

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université de Jijel

جامعة جيجل

Faculté des Sciences Exactes et Sciences
de la Nature et la Vie

كلية العلوم الدقيقة وعلوم الطبيعة والحياة

Département de Biologie Moléculaire et
Cellulaire

قسم البيولوجيا الجزيئية والخوية

**Mémoire de Fin d'Etude pour l'Obtention du Diplôme
des Etudes Supérieures en Biologie
Option : Microbiologie**



Intitulé

**Techniques de Biologie Moléculaire :
Application aux Microorganismes**

Membres de jury :

- Examinatrice : M^{elle} Amira Samiya
- Encadreur : M^{me} Abdelfatteh Farida

Présenté par :

- Bouchalma Zahia
- Benzeghioua Amina

Année universitaire : 2011/2012

Remerciement

C'est avec un grand plaisir que nous réservons ces lignes en signe de gratitude et de reconnaissance à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail

En premier lieu, nous remercions Dieu qui nous a donné du courage pour réaliser ce travail, et de la volonté pour réussir dans notre vie éducationnelle et privée.

Nous tenons à exprimer nos plus vifs remerciements à M^{me} ABDEL FATEH Farida qui a suivi notre travail, pour sa patience, ses précieux conseils et ses encouragements qui nous nous ont permis de trouver constamment l'aide dont nous avons besoins.

Notre respect à M^{lle} Samiya Amira pour avoir examiné et critiquer le contenu de notre mémoire.

Nous remercions aussi ensemble les enseignants du département de Biologie Moléculaire et Cellulaire qu'ils n'ont pas épargné d'efforts durant notre formation.

A nos parents, à nos frères et sœurs, nous adressons nos remerciements les plus chaleureux pour leur compréhension, leur encouragement incessant, leur soutien, leurs disponibilités et leur aide.

Et à nos camarades de notre promotion pour les bons moments inoubliables que nous avons vécus ensemble.



Sommaire

Introduction.....	1
Chapitre I : outils de la biologie moléculaire	
I- les outils enzymatiques.....	2
I-1- les enzymes de restriction.....	2
I-2 - les polymérases.....	3
I-2-1-Les ADN polymérases.....	3
I-2-1-1-L'ADN polymérase I.....	3
I-2-1-2- Le fragment de Klenow.....	3
I-2-1-3- l'enzyme Taq polymérase.....	3
I -2-1-4-La T4 ADN polymérase.....	3
I-2-2-Les ARN polymérases.....	3
I-2-3-La transcriptase inverse.....	3
I-3- Les ligases.....	4
II- Techniques de base de la biologie moléculaire.....	4
II-1 Extraction d'ADN.....	4
II-2- Les techniques de séparation (électrophorèse).....	5
II-2-1-Electrophorèse horizontale sur gel d'agarose.....	5
II-2-2-Electrophorèse verticale sur gel de polyacrilamide.....	5
II-2-3- Electrophorèse sur gel d'agarose en champ pulsé (PFGE).....	5
II-3- les techniques d'hybridation.....	5
II-3-1-Southern blot.....	5
II-3-2-Northern blot.....	6
II-3-3-Technique du « dot-blot » ou « slot-blot ».....	6
II -3-4- Hybridation <i>in situ</i>	6
II-4- Les techniques d'amplification.....	7
II-4-1 La PCR.....	7
II-4-2- Les dérivées de la PCR.....	8
II-4-2- 1-La RT-PCR (Reverse transcription PCR).....	8
II-4-2-2-LA-PCR (Long accurate PCR).....	8
II-4-2-3- La PCR quantitative en temps réel.....	9
II-4-2- 4-La PCR Multiplexe.....	9
II-5- les techniques séquençages d'ADN.....	9
II-5-1-Méthode de Sanger.....	9

II-5-2-Méthode de Maxam et Gilbert.....	9
II-5-3-méthode de séquençage informatique.....	10
Chapitre II : Détection et identification moléculaire des microorganismes	
I- Détection par amplification (PCR).....	12
I-1- Extraction de l'ADN.....	12
I-2- Les amorces.....	12
I-3 Amplification.....	13
I-4 Visualisation de gène recherché.....	13
II-Détection par RFLP.....	13
II-1-Extraction de l'ADN.....	14
II-2- Digestion par des enzymes de restriction et électrophorèse.....	14
II-3-Transfert de l'ADN selon la méthode de Southern.....	14
II-4-Hybridation de l'ADN.....	15
III-Détection par puce à ADN.....	15
III-1-Principe.....	15
III -2-Les différentes puces.....	18
III-3 -Les puces à ADN comme outils de détection.....	18
IV-Avantages et inconvénients des techniques de biologie moléculaire.....	18
IV-1-Avantages.....	18
IV-2-Inconvénients.....	19
Chapitre III : Microorganismes recombinants	
I-Obtention d'un microorganisme recombinant.....	20
II-Production de l'insuline.....	22
III- La production d'hormone humaine dans des bactéries.....	24
IV-les vaccins à base des micro-organismes recombinants.....	26
IV-1-Les vaccins bactériens recombinants.....	27
IV-2 Les vaccins à base des virus	28
Conclusion.....	30
Les références.....	31

A: adenine

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire

ADNr: acide désoxyribonucléique ribosomique

ATP: Adénosine triphosphate

C° : degré Celsius

C: cytosine

DdNTP: didésoxyribonucléotides

DNTP: désoxyribonucléotides

E .coli: Escherichia coli

G: guanine

GH: Growth Hormone

Kb: kilo base

KDa: kilo Dalton

LA-PCR: Long accurate PCR

OH: hydroxyle

Pb: paires de base

PCR: polymérisation chaîne réaction

PFGE: Pulsed Field Gel Electrophoresis

pH: potentiel hydrogène

RFLP: Polymorphisme de longueur des fragments de restriction

RT-PCR: Reverse transcription PCR

SDS: dodécyl sulfate de sodium

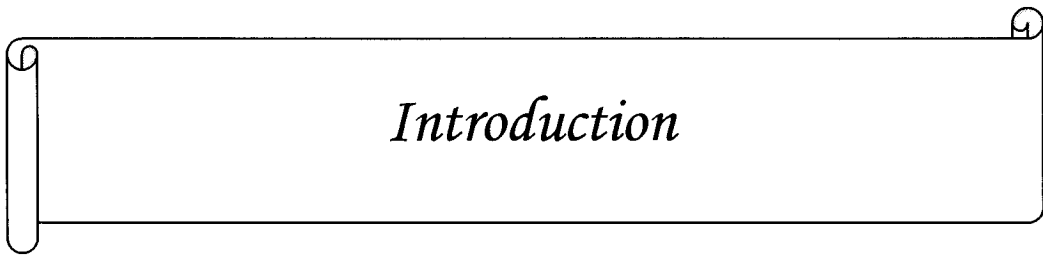
T: thymine

TE : Tris EDT

UH: unités d'hybridation

VM : virus myxomateux

Figure1 : Extraction de l'ADN.....	4
Figure 2 : Southern blot.....	6
Figure 3 : Principe de la PCR.....	8
Figure4 :Méthode de séquençage informatique	11
Figure 5 : Principe de RFLP.....	14
Figure 6 : Principe de puce à ADN.....	17
Figure7 : Clonage et expression de gènes chez la bactérie.....	21
Figure8 : Production de l'insuline par <i>E .coli</i>	23
Figure 9 : La production d'hormone humaine par <i>E. coli</i>	25
Figure 10 : Les différents principes de fabrication des vaccins.....	26



Introduction

L'émergence des techniques de biologie moléculaire dans la quasi-totalité des disciplines biologiques a marqué cette fin de siècle. La biologie moléculaire regroupe un ensemble de techniques basées sur l'étude, la détection et la modification des acides nucléiques. Au cours des 35 dernières années, les méthodes et les techniques de biologie moléculaire ont évolué de façon fulgurante. La découverte des premières enzymes de restriction au début des années 70 puis des techniques d'hybridation et de séquençage ont été quelques-uns des points tournants en biologie moléculaire (**Fortier, 2006**).

