface cible pour déposer le liquide (Leïchlé <i>et al.</i> ,2008).

- Dépôt sans contact

Consiste à transférer les sondes sans contact physique avec la surface de la puce, assurant un positionnement précis et évitant ainsi toute contamination (Tableau 6). Il facilite également la miniaturisation des dépôts, permettant de fixer plusieurs milliers de sondes sur une surface réduite (Figure 16)

Tableau 6. Techniques d'adressage sans contact

Méthode	Dépôt par jet d'encre	Dépôt par activation laser
Description	Le dépôt par jet d'encre utilise des buses chargées avec l'échantillon, qui libèrent de	Un film fin est disposé au-dessus d'un support transparent et un faisceau laser est utilisé

	petites quantités de solution pour former des spots sur la surface, via élévation de température ou actionnement piézoélectrique (Okamoto T. <i>et al.</i> ,1996).	pour transférer ponctuellement une partie localisée du film qui est une solution liquide contenant les sondes (Vitasse, 2007).
--	--	--

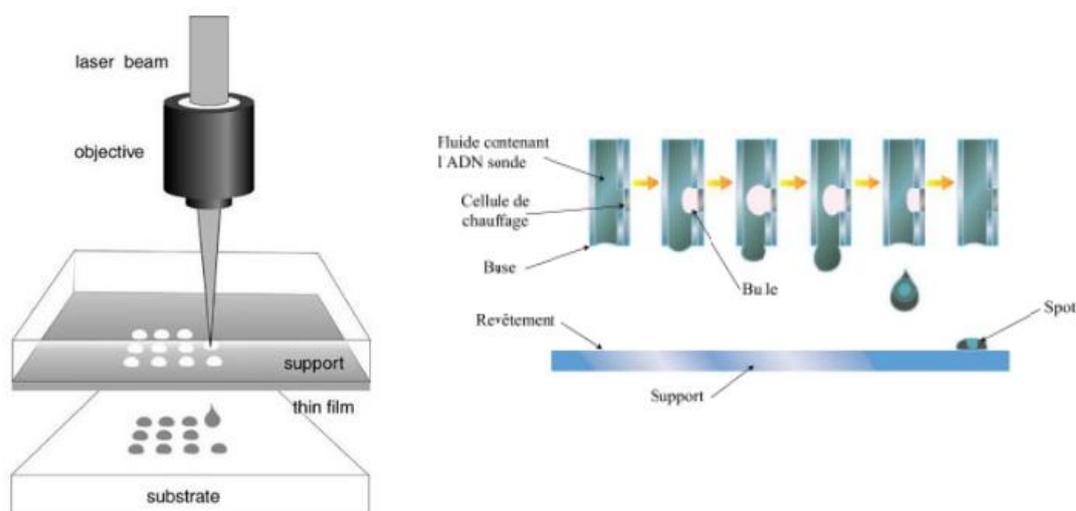


Figure 16. Schéma représentant : à gauche : le principe du dépôt par activation laser, à droite : Dépôt des spots par adaptation de la technologie Jet d'encre (Colina *et al.*, 2005).

3. Hybridation des cibles

L'hybridation moléculaire désigne l'association qui peut avoir lieu entre les cibles et les sonde et qui conduit à la formation d'un double brin ou duplex. Pendant l'étape d'hybridation, les acides nucléiques cibles provenant de l'échantillon à tester, généralement marqués par fluorescence, sont mis en contact avec les oligonucléotides sondes présents sur la biopuce et incubés ensemble (Maskos et Southern, 1992).

3.1. Préparation des cibles

L'échantillon initial est un échantillon biologique qui peut avoir différentes origines, comme des biopsies, des cultures bactériennes ou des prélèvements variés...etc. L'objectif d'une analyse en puce à ADN est de faire une comparaison globale du génome (ADN) ou du transcriptome (ARN) de divers échantillons biologiques entre eux (Ducray *et al.*, 2007).

La préparation des cibles pour les deux approches (génomique ou transcriptomique) est similaire. Commence par l'extraction et la purification des acides nucléiques, suivie d'une

étape d'amplification si c'est nécessaire, enfin le marquage par des molécules fluorescentes ou radioactives pour permettre leur détection ultérieure.

3.1.1 Préparation des cibles pour l'analyse du transcriptome

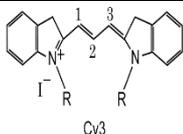
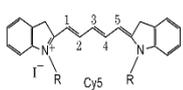
Pour analyser le transcriptome, il est essentiel d'isoler d'abord l'ARN total de l'échantillon à analyser. Après avoir prélevé l'échantillon, par la suite, il est nécessaire de rétro-transcrire l'ARN en ADN dit complémentaire (ADNc). Une étape d'amplification par PCR (RT-PCR) peut avoir lieu pour amplifier les produits d'ADNc obtenus assurant ainsi une quantité adéquate de matériel génétique. Les ADNc sont marqués, généralement avec des fluorochromes ou des radio-isotopes, ces ADNc marqués sont ensuite hybridés sur la puce (Marti *et al.*, 2002).

- Marquage des ADNc

Le marquage par un fluorochrome (une substance chimique capable d'émettre de la lumière de fluorescence après excitation.) est le procédé le plus fréquemment utilisé dans la méthode de puce à ADN. On peut effectuer ce marquage en utilisant des protocoles variés (Figure 17) (Wang, 2014).

- Marquage direct : le marquage direct est réalisé au cours de la rétro-transcription soit par incorporation d'une molécule fluorescente directement dans les ADNc ou par utilisation d'amorces marquées pour identifier les ADNc d'un type de cellule. Les colorants les plus couramment utilisés sont les cyanines Cy3 et Cy5 (Tableau 7)

Tableau 7. Les propriétés des cyanines Cy3 et Cy5 (<https://www.biologie-journal.org/>).

Structure chimique	Excitation (nm)	Émission (nm)	Couleur
 <p>Cy3</p>	550	570	Jaune-vert
 <p>Cy5</p>	650	670	Orange-rouge

- Marquage indirect : le marquage indirect implique souvent l'incorporation de nucléotides portant un groupement amino-allyl, lors de la synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) par transcription inverse, suivie par la fixation sur les

groupements allyl de groupements ester liés au fluorochrome permettant ainsi de marquer indirectement les séquences d'intérêt (Yu *et al.*, 2002).

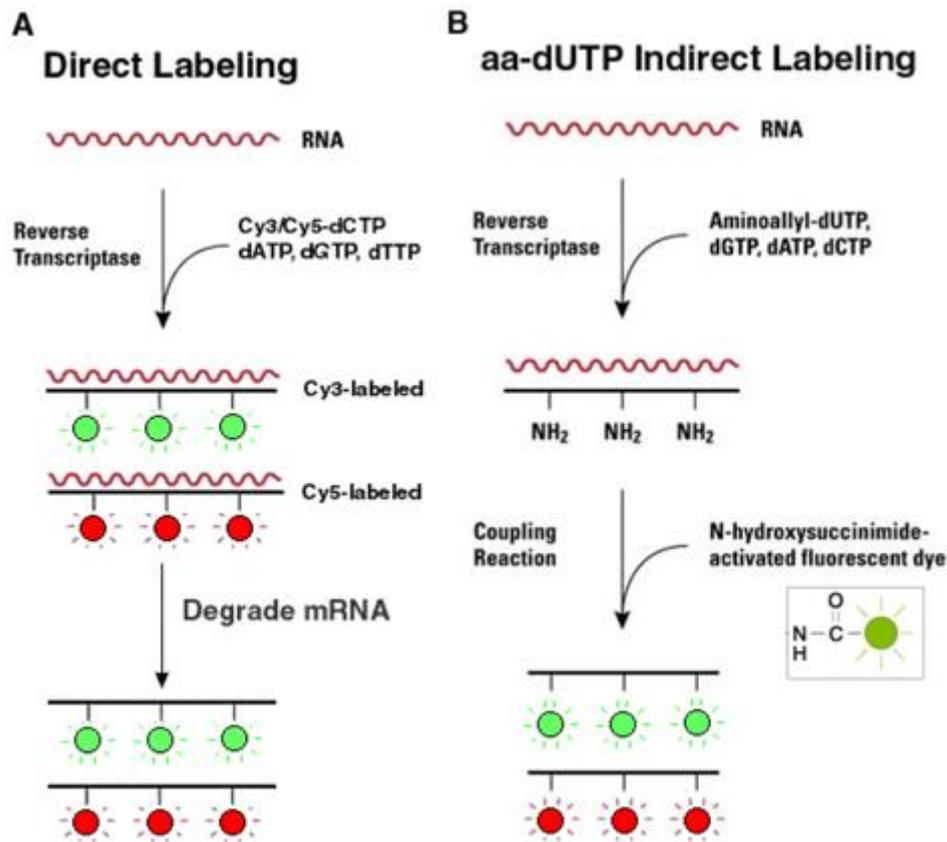


Figure 17. Protocole du marquage direct et indirect par les fluorochromes Cy3 et Cy5 (Yu *et al.*, 2002).