Les techniques de biologie moléculaire apportent aujourd'hui des solutions efficaces et rapides pour le contrôle microbiologique des aliments ainsi que le diagnostic de certaines maladies infectieuses avant même que les symptômes n'apparaissent. Les méthodes conventionnelles pour la détection et l'identification des microorganismes, cependant, comprennent généralement des sous-cultures multiples et des étapes d'identification du biotype ou, sérotype et donc sont laborieux et de longue haleine (**Swaminathan et Feng, 1994**).

En outre, les progrès de la biologie moléculaire ont donné naissance à un ensemble d'outils et de techniques permettant la manipulation, la modification du matériel génétique à des fins pratiques. À l'heure actuelle, il est possible d'identifier, d'isoler, de transférer et de modifier de manière contrôlée le matériel génétique des microorganismes. Que l'on parle de virus, de cellules bactériennes ou fongiques, ils peuvent tous faire l'objet d'une manipulation génétique.

Les premières applications de ces biotechnologies ont été la production de protéines eucaryotes utiles à l'homme (l'insuline, l'hormone de croissance, les vaccins) par des microorganismes dont le patrimoine génétique a été modifié dans ce but.

Toutes ces applications des biotechnologies sont régulièrement au cœur de l'actualité car les avancées ne concernent pas que les scientifiques, mais l'ensemble de la société : même si elles sont porteuses d'espoir, elles suscitent un certain nombre d'interrogations voire même d'inquiétudes.

Ce présent travail est réalisé dans le but de contribuer à une meilleure connaissance des techniques de biologie moléculaires appliquées aux microorganismes.

Ce travail est organisé en trois chapitres :

Dans le premier chapitre, nous rappellerons les outils et les techniques fondamentales de la biologie moléculaire.

Dans le deuxième chapitre, nous présenterons quelques techniques de détection moléculaire des microorganismes.

Dans le dernier chapitre, nous essayerons d'expliquer l'intérêt de l'utilisation des microorganismes en biologie moléculaire en donnant quelques exemples illustratifs de microorganismes recombinants.



Chapitre I : Outils de la biologie moléculaire

I- Les outils enzymatiques

I-1 les enzymes de restriction

Les enzymes de restriction sont extraites de micro-organismes, le plus souvent des bactéries. Ces dernières peuvent être parasitées par des virus à ADN, elles fabriquent alors des enzymes de restriction qui sont capable de cliver les ADN étrangers. Ce clivage se déroule dans des sites particuliers reconnus par l'enzyme. Le nombre de ces enzymes est de l'ordre de centaines, chaque enzyme reconnaît une séquence d'ADN qui lui est spécifique, elles appartiennent à la classe des endonucléases, c'est -à dire des enzymes capable de cliver les liaisons phosphodiester entre deux nucléotides à l'intérieure d'un acide nucléique (**Moulessehoul, 2008 ; Hamdan et al. , 2011**).

Les enzymes de restriction sont capables de reconnaître spécifiquement une courte séquence, de 4 à 10Pb, et de cliver l'ADN au site reconnu. Ces séquences sont habituellement des séquences dites *palindromique*. Ce sont des séquences ou la succession des nucléotides lue dans le sens 5'→ 3' pour le premier brin est identique à la séquence lue dans le sens 5'→3' pour le second brin. Certains enzymes coupent le site en son milieu et produisent deux fragments dont les extrémités sont franches. Cependant, la plupart réalisent une coupure dissymétrique : on parle dans ce cas d'extrémités cohésives. Plusieurs centaines de ces enzymes ont été caractérisés : ils reconnaissent une grande variété de sites de coupure (**Moulessehoul, 2008, Hamdan et al. , 2011**).

La nomenclature des enzymes de restriction est diverse selon le genre et l'espèce de la bactérie d'où a été extraite l'enzyme, leur nom comporte plusieurs lettres (3 ou 4). La première lettre de dénomination est écrite en majuscule correspond au genre de la bactérie, la seconde lettre et la troisième lettre (en minuscules) correspondent à l'espèce de la bactérie, On peut avoir une quatrième lettre écrite en majuscule correspondent à la souche bactérienne. Enfin pour terminer, un chiffre romain indique l'ordre de caractérisation de ces enzymes (Exemple : Eco RI est la 1^{ère} enzyme extraite d'*Escherichia coli* RYB).

En biologie moléculaire l'utilisation des enzymes de restriction est très nombreuse par exemple :

- elles permettent de fractionner l'ADN en multiples fragments susceptibles d'être séparés par les techniques d'électrophorèses ;
- elles peuvent être utilisées pour préparer un fragment d'ADN d'un gène donné (insert) à être inséré dans un vecteur comme un plasmide ;
- elles sont utilisées couramment pour rechercher des mutations dans le génome (**Moulessehoul, 2008**).

I-2 les polymérases

Plusieurs enzymes possèdent une activité polymérase des acides nucléiques

I-2-1 Les ADN polymérases

Ces enzymes sont des polymérases ADN dépendantes recopiant un ADN en ADN. Elles ne sont pas capables de synthétiser le nouveau brin d'ADN sans la présence d'une amorce d'acide nucléique.

a- L'ADN polymérase I

L'ADN polymérase I n'est pas l'enzyme responsable de la synthèse de l'ADN, mais elle effectue diverses tâches lors de la réplication, la réparation ou des recombinaisons de l'ADN. C'est une chaîne polypeptidique unique de 103 kDa qui possède, outre une activité polymérase et une activité exonucléase de relecture 3'→5', une activité exonucléase 5'→3' localisée dans un domaine qui peut être séparé de l'enzyme par un traitement protéasique limité. Lorsque ce domaine est éliminé, il demeure un fragment de 68 kDa, dit fragment de Klenow (**Weinman et Méhul, 2004**).

b- Le fragment de Klenow

La digestion de l'ADN polymérase I par une protéase (subtilisine) donne deux fragments, dont le fragment de Klenow (76 kDa) qui possède encore les activités polymérase 5'→3' et exonucléase 3'→5' mais dépourvue de l'activité exonucléase 5'→3' (**Housset et Raisonnier, 2010**).

c- La Taq polymérase

C'est une polymérase thermostable, extraite d'une bactérie (*Thermus aquaticus*) des sources chaudes (80-90°C). D'autres enzymes thermorésistantes sont actuellement utilisées proviennent d'autres microorganismes : la **Pfu** extraite de *Pyrococcus furiosus* et **Vent** extraite de *Thermococcus litoralis*.

d- La T4 ADN polymérase

Produite au sein des bactéries infectées par le phage T4. Ses activités sont semblables à celles du fragment de Klenow (**Etienne et al., 2006**).

I-2-2 Les ARN polymérases

Les ARN polymérases de tous les organismes transcrivent l'un des deux brins de la double hélice de l'ADN en un ARN simple brin. La synthèse s'effectue sans amorce à partir du promoteur (site de fixation et d'initiation de l'enzyme) et nécessite toujours les ribonucléotides triphosphates et du Mg²⁺ comme cofacteur, dans le sens 5'→3' (**Jacques et Simpoire, 1999**).

I-2-3 La transcriptase inverse

La transcriptase inverse ou rétrotranscriptase (en anglais *reverse transcriptase* ou encore RT) est une enzyme utilisée par les rétrovirus (virus à ADN) qui transcrivent l'information génétique des virus de l'ARN en ADN, qui peut s'intégrer dans le génome de l'hôte (**Zhu, 2001 ; Etienne, 2010**).

I-3 Les ligases

Les ligases sont capables de lier par une liaison ester un fragment avec un groupement phosphate en 5' et un groupement OH en 3' et ceci en présence d'ATP. Elles peuvent effectuer des ligatures sur des fragments d'ADN avec bouts francs ou des bouts collants (ou extrémités cohésives). Elles sont extraites de bactéries. Il existe des ADN et des ARN ligases (**Griffiths et al. , 2001**).

II- Techniques de base de la biologie moléculaire

II-1 Extraction d'ADN

Le procédé classique est l'extraction par le couple phénol-chloroforme. Le phénol est un excellent agent dénaturant des protéines et il permet de séparer efficacement les protéines et les acides nucléiques (**Moulessehoul, 2008**).

Cette technique est montrée dans la figure 1 et est réalisée en 3 étapes:

- La première consiste à lyser les cellules en incubant à 55°C les échantillons dans une solution d'extraction contenant de la protéinase K pendant 4 heures au minimum.
- La seconde étape comprend une phase de déprotéinisation au phénol. Ensuite, les traces de phénols sont éliminées par ajout de chloroforme.
- La dernière étape consiste à précipiter les acides nucléiques au froid pendant une heure puis à laver le culot avec une solution d'éthanol. Il faut ensuite dissoudre le précipité d'ADN dans du TE (tris EDT) (**Gigas et Angulata, 1998**).

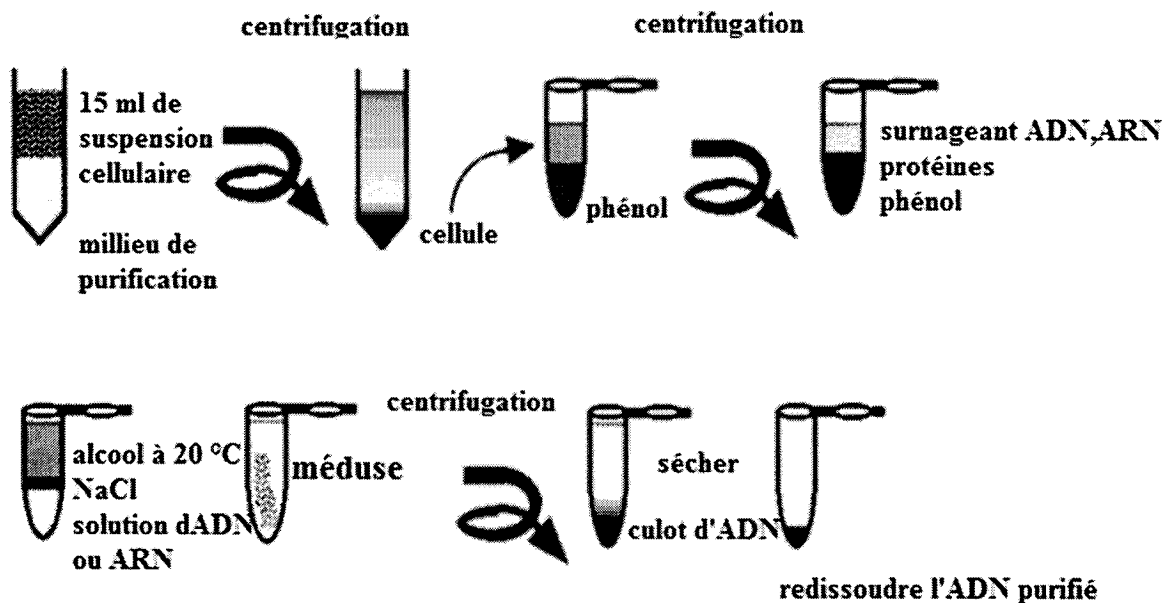


Figure 1 : Extraction de l'ADN (**Housset et Raisonier, 2010**).

II-2 Techniques de séparation (électrophorèse)

Les différents types d'électrophorèses utilisées dans les laboratoires de biologie moléculaire, permettent de séparer les acides nucléiques en fonction de leur taille:

II-2-1 Electrophorèse horizontale sur gel d'agarose

Permet de séparer les fragments d'ADN de 300 à 10 000 paires de bases en fonction de la concentration du gel en agarose (**Jacques et Simpore, 1999**).

II-2-2 Electrophorèse verticale sur gel de polyacrilamide

Permet de séparer les fragments d'ADN dont les longueurs vont de 1 à 1 000 nucléotides en fonction de la longueur du gel et de la tension appliquée (de 1 000 à 2000 volts / cm) (**Jacques et Simpore, 1999**).

II-2-3 Electrophorèse sur gel d'agarose en champ pulsé (PFGE)

Permet de séparer des fragments d'ADN double brin dont la taille peut varier de 220 000 à 2 500 000 paires de bases. Cette technique est aussi mise à profit pour la séparation des chromosomes interphasiques. (PFGE pour Pulsed Field Gel Electrophoresis) (**Jacques et Simpore, 1999**).

II-3 Techniques d'hybridation

Les techniques d'hybridation permettent de détecter une séquence donnée parmi une population d'autres séquences, à l'aide d'une sonde, un fragment d'ADN dont la séquence est complémentaire de celle recherchée. La sonde est marquée par incorporation d'atomes radioactifs ou de groupements fluorescents. La détection d'une séquence homologue à la sonde est possible en vertu de l'appariement spécifique des séquences complémentaires (**Bernot, 1999**).

II-3-1 Southern blot

L'ADN cible (celui que l'on étudie) est un mélange de fragments, obtenus par digestion enzymatique, séparés par électrophorèse et transférés sur membrane (fig : 2). Il est alors possible de déterminer si un fragment correspondant à la sonde utilisée est présent dans l'ADN cible, et dans l'affirmative de déterminer la taille du fragment correspondant.

L'hybridation permet aussi de réaliser le criblage d'une banque : dans ce cas, l'ADN cible est représenté par l'ensemble des clones d'une banque répartis sur une membrane, et il est alors possible d'identifier les clones contenant une séquence apparentée à celle de la sonde (**Bernot, 1999**).