3.1.2. Préparation des cibles pour l'analyse du génome

Pour l'analyse du génome (incluant la détection des anomalies cytogénétiques, le polymorphisme, les mutations, etc.), il est nécessaire d'extraire l'ADN génomique. Ensuite, des enzymes de restriction sont employées pour fragmenter l'ADN par digestion enzymatique, ce qui permet d'obtenir des fragments d'ADN génomique de petite taille (200–500 paires de bases) adaptés à l'hybridation. L'efficacité de la digestion est surveillée par électrophorèse capillaire afin de garantir la fragmentation complète des échantillons. Les fragments d'ADN digérés sont marqués à la cyanine en ajoutant des désoxynucléotides (dUTP) marqués à la cyanine (Cy3 ou Cy5) en utilisant l'enzyme Exo(3'-5' exo-) Klenow. Les fragments d'ADN marqués sont purifiés par centrifugation sur filtres pour éliminer les enzymes, les cyanines et les nucléotides susceptibles de perturber l'étape d'hybridation (Béné *et al.*, 2020).

3.2 Hybridation et Lavage de la biopuce

Les acides nucléiques marqués sont placés sur la puce qui est mise à incuber dans une sorte d'incubateur suivie d'une étape de lavage à basse force ionique qui permet de séparer les brins les plus instables et éliminer tous les acides nucléiques non hybridés ou hybridés non spécifiquement ce qui joue un rôle crucial dans l'obtention du meilleur rapport entre signal et bruit de fond (Reymond, 2004). La formation et la stabilité des duplex dépendent de nombreux facteurs comme la température, le Ph et le temps de l'hybridation qui ont été

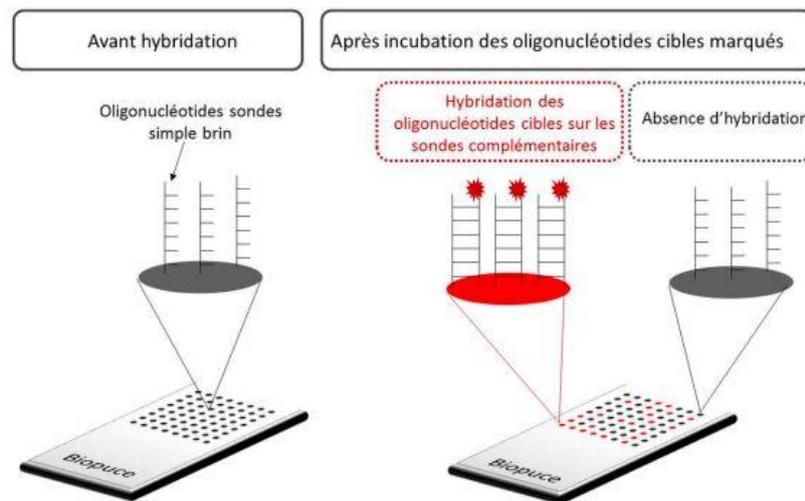


Figure 18. Principe d'hybridation sur une biopuce à ADN (Foncy, 2013)

relativement bien étudiés afin de déterminer les conditions favorisant la stabilité des hybrides (Figure 18) (Maskos et Southern, 1992).

4. Acquisition et analyse des données

Après hybridation, une étape de lecture permet de révéler les sondes d'ADN devenues fluorescentes (hybridées avec les cibles marquées). L'obtention des images est réalisée par la lecture des puces sur des scanners de haute précision, spécifiquement adaptés aux marqueurs utilisés. La fluorescence induite par le laser est conçue pour lire des puces à ADN où les lasers excitent l'ADN ou l'ARN marqué à la cyanine 3 (Cy-3) et à la cyanine 5 (Cy-5) (Keren, 2013).

4.1. Détection du signal

Afin de mesurer la fluorescence après hybridation Cible-Sonde La fluorescence émise est visualisée soit via un photomultiplicateur (PMT), soit via une caméra CCD. Le PMT convertit la lumière fluorescente en signal électrique, le signal amplifié est traité par des circuits électroniques et peut être affiché ou enregistré pour produire une sortie visuelle ou

numérique, tandis que la caméra CCD numérise ce signal électrique pour former une image, Chaque pixel de l'image scannée représente une mesure de fluorescence (Figure 19)(Schna, 1999).

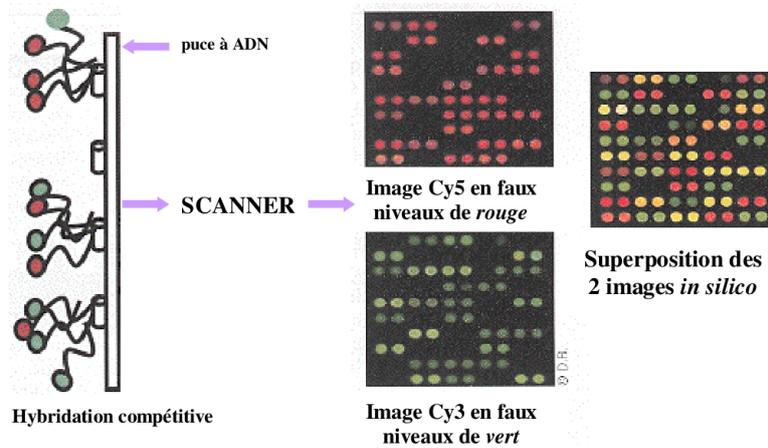


Figure 19. Principe général de la détection du signal (Frouin et Gidrol, 2005).

4.2 Analyse du signal

Les résultats issus de la détection sont présentés sous forme d'images montrant des niveaux de fluorescence différentiels. L'image obtenue est analysée à l'aide d'un système informatique, par un logiciel de traitement d'images, afin d'extraire les données numériques correspondant à chaque spot. Cette partie de l'analyse est réalisée à l'aide de méthodes automatisées (Gidrol, 2005).

5. Domaines d'application des puces à ADN

Les puces à ADN offrent la possibilité de réaliser des tests plus rapides, plus précis. En excluant certaines étapes initiales comme la culture, cela permet d'obtenir un résultat en seulement quelques heures, alors que cela aurait demandé plusieurs jours. Elles jouent un rôle crucial dans différents secteurs essentiels tels que le domaine médical, la microbiologie, l'agroalimentaire, l'environnement et bien d'autres secteurs.

5.1. Domaine de la médecine

5.1.1. Séquençage par hybridation SBH

La mise en place des puces pour le séquençage des génomes est certainement l'une des applications les plus novatrices dans le domaine de l'étude du génome. L'idée du séquençage par hybridation (SHOM pour Séquençage par Hybridation à l'aide d'une matrice

oligonucléotide ou SbH pour Séquençage par Hybridation) a été lancée en 1989 par deux équipes anglaises, une équipe yougoslave et une équipe russe.

Le mécanisme du séquençage par hybridation repose sur l'utilisation de sondes chevauchantes s'hybridant à la matrice. La détection des sondes hybridées permet ainsi de séquencer par "petits blocs" et de reconstituer le brin d'ADN par un traitement informatique des résultats (Lamoril *et al.*, 2008).

5.1.2. Pharmacogénomique

Dans le domaine de la pharmacogénomique, les puces à ADN sont des outils clés pour comprendre comment la génétique influence la réponse individuelle aux médicaments. Elles permettent d'analyser la variation génétique entre les individus, d'identifier les gènes impliqués dans la réponse aux médicaments et d'évaluer l'effet des traitements sur l'expression génique. Grâce à ces informations, les médecins peuvent adapter les traitements pour chaque patient, ouvrant ainsi la voie à une médecine plus précise et personnalisée (Vitasse, 2007).

5.1.3. Analyse médico-légale

Les puces à ADN peuvent être utilisées dans des tests de paternité ou des enquêtes criminelles pour identifier des personnes en fonction de leurs caractéristiques génétiques (Binod, 2023).

5.2. Domaine de l'agroalimentaire

Le domaine de l'agroalimentaire présente un grand potentiel, avec les puces à ADN qui peuvent accélérer la création de nouvelles plantes transgéniques. En outre, ces microsystèmes offrent la possibilité de surveiller l'origine des plantes génétiquement modifiées, de détecter la présence de bactéries dans les aliments ou de surveiller la composition des mélanges (ferments lactiques, levures, etc.) (Vitasse, 2007).

5.3. Domaine de l'environnement

Des puces à ADN ont été utilisées pour suivre la diversité et l'activité des microbes dans divers échantillons environnementaux, notamment le sol et l'eau, révélant ainsi des

informations sur la manière dont les activités humaines affectent l'environnement (Binod, 2023).

5.4. Domaine de la microbiologie

En microbiologie, les puces à ADN sont un outil essentiel pour analyser l'expression des gènes et caractériser les micro-organismes. Cette technologie offre une solution novatrice à la problématique ancienne de la détection, de l'identification et du typage des bactéries dans un échantillon. Elles facilitent l'identification rapide du génome des bactéries pathogènes et simplifient les recherches épidémiologiques, notamment pour la gestion des maladies nosocomiales ou la surveillance du bioterrorisme. Les laboratoires de recherche développent ces puces afin d'analyser la diversité et l'évolution du monde bactérien, de rechercher des gènes de résistance aux antibiotiques et de caractériser des communautés bactériennes composées de centaines d'espèces différentes (Figure 20). L'industrialisation du processus de production et d'utilisation, permettant de rendre la technologie plus fiable et facilite son utilisation dans les laboratoires hospitaliers et d'analyses spécialisées, puis sa généralisation aux laboratoires de ville (Glaser, 2005).