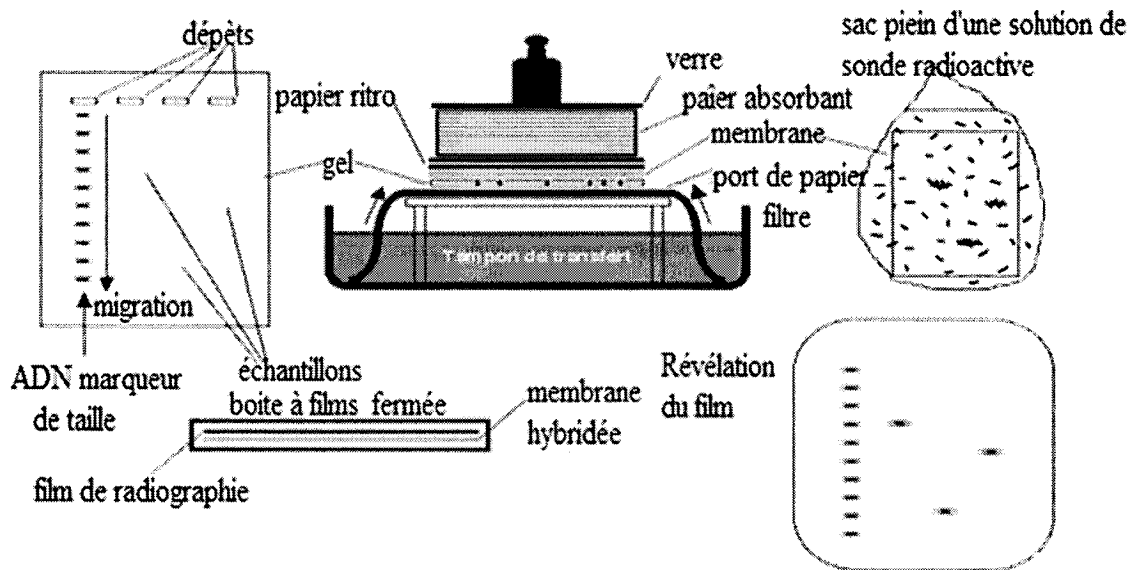


Figure 2: Southern blot (Housset et Raisonnier, 2010).

II-3-2 Northern blot

Le northern blot est une adaptation de la technique de southern blot qui permet de détecter des séquences spécifiques d'ARN. Hormis la dénaturation qui est inutile pour l'ARN, la technique est similaire à celle du southern blot effectués (Etienne *et al.*, 2006).

II-3-3 Technique du " dot-blot " ou " slot-blot "

Dot signifie tache en anglais. Technique d'une grande simplicité, la dot blot est utilisée pour l'étude de petits fragments d'ADN ou des ARN. Un échantillon est déposé sur un filtre en nylon. Contrairement au southern blot, il n'y a pas d'étape préalable de digestion par des enzymes de restriction ni d'électrophorèse. Comme pour la technique de southern, dénaturation, hybridation, lavage et autoradiogramme sont ensuite effectués (Etienne *et al.*, 2006).

II -3-4 Hybridation *in situ*

Technique de cartographie génétique moléculaire dans laquelle des sondes marquées sont hybridées à des chromosomes en métaphase colorés, puis exposées à un film radiographique pour révéler la position de la sonde (lynn *et al.*, 2004).

II-4 Techniques d'amplification

II-4-1 La PCR

Mise au point dans les années 80, la technique de réaction de polymérisation en chaîne ou PCR (pour polymérisation chaîne réaction) a ouvert de nouvelles voies dans l'étude et l'analyse des acides nucléiques et des gènes (**Maftah et Julien, 2003**). Cette technique permettant de produire un nombre extrêmement élevé de copies, d'une séquence spécifique d'ADN. Elle est fondée sur le principe simple que si l'on réplique (polymérise) 2 brins d'ADN, on obtient 4 brins. Si on réplique à nouveau ces 4 brins, on obtient 8 brins et ainsi de suite (**Misra, 2007 ; Durant, 1997**) figure 3.

Les trois étapes, constituant un cycle de PCR, sont effectuées à des températures différentes permettant de contrôler l'activité enzymatique.

1. l'étape de **dénaturation**, est réalisée à environ 95°C, pour une dissociation complète des deux brins d'ADN.
2. L'étape d'**hybridation** se fait à une température qui sera définie selon la nature des amorces (cette température varie de 50 à 60°C). Cette température va déterminer la stabilité des hybrides une fois que l'appariement amorces / matrice est réalisé.
3. L'étape de **polymérisation (ou élongation)** est à environ 72°C, température optimale de l'ADN polymérase thermorésistante utilisée. Au cours de cette étape, les brins complémentaires d'ADN sont synthétisés à partir des extrémités 3'OH libre des amorces hybridées (**Griffiths et al. , 2001; Iglesias, 2009**).

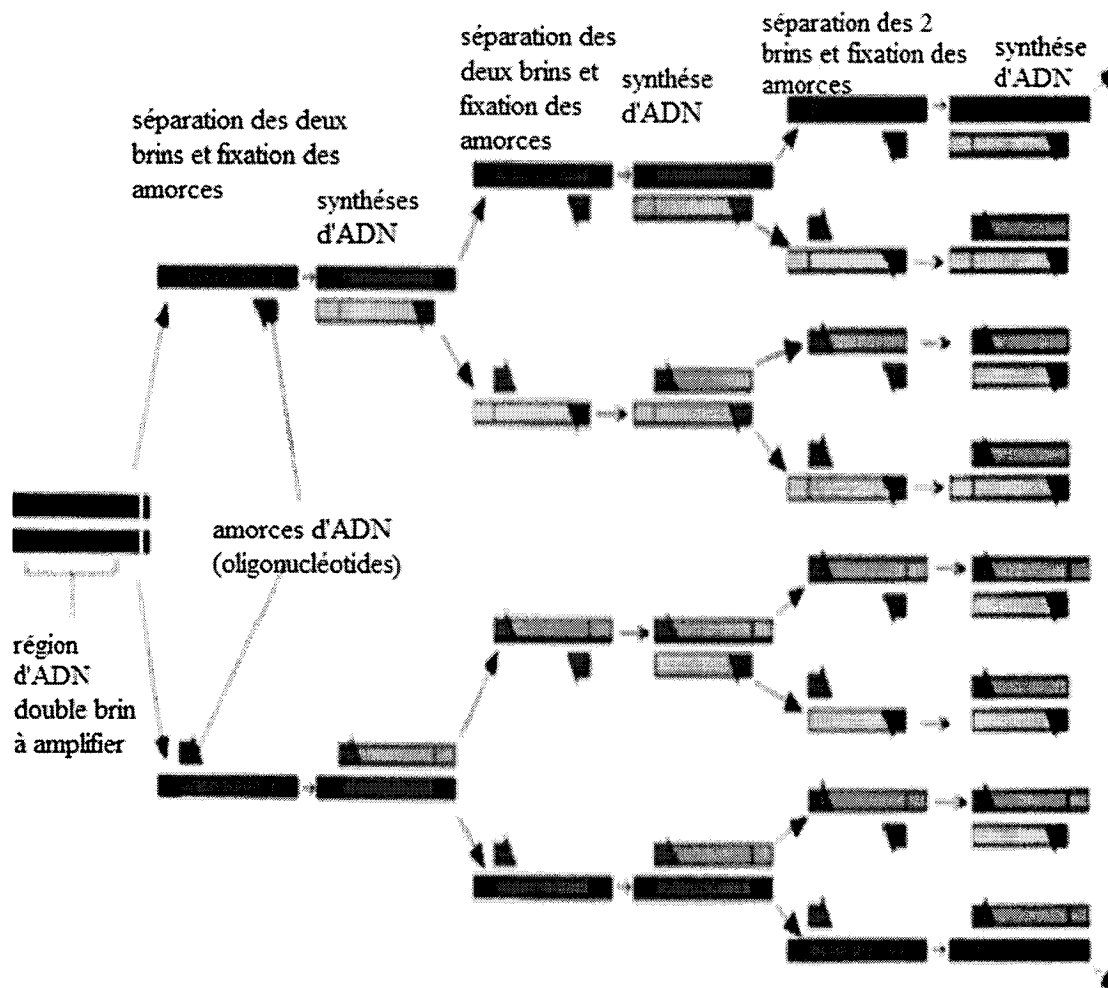


Figure 3 : Principe de la PCR (Housset et Raisonnié, 2010).