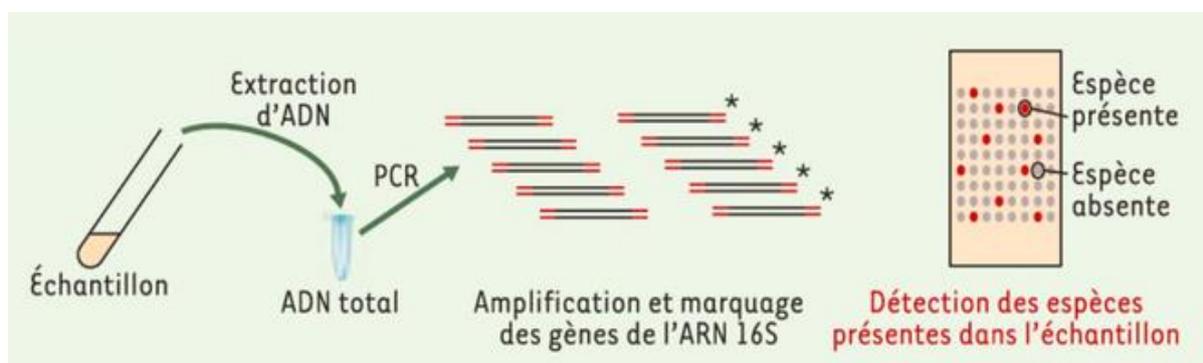


Figure 20. Application de puce à ADN dans l'analyse microbiologique (Glaser, 2005).

6. Intérêts et les limites des puces à ADN

Les biopuces trouvent leurs applications dans de nombreux domaines. Cependant, comme toute technique, elle présente à la fois des avantages considérables et des inconvénients notables.

6.1. Intérêts

Les puces à ADN offrent un avantage significatif en termes de temps d'analyse. Elles permettent une analyse rapide et parallèle de milliers de séquences d'ADN, ce qui accélère

considérablement les études sur l'expression génique, la détection de mutations, et la compréhension des mécanismes biologiques sous-jacents à divers phénomènes ainsi que l'étude des interactions entre les gènes. De plus, les puces à ADN offrent une grande sensibilité, permettant la détection de faibles niveaux et quantités d'ARN ou d'ADN dans des échantillons biologiques, garantissant ainsi des résultats fiables et précis. Leur flexibilité permet également une personnalisation selon les besoins spécifiques de chaque expérience (Bruce *et al.*, 2002).

6.2. Limites

Les puces à ADN sont largement employées en génomique mais leur utilisation est limitée par des facteurs techniques, économiques et analytiques. En effet, Les puces à ADN peuvent produire des résultats complexes qui nécessitent une expertise spécifique pour une interprétation correcte. Cela constitue un obstacle pour les utilisateurs non experts, Il est donc essentiel d'avoir des compétences en bioinformatique pour analyser et interpréter ces données. De plus la fabrication des puces à ADN peut être coûteuse et nécessite des investissements financiers importants. Le coût élevé des matières premières, des technologies de fabrication avancées, et des équipements spécialisés contribue à ces dépenses. Ces facteurs peuvent limiter l'accès aux puces à ADN à certains laboratoires (Everett *et al.*, 2010).

Ces limites techniques et scientifiques ne doivent pas être sous-estimées, mais elles ne diminuent pas l'importance de la technologie des puces à ADN dans le domaine de la biologie et de la médecine.

Chapitre 4 :

Synthèse des résultats d'études publiées sur
l'application des puces à ADN.

1. Introduction

Afin d'appuyer et de consolider la pertinence de notre problématique, qui vise à démontrer l'intérêt et le potentiel de la technique des puces à ADN pour l'identification des bactéries pathogènes d'origine alimentaire nous avons entrepris une analyse approfondie d'études dans le même contexte de notre sujet. Dans ce chapitre deux d'entre elles sont analysés en se focalisant sur les points suivants :

- Présentation des principaux objectifs visés par les études,
- Discussion des méthodologies employées en examinant les différentes approches, expérimentales utilisées dans les études sélectionnées,
- Analyse des résultats obtenus par synthèse des principaux résultats obtenus,
- Discussion des conclusions tirées par comparaison et analyse des conclusions formulées par les auteurs des études sélectionnées, en les mettant en perspective avec l'état actuel des connaissances dans le domaine.

2. Analyse de l'article 1

DNA Microarray for Rapid Detection and Identification of Food and Water Borne Bacteria: From Dry to Wet Lab.

Auteurs : Reza Ranjbar, Payam Behzadi, Ali Najafi, Raheleh Roudi

Affiliation : Centre de recherche en biologie moléculaire, Université des sciences médicales de Baqiyatallah, Téhéran, Iran

Keywords : DNA Microarrays, DNA Microchips, Bioinformatics, DNA Probes, Bacteria

Urls : <https://www.benthamopen.com/TOMICROJ/VOLUME/11/PAGE/330/>

- Objectif de l'étude

L'objectif principal de cette étude (Annexe 3) est de concevoir et construire une puce microarray ADN destinée à la détection et à l'identification rapides de 10 agents bactériens pathogènes d'importance, notamment *Escherichia coli* (*E.coli*), *Shigella boydii*, *Sh.dysenteriae*, *Sh.flexneri*, *Sh.sonnei*, *Salmonella typhi*, *S.typhimurium*, *Brucella sp.*, *Legionella pneumophila* et *Vibrio cholerae*.

- Discussion des Méthodologies Utilisées

La méthode utilisée dans cette étude s'articule autour de deux axes principaux : les opérations *in-silico* et les opérations *in-vitro*.

Pour la partie *in-silico*, la conception spécifique des sondes microarray longues oligo pour chaque agent bactérien a nécessité l'utilisation de bases de données et d'outils bioinformatiques tels que la base de données NCBI RefSeq, les serveurs PanSeq et Gview, AlleleID 7.7 et Oligo Analyzer 3.1.

La partie *in-vitro* a inclus les étapes de spotage robotique de sondes sur la puce microarray, l'extraction d'ADNs bactériens, le marquage de l'ADN, l'hybridation et enfin la numérisation de la puce microarray. Pour cela, des outils et appareils spécifiques ont été employés, incluant Nexterion® Slide E, Qarraymini spotter, une trousse NimbleGen, TrayMix™ S4, et un scanner Innoscan 710.

- Résultats Obtenus

Le principal résultat de cette étude est la création réussie d'une puce ADN microarray comportant 10 sondes oligo longues spécifiques, permettant la détection et l'identification simultanée des 10 bactéries pathogènes étudiées.

- Conclusions tirées

La réussite de la conception et de la mise en œuvre de la puce ADN microarray montre son pouvoir à identifier simultanément tous les agents bactériens testés, soulignant la précision et l'efficacité de cet outil diagnostique. Cependant, l'étude met aussi en évidence le besoin essentiel d'avoir un bioinformaticien professionnel dans l'équipe pour la conception des sondes multifonctionnelles de la biopuce, afin d'augmenter l'exactitude des résultats. Cette implication souligne l'importance de l'expertise bioinformatique dans le processus de développement des outils diagnostiques modernes.

3. Analyse de l'article 2

Titre: An in situ-Synthesized Gene Chip for the Detection of Food-Borne Pathogens on Fresh-Cut Cantaloupe and Lettuce

Auteurs : Sarengaowa, Wenzhong Hu, Ke Feng, Aili Jiang, Zhilong Xiu, Ying Lao, Yuanzheng Li, Ya Long

Affiliation : École de bioingénierie, Université de technologie de Dalian, Dalian, Chine.

Mots clés : *Salmonella Typhimurium*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *in situ-synthesized gene chip*, *tiling array*, fresh-cut fruits and vegetables

doi: 10.3389/fmicb.2019.03089

- Objectif de l'étude

L'objectif principal du travail effectué par Sarengaowa *et al.* 2020 (Annexe 4), est de développer une technologie de détection rapide et précise des pathogènes alimentaires sur les produits frais, comme le melon cantaloup et la laitue. Cette nécessité découle d'une préoccupation croissante en matière de sécurité alimentaire due à l'augmentation des maladies d'origine alimentaire associées à la consommation d'aliments contaminés. En mettant au point une méthode fiable et efficace pour détecter rapidement les pathogènes dans les produits agricoles frais, les auteurs visent à réduire le risque de maladies d'origine alimentaire tout au long de la chaîne de distribution des aliments.

- Discussion des méthodologies utilisées

Les auteurs ont proposé un système de détection sophistiqué utilisant une puce à gènes synthétisée *in situ* équipée de sondes « tiling array ». Cette méthode comprend plusieurs étapes clé :

1. Extraction de l'ADN génomique de cinq pathogènes alimentaires courants : *Salmonella Typhimurium*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, et *Escherichia coli* O157:H7.

2. Conception et criblage de sondes spécifiques, basées sur des séquences de gènes de virulence des pathogènes à détecter.

3. Amplification par PCR multiplex des gènes cibles pour augmenter la quantité d'ADN génomique.
4. Hybridation des ADN amplifiés sur la puce à gènes synthétisée *in situ*, permettant une analyse précise par les sondes « tiling array ».
5. Vérification de la spécificité des sondes en utilisant des ADN non-cibles pour assurer que les résultats de détection soient spécifiques aux pathogènes visés.

Cette méthode diffère des approches traditionnelles en fournissant une réponse plus rapide (dans les 24 heures) et précise, sans nécessiter de longues périodes de culture.

- Discussion des résultats obtenus

Les résultats obtenus ont démontré que cette technologie pouvait atteindre une limite de détection d'environ 3 log ufc/g directement sur des échantillons de melon cantaloup et de laitue fraîchement coupés, sans nécessiter de pré-culture des échantillons. Cette capacité de détection se cale bien dans les besoins de rapidité et de précision susmentionnés, rendant cette méthode adaptée pour une application dans des contextes où le temps et la fiabilité sont critiques.

- Conclusions tirées

La création et l'application de la puce à gènes synthétisée *in situ* avec des sondes de tuilage « tiling array » marquent une avancée significative dans le domaine de la sécurité alimentaire. Les auteurs ont conclu que leur travail représente une contribution importante à la lutte contre les dangers des pathogènes alimentaires dans les produits frais. Leur méthode combine efficacement l'exigence de rapidité et de spécificité dans la détection des contaminants bactériens, élevant ainsi les standards de sécurité alimentaire. Leur conclusion souligne aussi la nécessité d'une conception minutieuse des sondes et de tests répétés pour maintenir la spécificité et la sensibilité des sondes, indiquant que le succès de cette méthode repose fortement sur l'exactitude des composants moléculaires utilisés pour la détection.

Conclusion

Les bactéries pathogènes d'origine alimentaire représentent un danger sanitaire d'ordre mondial. La détection de ces agents pathogènes repose sur des méthodes traditionnelles, qui bien qu'essentielles, présentent des limites en termes de rapidité et de capacité à détecter simultanément plusieurs agents pathogènes. Cependant, l'avènement de la technologie des puces à ADN a apporté une solution novatrice à ces défis. Cette dernière offre une détection plus rapide, une sensibilité et une spécificité améliorées, ainsi qu'une capacité à identifier simultanément plusieurs bactéries pathogènes.

En somme, il s'avère que l'adoption des puces à ADN pour la détection des bactéries pathogènes s'impose comme une avancée majeure. Cette technologie prometteuse est susceptible de révolutionner les pratiques microbiologiques et de renforcer considérablement notre capacité à lutter contre les infections bactériennes, un enjeu crucial pour la sécurité alimentaire mondiale.

Il est crucial de souligner, que même si les puces à ADN révèlent un potentiel inestimable, ces dernières ne sont pas exemptes de limites techniques et scientifiques. Néanmoins, ces défis ne remettent nullement en cause l'importance majeure de cette technologie dans de nombreux domaines notamment celui de la biologie.

Il est également important de noter, que la technique des puces à ADN, bien que prometteuse, n'est pas encore largement utilisée dans les laboratoires de microbiologie alimentaire. En termes de perspectives, l'industrialisation du processus de fabrication et d'utilisation des biopuces, visant à les rendre plus robustes et économiques, devrait lever cet obstacle et permettre leur déploiement à plus grande échelle.

Références bibliographiques

A

- Abdelmassih, M., Mahillon, J., Goffaux, M. J., Ferber, F., & Planchon, V. (2013). Guide pratique de microbiologie alimentaire à l'usage des producteurs, de l'ASBL REQUASUD, 13p.
- Adingra, A., Kouadio, A., & Kouassi, A. (2011). Les Escherichia coli enterohémorragiques (EHEC) O157 : H7 : un problème de santé publique. *Fiches Techniques et Documents de Vulgarisation*, 2011, p. 22-27.
- Aureli, P., Giovanni, C. F., Caroli, D., *et al.* (2000). An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. *New England Journal of Medicine*, 342, 1236-1241.

B

- Baaj, Y. (2008). Mise au point d'une méthode utilisant des biopuces pour le diagnostic de Neuropathies Héritaires. Thèse de doctorat : Médecine. Limoges : Université de Limoges, 233 p.
- Beattie, K., Eggers, K., Shumaker, J., Hogan, M., Varma, R., Lamture, J., Hollis, M., Ehrlich, D., & Rathman, D. (1993). Genosensor technology. *Clinical Chemistry*, 39, 719-722.
- Béné, M. C., Drouet, C., Fisson, S., Fournel, S., & Seillès, E. (2020). Techniques de biologie moléculaire. Dans *Elsevier eBooks* (p. 83-114). <https://doi.org/10.1016/b978-2-294-76216-1.00005-5>
- Beri-Dexheimer, M. (2005). Hybridation génomique comparative en microréseau : évolutions techniques et place dans la stratégie diagnostique, expérience dans le cadre du retard mental. Thèse de doctorat : Génétique. Nancy : Université de Lorraine, 147 p.
- Bernard, K., & Wormser, G. P. (2006). Biodefense Principles and Pathogens Edited By M. S. Bronze and R. A. Greenfield Norfolk, United Kingdom : Horizon Bioscience, 2005. 838 pp. \$ 380.00 (hardcover). *Clinical Infectious Diseases/Clinical Infectious Diseases* (Online). University Of Chicago Press, 42(5), 735. <https://doi.org/10.1086/500218>
- Berthet, N. (2013). La puce à ADN de reséquençage : un outil rapide pour mieux identifier et comprendre une émergence virale et bactérienne. *Bulletin de L'Académie Nationale de Médecine*, 197(9), 1669-1682. [https://doi.org/10.1016/s0001-4079\(19\)31388-3](https://doi.org/10.1016/s0001-4079(19)31388-3)
- Bertucci, F., Bernard, K., Loriod, B., Chang, Y., Granjeaud, S., Birnbaum, D., Nguyen, C., Peck, K., & Jordan, B. (1999). Sensitivity issues in DNA array-based expression

- measurements: Advantages of nylon membranes. *Human Molecular Genetics*, 8(9), 1715-1722.
- Bidan, G., Billion, M., Livache, T., Mailley, P., & Roget, A. (2003). Ingénierie et électrochimie moléculaires pour la conception de puces à adn. *Actualite Chimique*, (11/12), 39-48.
- Binod, B. (2023). Technologie des micropuces à ADN : principes, instrumentation, types, applications, micropuces à ADNc et oligonucléotides. *Les notes scientifiques* [en ligne] (page consulté le 01/02/2024) <https://thesciencenotes.com/dna-microarray-technology-principles-instrumentation-types-applications-cdna-oligonucleotide-microarrays/>
- Bourgeois, C. M., Mesle, J. F., & Zucca, J. (1996). *Microbiologie alimentaire: Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments*. Tec & Doc Lavoisier, 61-77.
- Branchu, P. (2012). Pathogénicité des Escherichia coli entérohémorragiques : identification de voies de régulation contrôlant la mobilité, la formation de biofilm et le locus d'effacement des entérocytes. Thèse de doctorat : Microbiologie. Lyon : Université Claude Bernard Lyon 1, 285 p.
- Brisabois, A., Gauchard, F., Andral, B., Brugère, H., Espié, E., Leclerc, V., Roze, S., & Vernozy-Rozand, C. (2004). Epidémiologie des Escherichia coli producteurs de shiga-toxines. Thèse de doctorat : Microbiologie. Paris : INRAE, 4 p.
- Bruce, E., *et al.* (2002). Applications and advantages of DNA microarrays in the field of genetics and molecular biology. *Journal of Molecular Biology*, 15(3), 456-467.
- Bush, L. M., & Vazquez-Pertejo, M. T. (2022). *Infection par <i>Escherichia coli* O157 : H7 et autres E. coli entérohémorragiques (EHEC). *Le Manuel MSD*. [en ligne] (page consulté le 15/03/2024) <https://www.msdmanuals.com/fr/professional/maladies-infectieuses/bacilles-gram-n%C3%A9gatifs/infection-par-escherichia-coli-o157-h7-et-autres-e-coli-ent%C3%A9roh%C3%A9morragiques-ehec>

C

- Cao, Z., Wu, H., Bruce, A., Wollenberg, K., & Panjwani, N. (2002). Detection of differentially expressed genes in healing mouse corneas, using cDNA microarrays. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 43(9), 2897-2904.
- Chimalizeni, Y., Kawaza, K., & Molyneux, E. (2010). The epidemiology and management of non typhoidal salmonella infections. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 659, 33-46. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0981-7_3

Chong, A., Cooper, K. G., Kari, L., Nilsson, O., Hillman, C., Fleming, B. A., Wang, Q., Nair, V., & Steele-Mortimer, O. (2021). Cytosolic replication in epithelial cells fuels intestinal expansion and chronic fecal shedding of *Salmonella Typhimurium*. *Cell Host & Microbe*, 29(7), 1177-1185.e6. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.04.017>

Cottin, J., Loiseau, O., Robert, R., Mahaza, C., Carbonnelle, B. and Senet, J. M. (1990). Surface *Listeria monocytogenes* carbohydrate-binding components revealed by agglutination with neoglycoproteins. *FEMS Microbiol. Lett.* 56, 301–305.