II-4-2 Les dérivées de la PCR

II-4-2-1 La RT-PCR (Reverse transcription PCR)

La polymérase thermostable utilisée dans la PCR de base utilise un substrat d'ADN. Dans certains cas, il est plus indiqué d'amplifier de l'ARN, pour appliquer la PCR à l'étude d'ARN, l'échantillon d'ARN doit d'abord être retranscrit en ADNc, pour fournir le substrat d'ARN utilisable par la polymérase thermostable. Ce processus s'appelle transcription inverse (Reverse Transcription), d'où l'appellation de RT-PCR.

Les rétrotranscriptase des virus de la myéloblastose aviaire ou de la leucémie murine Moloney sont couramment utilisées pour produire une copie ADN de la matrice d'ARN (Primrose *et al.*, 2004).

II-4-2-2 LA-PCR (Long accurate PCR)

L'efficacité d'amplification et par conséquent, la quantité de fragment amplifié diminue de façon significative pour des séquences de plus de 5 kb. Afin de remédier à ce problème on fait appel à la LA-PCR (amplification de long fragment avec une haute-fidélité-PCR).

Barnes(1994) et Cheng *et al* (1994) ont identifié les facteurs critiques pour la polymérisation thermostable de longs fragments. Le plus significatif d'entre eux est l'absence d'activité exonucléase de 3' → 5' (activité éditrice) de la *Taq* polymérase. Il est probable que quand la *Taq*

polymérase incorpore un dNTP incorrecte, l'élongation ultérieure de la chaîne est fortement ralentie voire arrêtée complètement, la solution consiste à ajouter une seconde polymérase thermostable possédant une activité éditrice au mélange réactionnel (**Primrose et al. , 2004**).

II-4-2-3 La PCR quantitative en temps réel

Il ya une relation directe entre la quantité de matériel de départ (la séquence cible) et la quantité de produit formé après un nombre donné de cycles de réaction, Higuchi et al (1992,1993) furent les premiers à mesurer la quantité des produits de PCR au fur et à mesure de leur accumulation en utilisant le bromure d'éthidium. L'amplification produit des quantités croissantes d'ADN double brin qui fixe le bromure d'éthidium, ce qui s'accompagne d'une augmentation de la fluorescence (**Primrose et al. , 2004**).

II-4-2- 4 La PCR Multiplexe

Elle permet l'amplification, en une seule réaction, de plusieurs séquences cible d'ADN distinctes. Les couples d'amorces correspondant aux différentes cibles sont introduits dans le même type réactionnel (**Ameziane et al. , 2006**).

II-5- les techniques séquençages d'ADN

Il existe plusieurs méthodes de séquençage de l'ADN les deux premiers, en 1977, seront retenues : celle de Maxam et Gilbert par clivage chimique spécifique du segment d'ADN initial, puis celle de Sanger par synthèse enzymatique (**Pompidou, 1999**).

Aujourd'hui on utilise des méthodes hautement automatisées avec des marqueurs fluorescents qui remplacent les marqueurs radioactifs classiques (**Schmid, 2005**).

II-5-1 Méthode de Sanger

La méthode de Sanger s'appelle aussi méthode aux didésoxyribonucléotides, cette méthode est effectuée à partir des quatre réactions de polymérisation séparées, chacune en présence d'une faible concentration d'un des quatre ddNTP et de concentrations normales, plus élevées, des quatre désoxynucléoside triphosphates (dNTP) classiques.

Dans chaque tube à réaction, le ddNTP s'incorpore au hasard dans la position du dNTP correspondant, en mettant un terme à la polymérisation, car l'absence de groupe hydroxyle en 3' empêche l'addition du nucléotide suivant les mélanges réactionnels de fragments terminés prématurément sont chacune soumis en parallèle à une électrophorèse en gel, et les fragments, une fois séparés, repérés par autoradiographie (**Baltimore et al., 1997**).

II-5-2 Méthode de Maxam et Gilbert

La technique chimique de Maxam et Gilbert qui a rendu de très grands services au début du séquençage est actuellement beaucoup moins utilisée que la technique de Sanger (Gilbert et Sanger reçurent tous deux le prix Nobel de Chimie en 1980) (**Etienne, 1999**).

L'ADN à séquencer est marqué en 5' avec (γ p³²) d'ATP puis clivé après A, G, C, ou T par divers réactifs chimiques. Par exemple le diméthylsulfate est un réactif qui méthyle la guanine sur l'azote en 7 et l'adénine sur l'azote en 3. La liaison glycosidique d'une purine méthylée est instable et est facilement rompue par chauffage, laissant ainsi libre la fonction semi-aldéhyde de l'ose. Mais dans le squelette sucre-phosphate, l'endroit où se trouve un ose non relié à une base représente un point faible. Ainsi, le clivage ose-phosphate, (donc du squelette), se fera facilement de part et d'autre de cet ose (au niveau des liaisons ester en 5' et 3'). En jouant sur les conditions opératoires, on peut favoriser le clivage en G ou en A (**Etienne, 1999**).

Pour la cytosine et la thymine, le réactif utilisé dans un premier temps est l'hydrazine. En fait le clivage n'est pas effectué au niveau d'une base seulement, mais au niveau de 2 bases, l'un des 2 clivages étant grandement privilégié. Après clivage, les différents fragments obtenus sont séparés par électrophorèse. L'examen de l'autoradiogramme correspondant permet de connaître la séquence du brin analysé (Etienne, 1999).

II-3 Méthode de séquençage informatique :

La méthode préférée aujourd'hui repose sur les étapes de la méthode de Sanger –Coulson, modifiées à plusieurs reprises, le séquençage d'ADN double brin à l'aide d'une amorce spécifique dans une réaction proche de la PCR, le marquage des quatre types de fragments de terminaison de chaîne n'est pas réalisé à l'aide de didésoxynucléotides marqués aux radio-isotopes, mais directement à l'aide de quatre dérivés des didésoxynucléotides, couplés chacun à un marqueur de fluorescence spécifique. Cette technique permet le séquençage des quatre nucléotides dans une seule préparation réactionnelle et permet aussi, après séparation des fragments d'ADN de longueurs différentes par électrophorèse sur gel, la détection des masses moléculaires des fragments pour en déduire directement la séquence d'ADN (Schmid, 2005) figure 4.