D

Del Río, A., Cervera, C., Moreno, A., Moreillon, P., & Miró, J. M. (2009). Patients at risk of complications of *Staphylococcus aureus* Bloodstream infection. *Clinical Infectious Diseases/Clinical Infectious Diseases*, 48(4), S246-S253. [en ligne] (page consulté le 15/03/2024) DOI: <https://doi.org/10.1086/598187>

Delmas, G., Da Silva, N. J., Pihier, N., Weill, F., Vaillant, V., & De Valk, H. C. (2010). Les toxi-infections alimentaires collectives en France entre 2006 et 2008. Thèse de doctorat : Santé publique. Paris : Institut Pasteur. <https://pasteur.hal.science/pasteur-02047871/>.

DeRisi, J., Penland, L., Brown, P., Bittner, M., Meltzer, P., Ray, M., Chen, Y., Su, Y., & Trent, J. (1996). Use of cDNA microarrays gene expression patterns in human cancer. *Nature Genetics*, 14(4), 457-460.

Devauchelle, V., & Chiocchia, G. (2004). Quelle place pour les puces à ADN dans les maladies inflammatoires ? *La Revue De Médecine Interne*, 25(10), 732–739. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2004.02.004>

Dubois-Brissonnet, F., & Guillier, L. (2020). Les maladies microbiennes d'origine alimentaire. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 55(1), 30-38. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cnd.2019.12.001>

Ducray, F., Honnorat, J., & Lachuer, J. (2007). Principes et intérêts pour l'étude des maladies neurologiques et technologie des puces ADN. *Revue Neurologique*, 163(4), 409-420. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0035-3787\(07\)90417-8](https://doi.org/10.1016/s0035-3787(07)90417-8)

Dugat-Bony, É., Peyretailade, É., Parisot, N., Biderre-Petit, C., Jaziri, F., Hill, D. R., Rimour, S., & Peyret, P. (2011). Detecting unknown sequences with DNA microarrays: explorative probe design strategies. *Environmental Microbiology*, 14(2), 356-371. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02559.x>

E

- Ekins, R., & Chu, F. (1999). Microarrays: their origins and applications. *Trends In Biotechnology*, 17(6), 217-218. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0167-7799\(99\)01329-3](https://doi.org/10.1016/s0167-7799(99)01329-3)
- Everett, K., Rees-George, J., Pushparajah, I., Janssen, B. and Luo, Z. 2010. Advantages and disadvantages of microarrays to study microbial population dynamics a minireview. *New Zealand Plant Protection*. 63, (2010), 1–6. DOI: <https://doi.org/10.30843/nzpp.2010.63.6606>.
- Ewing, W. H. (1986). Edwards and Ewing's identification of enterobacteriaceae. New York, Elsevier Science Publishing. 536 p.

F

- Fodor, S. P. A., Read, J. L., Pirrung, M. C., Stryer, L., Lu, A. T., & Solas, D. (1991). Light-Directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science*, 251(4995), 767–773. <https://doi.org/10.1126/science.1990438>
- Fesseha H, Tilahun H. Principles and applications of deoxyribonucleic acid microarray: A review. *Pathol Lab Med Open J*. 2020; 1(1): 54-62.
- Foncy, J. (2013). Nouvelles technologies intégrées d'adressage et de détection des interactions moléculaires pour application de biopuces en diagnostic moléculaire in vitro. Thèse de doctorat : Ingénieries microbienne et enzymatique : université de Toulouse, 249p
- Foulhoux, N. (1994). La virulence des listeria: mise au point d'un protocole de dosage de la listeriolysine O in vitro (Doctoral dissertation). Thèse de doctorat : Pharmacie. Limoges : Université de Limoges, 134p.

G

- Ghafir, Y. (2007). Techniques analytiques en microbiologie alimentaire. In *Encyclopédie de sécurité et de santé au travail*. 67p
- Ghafir, Y., & Daube, G. (2007). Le point sur les méthodes de surveillance de la contamination microbienne des denrées alimentaires d'origine animale. In *Annales de Médecine Vétérinaire*. 151p
- Giannella, R. A., Baron, S., et Coll. (1996). Medical Microbiology. Galveston: Samuel Baron. 857p.
- Gidrol, X. (2005). Bioinformatique et post-génome : Analyse des données d'expression issues des puces à ADN. *Biofutur*, 252, 21-35.

- Ginger, D. S., Zhang, H., & Mirkin, C. A. (2004). The Evolution of Dip-Pen Nanolithography. *Angewandte Chemie - International Edition*, 43(1), 30-45. <https://doi.org/10.1002/anie.200300608>
- Glaser, P. (2005). Les puces à ADN vont-elles révolutionner l'identification des bactéries ? *Médecine/Sciences/MS*, 21(5), 539-544.
- Gotfried, J. (2023). Intoxication staphylococcique alimentaire. *Le Manuel MSD*. [en ligne] (page consulté le 02/05/2024) <https://www.msmanuals.com/fr/accueil/troubles-digestifs/gastro-ent%C3%A9rite/intoxication-alimentaire-%C3%A0-staphylocoque>
- Grimont, P. a. D. (1987). Taxonomie des Escherichia. *Médecine Et Maladies Infectieuses/Médecine Et Maladies Infectieuses*. Supplément, 17, 6–10. [https://doi.org/10.1016/s0399-077x\(87\)80308-6](https://doi.org/10.1016/s0399-077x(87)80308-6)
- Guiraud, J. P. (1998). Microbiologie alimentaire. Paris : DUNOD. 282-292p.

H

- Hamdi, T. M., Naïm, M., Martin, P., & Jacquet, C. (2007). Identification and molecular characterization of *Listeria monocytogenes* isolated in raw milk in the region of Algiers (Algeria). *International Journal of Food Microbiology*, 116, 190-193.

J

- Johnson, M. W., Zaretskaya, I., Raytselis, Y., Merezhuk, Y., McGinnis, S. D., & Madden, T. (2008). NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Research*, 36 [en ligne] (page consulté le 02/02/2024). <https://doi.org/10.1093/nar/gkn201>

K

- Kane, M. D., Jatkoef, T. A., Stumpf, C. R., Lu, J., Thomas, J. D., & Madore, S. J. (2000). Assessment of the sensitivity and specificity of oligonucleotide (50mer) microarrays. *Nucleic Acids Research*, 28(22), 4552–4557. <https://doi.org/10.1093/nar/28.22.4552>
- Kaper, J. B., J. P. Nataro, and H. L. Mobley. (2004). Pathogenic Escherichia coli. *Nature Reviews Microbiology*. 2 (2):123-140.
- Kénanian, G. (2018). Staphylococcus aureus se met transitoirement en dormance pour utiliser les acides gras de l'hôte et échapper à une inhibition par un anti-FASII : quel signal active son réveil ? Thèse de doctorat : Microbiologie. Paris : Université Paris Saclay, 208 p.
- Keren, B. (2013). La déficience intellectuelle : du diagnostic en puces ADN à l'identification de gènes candidats. Thèse de doctorat : Génétique Humaine. Paris : Université Pierre et Marie Curie, 231 p.

- Kibbe, W. A. (2007). OligoCalc : an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Research*, 35(1), 43-46. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm234>
- Knodler, L. A., & Elfenbein, J. R. (2019). Salmonella enterica. *Trends in Microbiology*, 27(11), 964–965. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.05.002>
- Kooh, P. (2022). Aliments contaminés par la bactérie E. coli : quels effets sur la santé et comment prévenir les infections ? *The Conversation*. [En ligne] (Page consulté le 15/05/2024) <https://theconversation.com/aliments-contamines-par-la-bacterie-e-coli-quels-effets-sur-la-sante-et-comment-prevenir-les-infections-185176>