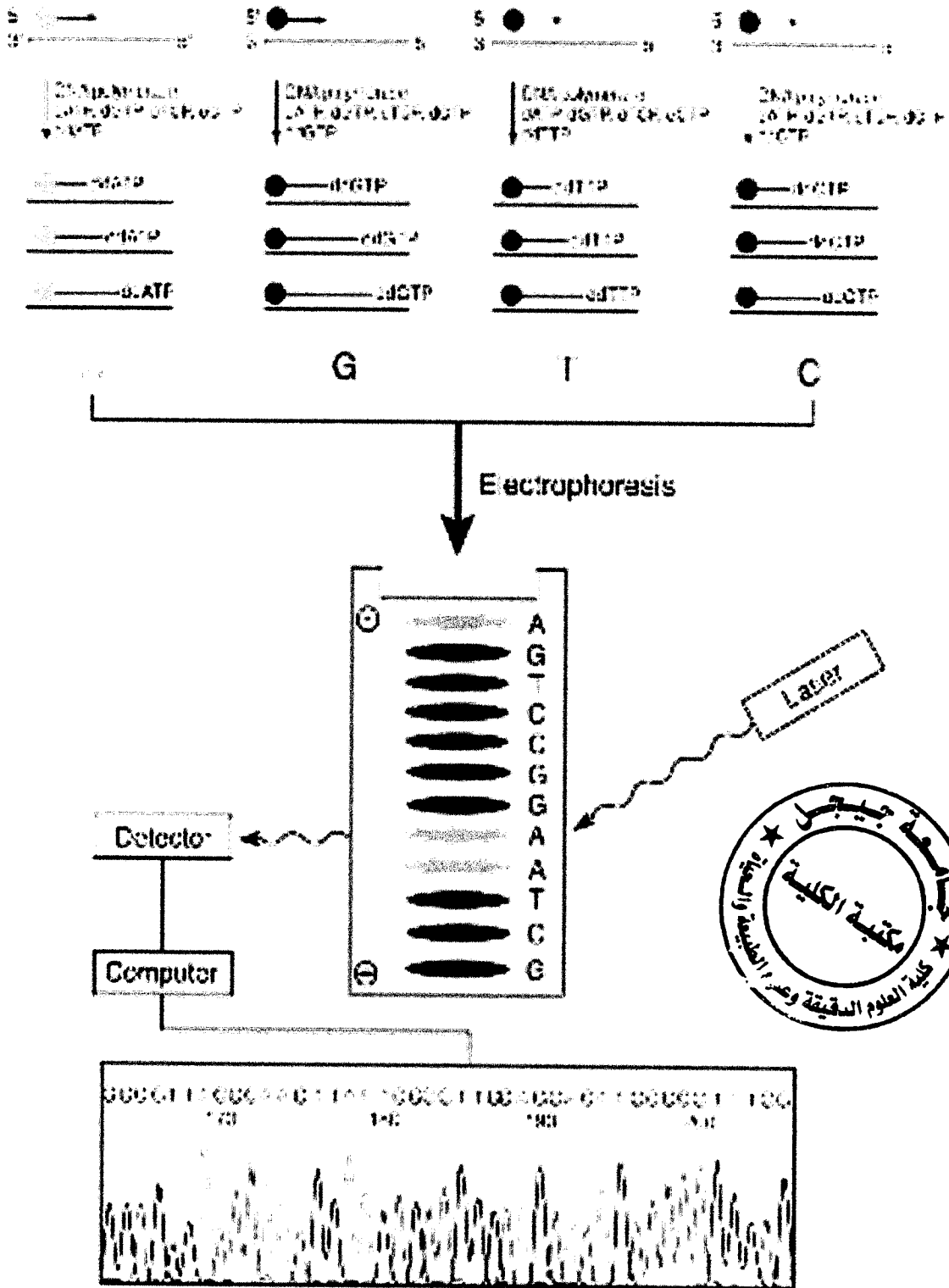
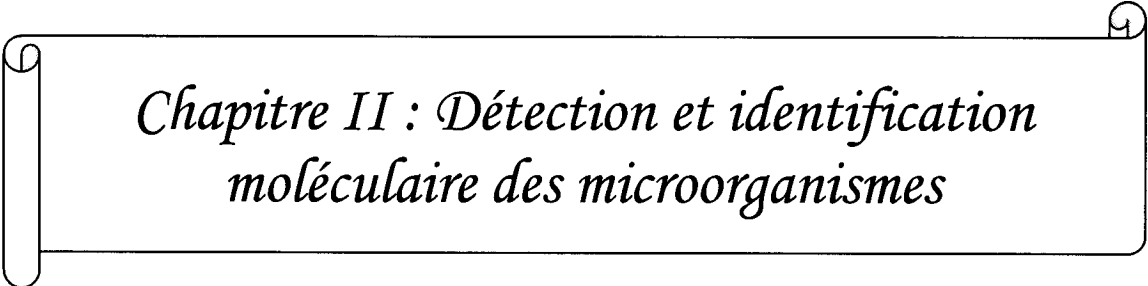


Figure 4 : Méthode de séquençage informatique (Lionnet et Croquette, 2005).



*Chapitre II : Détection et identification
moléculaire des microorganismes*

De nombreuses méthodes permettant la détection de micro-organismes s'appuient sur des caractères phénotypiques. La croissance, la multiplication, la forme, la taille, le comportement vis à vis de réactifs comme les colorants, les propriétés biochimiques et les structures protéiques font notamment partie des caractères phénotypiques des microorganismes. Ces méthodes sont généralement lentes et parfois incertaines, actuellement, de nouvelles méthodes de détection plus spécifiques, rapide et capables de différencier les microorganismes en fonction de leurs propriétés génotypiques, ont été développées (**Gassen et al., 2004**).

I- Détection par PCR

Depuis 1985, l'utilisation de la PCR Pour la détection des microorganismes est croissante. Elles permettent d'identifier une bactérie dans un produit pathologique ou une culture. Le principe sur lequel elles reposent consiste à amplifier un gène entier ou non, avec des amorces spécifiques, qui peut être ultérieurement révélé par électrophorèse sur gel ou capillaire, par hybridation, ou encore séquencé et comparé avec des séquences déposées dans des banques de données (par exemple, EMBL, NCBI, BiBi, Genebank) (**Carol (sd)**).

I-1 Extraction de l'ADN

L'extraction d'ADN est la première étape pour beaucoup de technologies basées sur l'ADN. L'ADN peut être extrait en utilisant l'extraction phénol-chloroforme ou des kits d'extraction appropriés, disponibles sur le marché et qui ont l'avantage de ne plus nécessiter de phénol, ni de chloroforme et de permettre ainsi l'isolement très rapide de l'ADN. Après isolement, l'ADN est conservé à - 20 ° C (**SupAgro, 2006**).

I-2 Les amorces

Selon le couple d'amorce utilisé pour l'amplification on peut distinguer :

❖ PCR universelle bactérienne

Dans le domaine de la bactériologie, la PCR universelle ADN_r 16S, suivie de la détermination de la séquence génétique amplifiée, est une technique de plus en plus utilisée. En effet, la séquence nucléotidique de l'ADN_r16S présente des régions hautement conservées et communes à toutes les bactéries, tandis que d'autres régions sont spécifiques d'espèce. L'amplification par PCR de l'ADN_r 16S peut être effectuée à partir d'une colonie bactérienne sans extraction préalable. Cette amplification du génome bactérien dite universelle peut également être réalisée directement à partir de produits pathologiques. Les Segments amplifiés sont séquencés et analysés par comparaison avec ceux déposés dans les banques de données. Deux banques de données sont interfacées entre elles et Consultables par de nombreux sites internet: EMBL, la banque européenne (Cambridge, European Bioinformatic sinstitute) et Gen Bank aux USA (National Center for Biotechnology Information). Il s'agit de balayer rapidement l'énorme quantité d'information contenue dans les banques en écartant les séquences sans homologies pour ne retenir que les séquences proches. BIBI (Université Lyon 1), BLAST et FASTA sont des serveurs permettant l'interrogation de la banque de données et de réaliser des analyses phylogénétiques. Les amorces utilisées sont les suivantes 5'-ACTCCTACGGGAGGCAG-3' et 5'-TACCTTGTTACGACTT-3' (**Géraldine et Sébastien, 2003**). Les applications de cette PCR universelle ADN_r16s sont diverses et fonction du type d'analyse à effectuer. Elles peuvent également permettre, en s'appuyant sur des régions plus spécifiques d'espèces, d'identifier une bactérie donnée à partir d'un échantillon Polymicrobien (Gain de temps et de sensibilité). Diverses techniques de révélation sont possibles : hybridation, restriction ou séquençage (**Géraldine et Sébastien, 2003**).