L

- Lagoda, P., & Regad, F. (2000). Les puces à ADN : outils pour une nouvelle vision de la diversité et des ressources génétiques. *Cahiers Agricultures*, 9(4), 329-340. <https://agritrop.cirad.fr/475611/>
- Lamoril, J., Ameziane, N., Deybach, J., Bouizegarène, P., & Bogard, M. (2008). Les techniques de séquençage de l'ADN : une révolution en marche. Première partie. *Immuno Analyse & BiologieSpécialisée*, 23(5), 260-279. <https://doi.org/10.1016/j.immbio.2008.07.016>
- Leber, A. L., & Burnham, C. D. (2023). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*.
- Leïchlé, J.-B., Pourciel, C., Martin, J., Bausells, J., Lora-Tamayo, E., Perez-Murano, F., ... Nicu, L. (2008). *Biomedical Microdevices*, 10(4), 479-487.
- Leroy-Terquem, É. (2009). Les nouvelles technologies de biologie moléculaire en diagnostic. *Option-bio*, 20(412), 9-13. [https://doi.org/10.1016/s0992-5945\(09\)70025-x](https://doi.org/10.1016/s0992-5945(09)70025-x)
- Li, E., & Liu, W. (2003). DNA Microarray Technology in Microbial Ecology Studies- Principle, Applications and Current Limitations. *Microbes and Environments*, 18(4), 175–187. <https://doi.org/10.1264/jsme2.18.175>
- Li, X., He, Z., & Zhou, J. (2005). Selection of optimal oligonucleotide probes for microarrays using multiple criteria, global alignment and parameter estimation. *Nucleic Acids Research*, 33(19), 6114-6123. <https://doi.org/10.1093/nar/gki914>
- Lipshutz, R. J., Fodor, S. P. A., Gingeras, T., & Lockhart, D. J. (1999). High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nature Genetics*, 21(S1), 20-24. <https://doi.org/10.1038/4447>
- Liu, G. Y., Essex, A., Buchanan, J. T., Datta, V., Hoffman, H. M., Bastian, J. F., ... Nizet, V. (2005). *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and

promotes virulence through its antioxidant activity. *The Journal Of Experimental Medicine*, 202(2), 209-215. <https://doi.org/10.1084/jem.2005084>

Liu, H. (2010). Microarray probes and probe sets. *Frontiers In Bioscience*, E2(1), 325-338. <https://doi.org/10.2741/e93>

Loir, Y. L., Baron, F., & Gautier, M. (2003). *Staphylococcus aureus and food poisoning*, 2(1), 63-76. <https://hal.science/hal-01123026/>

M

Marc, P. (2005). Les puces à ADN : vers une nouvelle biologie. Purlascience.fr(en ligne), 46(1) (page consulté le 18 /05/2023) <https://www.purlascience.fr/sd/biotechnologies/les-puces-a-adn-vers-une-nouvelle-biologie-5674.php>

Marti, J., Piquemal, D., Manchon, L., & Combes, T. (2002). Étude des transcriptomes par analyse sérielle de l'expression des gènes. *Journal de la Société de Biologie/Journal de la Société de Biologie*, 196(4), 303-307. <https://doi.org/10.1051/jbio/2002196040303>

Maskos, U., & Southern, E. M. (1992). Parallel analysis of oligodeoxyribonucleotide (oligonucleotide) interactions. I. Analysis of factors influencing oligonucleotide duplex formation. *Nucleic Acids Research*, 20(7), 1675-1678. <https://doi.org/10.1093/nar/20.7.1675>

Mead, S., Slutsker, L., & Dietz, V. (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases*, 5(5), 607-617

Meur, N. L. (2005). From microarray data acquisition to their interpretation: the importance of raw data processing. Thèse de doctorat : Informatique. Grenoble : Université Grenoble Alpes, 284 p.

Missaoui, M. (2009). Contributions algorithmiques à la conception de sondes pour biopuces à ADN en environnements parallèles. Thèse de doctorat : Informatique. Lille : Université de Lille, 240 p.

Montenon, I. (2024). Nausées et fatigue : quelles sont les causes possibles et quand consulter [en ligne].(page consulté le 29/05/2023). <https://www.qare.fr/sante/nausee/fatigue/>

Murat, L. (2024). Quelles analyses sont indispensables dans l'agro-alimentaire [en ligne].(page consulté le 22/04/2023). <https://blog.ciklab.com/analyses-indispensables-agroalimentaire>

O

Orenstein, A. (2011). The discovery and naming of *Staphylococcus aureus* [en ligne].(page consulté le 22/04/2023),<http://www.antimicrobe.org/h04c.files/history/S-aureus.pdf>.

P

Pandey, A., Joshi, V. K., Nigam, P. S. N., & Soccol, C. R. (1999). ENTEROBACTERIACEAE, COLIFORMS AND E. COLI. *Elsevier eBooks* (p. 604-610). <https://doi.org/10.1006/rwfm.1999.0510>

Panisset J. C., Dewailly, E., Doucet-Leduc, H., Gerin, M., Gosselin, P., Cordier, S., ... & Devailley, E. (2003). Contamination alimentaire. *Environnement et santé publique-Fondements et pratiques*, 369-395.

Proudnikov, D., Timofeev, E., & Mirzabekov, A. (1998). Immobilization of DNA in polyacrylamide gel for the manufacture of DNA and DNA oligonucleotide microchips. *Analytical Biochemistry*, 259(1), 34-41.

R

Ray, C. G., & Ryan, K. J. (2014). New York, NY, États-Unis : McGraw-Hill Education/Medical. *Microbiologie médicale Sherris*, 50(9), 579-583

Raynaud, S., Boscher, P., Picant, P., Mathieu, B., Degand, C., Poutreil, B., ... & Vernozzy-Rozand, C. (2006). Prévalence, origine, circulation et persistance des *Escherichia coli* producteurs de shiga-toxines (STEC) dans les élevages bovins français. *Bulletin Epidémiologique*, 33(21), 1-3

Relógio, A. (2002). Optimization of oligonucleotide-based DNA microarrays. *Nucleic Acids Research*, 30(11), 51e-551. <https://doi.org/10.1093/nar/30.11.e51>

Reymond, N. (2004). Bioinformatique des puces à ADN et application à l'analyse du transcriptome de *Buchnera aphidicola*. Thèse de doctorat : Biologie. Marseille : Université Aix-Marseille, 326 p.

Ricci, A., Allende, A., Bolton, D., Chemaly, M., Davies, R., Escámez, P. S. F., ... Koutsoumanis, K. (2018). *Listeria monocytogenes* contamination of ready-to-eat foods and the risk for human health in the EU. *EFSA Journal*, 16(1).

Rimour, S. (2006). Méthodes et outils logiciels pour la conception de sondes oligonucléotidiques pour puces à ADN. Applications aux biopuces transcriptomiques et aux biopuces de type phylogénétique. Thèse de doctorat : Bioinformatique. Rennes : Université de Rennes 1, 220 p.

S

Schena, M. (1999). DNA microarrays : Practical approach series. Oxford University Press. 210p.

- Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W., & Brown, P. O. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 270(5235), 467-470.
- Seeliger, H. P. R., & Jones, D. (1987). *Listeria*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (9th ed.). Williams and Wilkins.
- Situma, C., Hashimoto, M., & Soper, S. A. (2006). Merging microfluidics with microarray-based bioassays. *Biomolecular Engineering*, 23(5), 213-231. <https://doi.org/10.1016/j.bioeng.2006.03.002>
- Song, K. S., Li, S., Okamoto, T., Quilliam, L. A., Sargiacomo, M., & Lisanti, M. P. (1996). Co-purification and Direct Interaction of Ras with Caveolin, an Integral Membrane Protein of Caveolae Microdomains. *Journal Of Biological Chemistry/ The Journal Of Biological Chemistry*, 271(16), 9690-9697. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.16.9690>
- Stauffer, S., Gardner, A., Duprez, W., Ungu, D. A. K., & Wismer, P. (2018). Gene expression. Dans *Springer eBooks*, 45 (3), 39-52 . https://doi.org/10.1007/978-3-662-57999-2_4

T

- Tabi, G. M. (2014). *Listeria monocytogenese* et femme enceinte.These de doctorat : Pharmacie. France : Université de Lorraine, 88p.
- Toullec, M. L. (2022). 1989, il invente la puce à ADN [en ligne]. (page consulté le 27/03/2023). <https://www.usinenouvelle.com/article/1989-il-invente-la-puce-a-adn.N1971372>
- Tristan, A., Bes, M., Meugnier, H., Lina, G., Bozdogan, B., Courvalin, P., Reverdy, M., Enright, M. C., Vandenesch, F., & Etienne, J. (2007). Global Distribution of Pantone-Valentine Leukocidin-positive Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, 2006. *Emerging Infectious Diseases*, 13(4), 594-600. <https://doi.org/10.3201/eid1304.061316>

V

- Vidic, J., & Auger, S. (2019). Techniques moléculaires de détection de bactéries d'origine alimentaire [en ligne]. (page consulté le 12/04/2023) <https://techniques-moleculaires-de-detection-de-bacteries-d-origine-alimentaire-re281/>
- Vitasse, M. (2007). Conception d'une nouvelle tête d'impression pour la réalisation de biopuces à l'ADN. Thèse de doctorat : Sciences et Ingénierie des Matériaux. Nancy : Université de Lorraine, 237 p.

W

Wang, L. (2014). IDENTIFICATION METHODS | DNA Hybridization and DNA Microarrays for Detection and Identification of Foodborne Bacterial Pathogens. Dans *Elsevier eBooks*, 10 (2), 310-317 <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-384730-0.00418-3>

Wernersson, R., & Nielsen, H. B. (2005). OligoWiz 2.0--integrating sequence feature annotation into the design of microarray probes. *Nucleic Acids Research*, [En ligne] (Page consulté le 15/03/2024) <https://doi.org/10.1093/nar/gki399>

Y

Yershov, G., *et al.* (1996). *Proc. of the National Academy of Sciences USA*, 93, 4913-4918.