❖ PCR spécifique bactérienne

A partir du produit de cette PCR universelle, on peut réaliser une amplification spécifique pour chaque type de bactérie. On utilise pour cela une troisième amorce au fragment de 1100 paires de bases précédent et spécifique de la signature de chaque bactérie (Dans le cas de *Yersinia enterocolitica*, cette amorce a pour séquence : (Ye : 5'-TAGCAGAGATGCTTTAG-3'). Et le produit de PCR attendu possède une taille de 501 paires de bases (**Buffet et al (SD)**).

I-3 Amplification

Un mélange réactionnel comprend la Taq polymérase, les 4 dNTP's et la paire d'amorce auquel est ajouté l'ADN extrait est réalisé et distribué dans des microtubes.

Afin de valider les résultats, des témoins sont toujours utilisés

- ❖ *Un témoin négatif d'amplification* constitué du mélange réactionnel et d'eau stérile remplaçant l'extrait d'ADN afin de vérifier la contamination possible des réactifs utilisés. Aucune bande ne sera visible lors de la visualisation des résultats.
- ❖ *Un témoin positif d'amplification* constitué du mélange réactionnel et d'ADN (gène recherché) déjà extrait et identifié par PCR.
- ❖ *Un témoin positif d'extraction* constitué du mélange réactionnel et d'ADN extrait d'une souche bactérienne chez laquelle on a déjà identifier le gène recherché afin de vérifier si l'étape d'amplification a bien fonctionner.

Les microtubes contenant le mélange de réactifs et l'ADN extrait sont déposés dans un thermocycleur, thermique, afin de multiplier en grande quantité la séquence cible. Des cycles répétés de dénaturation, d'hybridation et d'élongation y sont opérés et répétés 40 fois (**Gilbert et Berrouard, 2009**).

I-4 Visualisation de gène recherchée

La visualisation de la présence ou non de gène recherché dans un échantillon se fait par la technique électrophorèse à l'aide d'un gel d'agarose 2%. Lors de la mise en puits des produits d'amplification, une solution de Bleu Endo-R-Stop 10 X est ajoutée dans chacun des microtubes afin de suivre la migration des produits dans le gel d'agarose. Le premier puits contient l'échelle des standards (1 Kb) qui permet d'interpréter les bandes d'acides nucléiques obtenues et de vérifier si elles correspondent bien au gène recherché.

Afin de visualiser les bandes, le gel d'agarose est coloré au bromure d'éthidium (2µg/ml) pendant 10 à 20 minutes puis révélé sous une lumière ultra violette (**Gilbert et Vézina, 2009**).

II-Détection par RFLP

La technique RFLP développée par Botstein et al. (1980) repose sur la mise en évidence de la variabilité de la séquence nucléotidique de l'ADN génomique. Après digestion par des enzymes de restriction. Une multitude de fragments d'ADN de tailles variables est générée par digestion enzymatique, puis séparée sur gel d'agarose et transfère par capillarite sous forme dénaturée sur une membrane de nylon. Cette membrane est mise en contact avec une solution. Contenant un fragment d'ADN ou sonde qui permet de repérer, par hybridation moléculaire, des fragments d'ADN génomique qui lui sont homologues (**Najimi et al. , 2003**).

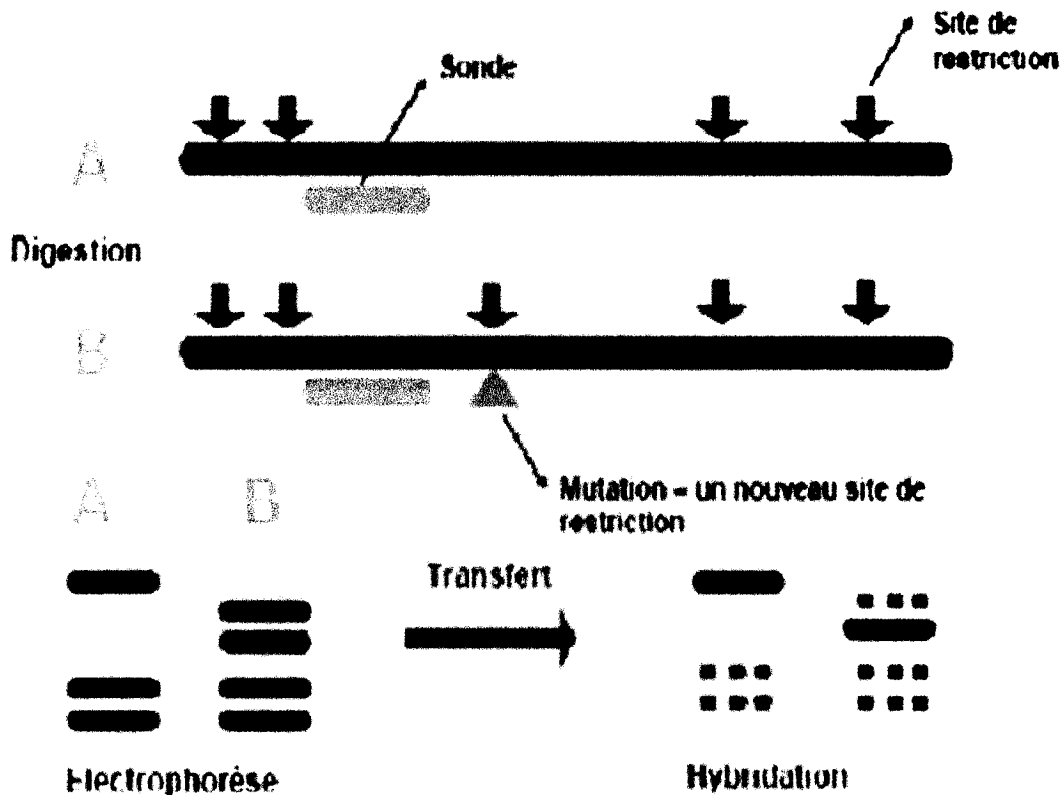


Figure 5 : Principe de RFLP (Diguta C, 2010)

Les étapes expérimentales de cette technique sont les suivantes

II-1 Extraction de l'ADN

L'extraction d'ADN est réalisée comme décrite précédemment. Quand on fait cela, il faut prendre soin de ne pas endommager la molécule d'ADN que l'on doit récupérer sous la forme d'un long filament (Sup Agro, 2006).

II-2 Digestion par des enzymes de restriction et électrophorèse

L'ADN extrait est digéré avec des enzymes de restriction spécifiques, soigneusement choisies. Chaque enzyme de restriction, dans des conditions appropriées, va reconnaître et couper l'ADN de façon prédictible, produisant ainsi un ensemble de fragments d'ADN (Les fragments de restriction) de différentes longueurs. Les millions de fragments de restriction produits sont généralement séparés par électrophorèse sur gel d'agarose. Comme les fragments seraient vus comme une traînée continue par coloration au bromure d'éthidium, la coloration seule ne permet pas de détecter des polymorphismes. L'hybridation doit pour cela être utilisée pour détecter des fragments spécifiques (Sup Agro, 2006).

III-3 Transfert de l'ADN selon la méthode Southern

Le transfert d'ADN est appelé 'Southern blotting'. Dans cette méthode, le gel est tout d'abord dénaturé dans une solution basique et placée dans un bac. Une membrane poreuse de nylon ou de nitrocellulose est étalée sur le gel, et un poids posé sur l'ensemble. Tous les fragments de

restriction présents dans le gel se transfèrent sur la membrane sous forme simple brin par capillarité (SupAgro, 2006).