Yu, J., Othman, M. I., Farjo, R., Zarepari, S., MacNee, S. P., Yoshida, S., & Swaroop, A. (2002). Evaluation and optimization of procedures for target labeling and hybridization of cDNA microarrays. *Mol Vis*, 8(17), 130-137.

Yves LL, Michel G (2009). *Staphylococcus aureus*. Paris : Lavoisier. 284.-(Repères)

Annexe

Annexes

Annexe 1. Critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires selon JORADP

Annexe 1.1. Viandes rouges et dérivés

Catégories des denrées alimentaires	Micro-organismes/ métabolites	Plan d'échantillonnage		Limites microbiologiques (ufc/g)	
		n	c	m	M
Carcasses, demi-carcasses, quartier ou pièces de bovins, d'ovins, de caprins et d'équidés	<i>Pseudomonas</i>	5	2	10 ⁴	10 ⁵
	Staphylocoques à coagulase +	5	2	10 ²	10 ³
	Enterobacteriaceae	5	2	10 ³	10 ⁴
	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 25 g	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	Absence dans 25 g	
Portion unitaire de viande rouge, réfrigérée ou congelée	<i>Pseudomonas</i> (3)	5	2	10 ⁵	10 ⁶
	<i>Escherichia coli</i>	5	2	10 ²	10 ³
	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 25 g	
Viande hachée	Germes aérobies à 30 °C	5	2	5.10 ⁵	5.10 ⁶
	<i>Escherichia coli</i>	5	2	50	5.10 ²
	Staphylocoques à coagulase +	5	2	10 ²	10 ³
	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 25 g	
Abats rouges en liers	Germes aérobies à 30 °C	5	2	5.10 ⁵	5.10 ⁶
	<i>Pseudomonas</i>	5	2	5.10 ⁵	5.10 ⁶
	<i>Escherichia coli</i>	5	2	10 ²	10 ³
	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 25 g	
Abats rouges tranchés	Germes aérobies à 30 °C	5	2	5.10 ⁵	5.10 ⁶
	<i>Pseudomonas</i> (3)	5	2	5.10 ⁵	5.10 ⁶
	<i>Escherichia coli</i>	5	2	10 ³	10 ⁴
	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 25 g	
Viandes séparées mécaniquement (VSM)	Germes aérobies à 30 °C	5	2	5.10 ⁵	5.10 ⁶
	<i>Escherichia coli</i>	5	2	50	5.10 ²
	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 10 g	
Préparations de viande	<i>Escherichia coli</i>	5	2	5.10 ²	5.10 ³
	Staphylocoques à coagulase +	5	2	5.10 ²	5.10 ³
	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 25 g	

Annexe 1.2. Viandes de volailles, de lapins et leurs dérivés

Catégories des denrées alimentaires	Micro-organismes/ métabolites	Plan d'échantillonnage		Limites microbiologiques (ufc/g)	
		n	c	m	M
Volailles, lapins entiers et découpes de volailles avec peau	<i>Escherichia coli</i>	5	2	$5 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^4$
	Staphylocoques à coagulase +	5	2	10^3	10^4
	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 10 g	
Découpes de volailles sans peau et coupes de lapins	<i>Escherichia coli</i>	5	2	10^3	10^4
	Staphylocoques à coagulase +	5	2	$5 \cdot 10^2$	$5 \cdot 10^3$
	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 10 g	
Produits à base de volaille destinés à être consommés cuits	<i>Escherichia coli</i>	5	2	$5 \cdot 10^2$	$5 \cdot 10^3$
	Staphylocoques à coagulase +	5	2	$5 \cdot 10^2$	$5 \cdot 10^3$
	<i>Campylobacter</i> spp, thermotolérants	5	0	10^2	
	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 25 g	
Abats crus de volaille	<i>Escherichia coli</i>	5	2	10^3	10^4
	Staphylocoques à coagulase +	5	2	$5 \cdot 10^2$	$5 \cdot 10^3$
	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 10 g	
Viande hachée de volaille	Germes aérobies à 30 °C	5	2	$5 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^7$
	<i>Escherichia coli</i>	5	2	$5 \cdot 10^2$	$5 \cdot 10^3$
	Staphylocoques à coagulase +	5	2	$5 \cdot 10^2$	$5 \cdot 10^3$
	<i>Campylobacter</i> spp, thermotolérants	5	0	10^2	
	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 25 g	
Viandes séparées mécaniquement (VSM)	Germes aérobies à 30 °C	5	2	$5 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^6$
	<i>Escherichia coli</i>	5	2	50	$5 \cdot 10^2$
	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 10 g	

Annexe 1.3. Produits de charcuterie à base de viande

Catégories des denrées alimentaires	Micro-organismes/ métabolites	Plan d'échantillonnage		Limites microbiologiques (ufc/g)	
		n	c	m	M
Charcuteries crues à consommer cuites	<i>Escherichia coli</i>	5	2	5.10 ²	5.10 ³
	<i>Staphylocoques</i> à coagulase +	5	2	5.10 ²	5.10 ³
	Anaérobies sulfite-réducteurs	5	2	30	3.10 ²
	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 25 g	
Charcuteries cuites ne contenant pas de féculents	Germes aérobies à 30 °C	5	2	10 ⁶	10 ⁷
	<i>Escherichia coli</i>	5	2	10	10 ²
	<i>Staphylocoques</i> à coagulase +	5	2	10 ²	10 ³
	Anaérobies sulfite-réducteurs	5	2	50	5.10 ²
	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 25 g	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100	
Charcuteries cuites avec féculents	Germes aérobies à 30 °C	5	2	10 ⁶	10 ⁷
	<i>Escherichia coli</i>	5	2	10	10 ²
	<i>Staphylocoques</i> à coagulase +	5	2	10 ²	10 ³
	Anaérobies sulfite-réducteurs	5	2	50	5.10 ²
	<i>Bacillus cereus</i>	5	2	10 ²	10 ³
	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 25 g	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100	

Annexe 1.4. Pâtisseries et ovoproduits

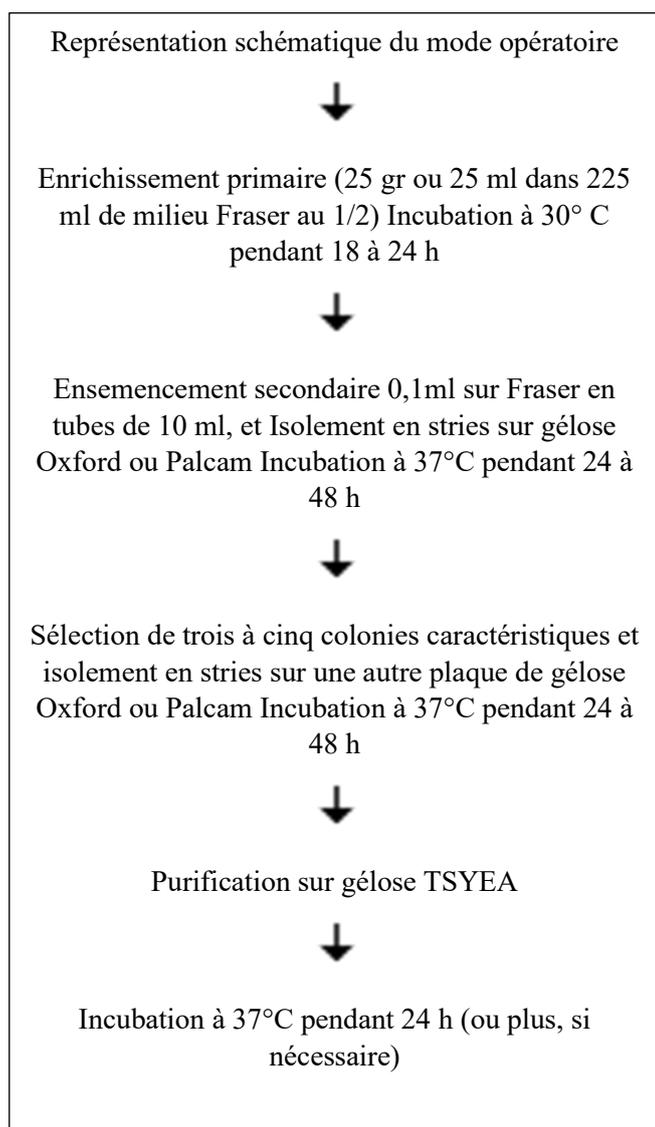
Catégories des denrées alimentaires	Micro-organismes/ métabolites	Plan d'échantillonnage		Limites microbiologiques (ufc/g ou ufc/ml)	
		n	c	m	M
Œufs en coques	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 25 g	
Œufs liquides pasteurisés, poudre d'œufs et d'albumen, autres œufs transformés	Germes aérobies à 30 °C	5	2	5.10 ⁴	5.10 ⁵
	Coliformes totaux	5	0	10 ²	
	Levures et moisissures	5	0	10 ²	
	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 25 g	
Préparations pour gâteaux contenant des œufs	<i>Staphylocoques</i> à coagulase +	5	2	10 ²	10 ³
	Moisissures	5	2	10 ²	10 ³
	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 25 g	
Pâtisseries à la crème, crèmes, mousse de fruits, tiramisu...	Germes aérobies à 30 °C	5	2	10 ⁵	10 ⁶
	<i>Escherichia coli</i>	5	2	10	10 ²
	Anaérobies sulfito-réducteurs	5	2	10	10 ²
	<i>Staphylocoques</i> à coagulase +	5	2	10 ²	10 ³
	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 25 g	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100	
Tout autre ovoproduit ayant subi un traitement thermique	Germes aérobies à 30°C	5	2	10 ⁵	10 ⁶
	<i>Staphylocoques</i> à coagulase +	5	0	Absence	
	Enterobacteriaceae	5	2	10	10 ²
	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 25 g	

Annexe 2. Méthode de recherche de *Listeria monocytogenes* dans le lait et les produits laitiers

Principe

En général, la recherche de *Listeria monocytogenes*, nécessite au moins quatre étapes successives tel qu'illustré par la représentation schématique du mode opératoire suivant :

Figure 1



Enrichissement primaire en milieu sélectif liquide

Prise d'essai de 25 gr ou 25 ml d'échantillon dans le milieu sélectif Fraser au demi. Incubation à 30°C pendant 18 à 24 h

Enrichissement secondaire et isolement primaire.

Après la période d'incubation du milieu procéder :

- D'une part, à l'enrichissement secondaire dans du bouillon Fraser en tubes à raison de 0,1 ml de la solution obtenue, à incuber à 37°C pendant 24h,
- Et d'autre part, à l'isolement primaire par stries sur une plaque de gélose Oxford ou Palcam. L'incubation se fera à 37°C pendant 24 à 48 heures.

Confirmation

Après la période d'incubation des milieux procéder :

- D'une part, à l'isolement secondaire par stries sur une plaque de gélose Oxford ou Palcam, à partir du bouillon d'enrichissement secondaire. L'incubation se fera à 37°C pendant 24 à 48 heures,
- Et d'autre part, à la lecture des plaques de gélose Oxford ou Palcam. Observer les colonies caractéristiques, et repiquer trois à cinq d'entre elles sur milieu TSYEA en vue d'une purification. L'incubation des plaques de gélose TSYEA se fera à 37°C pendant 24 à 48 heures.

Identification biochimique

Après la période d'incubation, procéder d'abord

- À l'identification du genre *Listeria* basée sur l'aspect morphologique des colonies, la coloration de Gram et sur la réaction Catalase,
- Puis à l'identification de l'espèce *Listeria monocytogenes*, basée essentiellement sur l'hydrolyse de l'esculine, la mobilité à 22-25°C, les réactions (Vaughan Prauskawer VP) et du rouge de méthyle, l'hémolyse ou le Camp-Test, la fermentation du glucose sans gaz, le type respiratoire.

Annexe 3.

DNA Microarray for Rapid Detection and Identification of Food and Water Borne Bacteria: From Dry to Wet Lab

Reza Ranjbar¹, Payam Behzadi^{2,*}, Ali Najafi¹ and Raheleh Roudi³

Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Department of Microbiology, College of Basic Sciences, Shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Oncopathology Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract:

Background:

A rapid, accurate, flexible and reliable diagnostic method may significantly decrease the costs of diagnosis and treatment. Designing an appropriate microarray chip reduces noises and probable biases in the final result.

Objective:

The aim of this study was to design and construct a DNA Microarray Chip for a rapid detection and identification of 10 important bacterial agents.

Method:

In the present survey, 10 unique genomic regions relating to 10 pathogenic bacterial agents including *Escherichia coli* (*E.coli*), *Shigella boydii*, *Sh.dysenteriae*, *Sh.flexneri*, *Sh.sonnei*, *Salmonella typhi*, *S.typhimurium*, *Brucella sp.*, *Legionella pneumophila*, and *Vibrio cholera* were selected for designing specific long oligo microarray probes. For this reason, the in-silico operations including utilization of the NCBI RefSeq database, Servers of PanSeq and Gview, AlleleID 7.7 and Oligo Analyzer 3.1 was done. On the other hand, the *in-vitro* part of the study comprised stages of robotic microarray chip probe spotting, bacterial DNAs extraction and DNA labeling, hybridization and microarray chip scanning. In wet lab section, different tools and apparatus such as Nexterion® Slide E, Qarray^{mini} spotter, NimbleGen kit, TrayMixTM S4, and Innoscan 710 were used.

Results:

A DNA microarray chip including 10 long oligo microarray probes was designed and constructed for detection and identification of 10 pathogenic bacteria.

Conclusion:

The DNA microarray chip was capable to identify all 10 bacterial agents tested simultaneously. The presence of a professional bioinformatician as a probe designer is needed to design appropriate multifunctional microarray probes to increase the accuracy of the outcomes.

Keywords: DNA Microarrays, DNA Microchips, Bioinformatics, DNA Probes, Bacteria.

Annexe 4.

An *in situ*-Synthesized Gene Chip for the Detection of Food-Borne Pathogens on Fresh-Cut Cantaloupe and Lettuce

Sarengaowa^{1,2,3}, Wenzhong Hu^{2,3*}, Ke Feng², Aili Jiang^{2,3}, Zhilong Xiu¹, Ying Lao³, Yuanzheng Li² and Ya Long²

¹ School of Bioengineering, Dalian University of Technology, Dalian, China, ² College of Life Science, Dalian Minzu University, Dalian, China, ³ Key Laboratory of Biotechnology and Bioresources Utilization, Ministry of Education, Dalian, China

Abstract:

Fresh foods are vulnerable to foodborne pathogens which cause foodborne illness and endanger people's life and safety. The rapid detection of foodborne pathogens is crucial for food safety surveillance. An *in situ*-synthesized gene chip for the detection of foodborne pathogens on fresh-cut fruits and vegetables was developed. The target genes were identified and screened by comparing the specific sequences of *Salmonella* Typhimurium, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157:H7 from the National Center for Biotechnology Information database. Tiling array probes were designed to target selected genes in an optimized hybridization system. A total of 141 specific probes were selected from 3,227 hybridization probes, comprising 26 *L. monocytogenes*, 24 *S. aureus*, 25 *E. coli* O157:H7, 20 *Salmonella* Typhimurium, and 46 *V. parahaemolyticus* probes that are unique to this study. The optimized assay had strong amplification signals and high accuracy. The detection limit for the five target pathogens on fresh-cut cantaloupe and lettuce was approximately 3 log cfu/g without culturing and with a detection time of 24 h. The detection technology established in this study can rapidly detect and monitor the foodborne pathogens on fresh-cut fruits and vegetables throughout the logistical distribution chain, i.e., processing, cleaning, fresh-cutting, packaging, storage, transport, and sale, and represents a valuable technology that support the safety of fresh agricultural products.

Keywords: *Salmonella* Typhimurium, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *in situ*-synthesized gene chip, tiling array, fresh-cut fruits and vegetables

Année universitaire : 2023-2024

Présenté par Boulahbal Isra
Boukroune Kawther
Boukerzaza Kaouther Fatima zohra

Application de la technologie des puces à ADN pour l'identification des bactéries pathogènes d'origine alimentaire.

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Biologie Moléculaire des Microorganismes

Résumé

La mondialisation du commerce alimentaire, associée à l'évolution des habitudes de consommation, a engendré une chaîne alimentaire plus complexe et, par conséquent, a accru le risque de contamination par des bactéries pathogènes. L'identification rapide et précise de ces bactéries est essentielle pour la prévention des épidémies et la protection de la santé publique. Dans ce contexte, l'objectif visé par ce travail bibliographique est de mettre l'accent sur les méthodes actuelles de détection des bactéries pathogènes dans les aliments, en s'intéressant plus particulièrement aux évolutions récentes vers des approches plus rapides et plus performantes telle que la technologie des puces à ADN. Cette dernière est proposée comme alternative aux techniques microbiologiques fondamentales qui reposent sur des approches usuelles longues et laborieuses. De plus, elles peuvent manquer de spécificité, surtout lorsqu'il s'agit de distinguer des souches bactériennes proches. L'adoption de cette technique pour la détection des pathogènes d'importance majeure dans le domaine alimentaire, représente une avancée significative, offrant des solutions fiables en matière d'efficacité et de rapidité contribuant à une meilleure protection de la santé publique.

Mots-clés : Bactéries pathogènes, sécurité alimentaire, identification bactérienne, puce à ADN, Hybridation moléculaire, sonde

Présidente du jury : Dr BOUBEKRI. Karima (MCA- U Constantine 1 Frères Mentouri).

Encadrante : Dr BOULTIFAT. Linda (MCB- UFM Constantine 1).

Examinatrice : Dr MERGOUD. Lilia (MAA- UFM Constantine 1),