II-4 Hybridation de l'ADN

La membrane avec l'ADN cible est incubée avec la sonde ADN. Les conditions d'hybridation sont telles que si des brins sur la membrane sont complémentaires de ceux de la sonde, l'hybridation se produira et des duplex marqués se formeront. Quand les conditions sont très stringentes, l'hybridation avec des ADN très distants ou non homologues ne se produit pas. Ainsi donc, la sonde ADN accroche des séquences qui sont complémentaires et "idéalement" homologues à elle-même, parmi les milliers ou millions de fragments non détectés qui migrent dans le gel.

Les fragments désirés peuvent être détectés après exposition simultanée de la membrane hybridée et d'un film autoradiographique (SupAgro, 2006).

III-Détection par puce à ADN

III-1 principe

Le principe des puces à ADN repose sur la miniaturisation de l'hybridation permettant d'identifier simultanément des milliers de molécules différentes d'acides nucléiques d'un micro-organisme. Une puce à ADN est fabriquée par dépôt ou synthèse, sur un support, d'oligonucléotides de séquences différentes. Chaque oligo ou cible a donc une position connue sur la puce. L'incubation de cette puce avec de l'ADN ou de l'ARN à étudier qui a été préalablement marqué, conduit dans des conditions de stringence élevées, à leur hybridation avec les cibles correspondantes. Cette hybridation est détectée et localisée. L'ensemble des signaux produits fait l'objet d'un traitement informatique. Il est donc possible d'obtenir des profils différents d'hybridation (reflétant des différences de séquences), voire la séquence d'un gène ou d'une portion de gène, en fonction des oligonucléotides hybridés. Le choix des oligonucléotides synthétisés sur la puce sera fonction du gène ou du génome étudié (Haddad *et al.*, 2001).

➤ La puce

La puce à ADN est constituée d'un réseau dense et régulier de micro surfaces appelées unités d'hybridation UH gravées sur un support plan (substance chimiquement inerte comme le polypropylène, le nylon, le verre ou le silicium) d'une dimension de 1 cm². À 3 cm² (Géraldine et Sébastien, 2003).

➤ La cible

La cible est l'ADN simple brin qui doit être analysé car l'enchaînement de ses bases est inconnu. Avant d'être déposé sur la puce, il est marqué à l'aide d'une molécule fluorescente (Dupuy-Maury et Soularue, 2008).

➤ L'hybridation

Lorsque la cible est mise en contact avec la sonde, seuls les bouts d'ADN complémentaires vont s'hybrider, c'est-à-dire "se coller". La puce est ensuite "lavée" plusieurs fois afin qu'il ne reste sur la lame que les brins qui se seront parfaitement appariés. A l'endroit où les deux brins d'ADN s'apparient, il apparaît un spot lumineux (Dupuy-Maury et Soularue, 2008).

L'analyse

L'enchaînement des bases de chaque sonde étant connu, les chercheurs en déduisent celui de l'ADN cible et repèrent ainsi les anomalies éventuelles, c'est-à-dire là où les spots sont absents ou de faible intensité. A partir de ces résultats, les chercheurs peuvent reconstituer -un peu à la manière d'un puzzle- la séquence de l'ADN jusque là inconnue (**Dupuy-Maury et Soularue, 2008**).

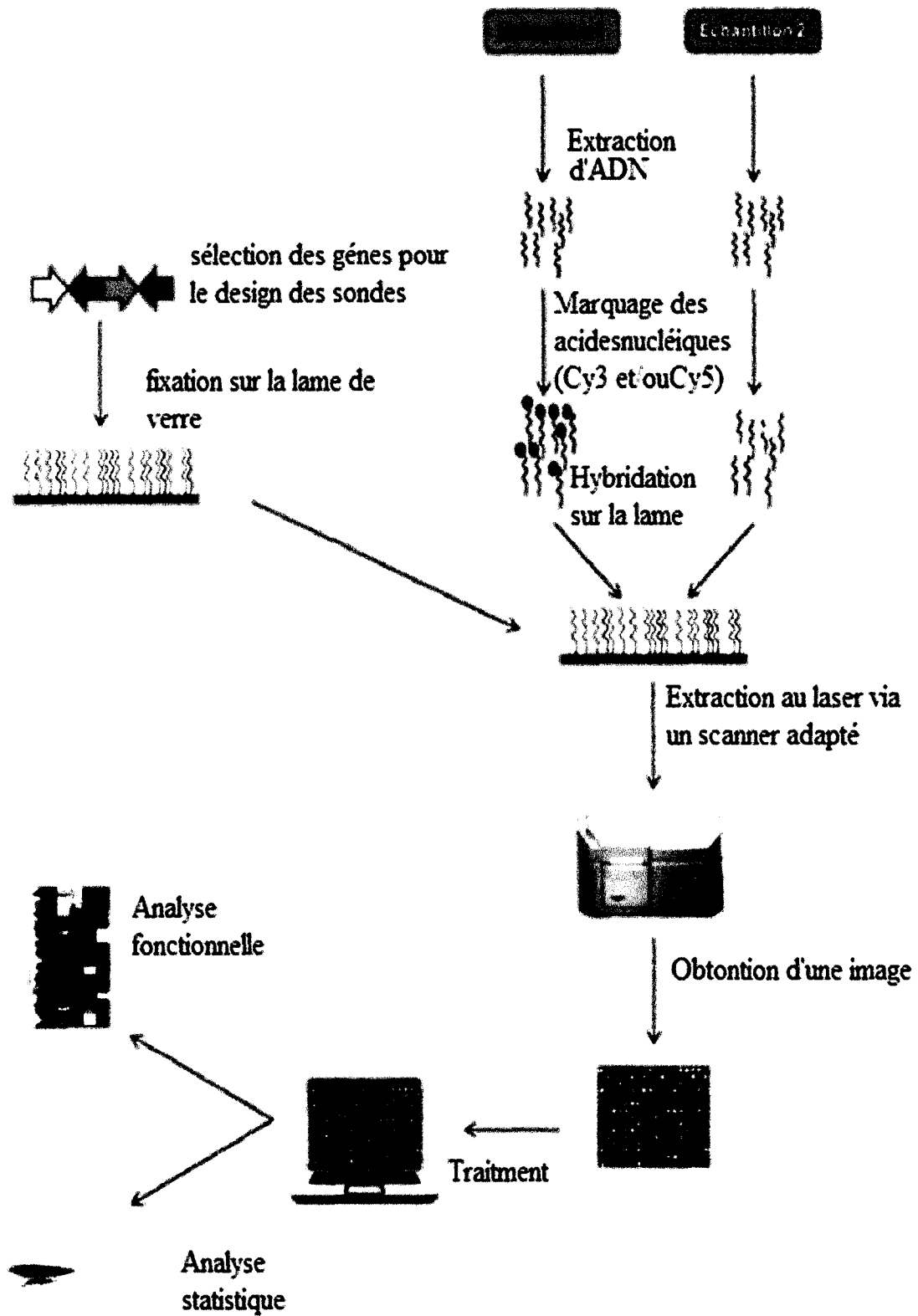


Figure 6 : Principe de puce à ADN (Donatin et Drancourt, 2011).

III -2 Les différentes puces

Actuellement, il existe divers types de puces qui diffèrent par le nombre de “sondes” qu’ils renferment. Certaines puces comptent 35 000 “bouts” d’ADN réparties sur des lames de 14 cm² et permettent donc d’analyser tous les gènes que renferment notre ADN, mais en un seul exemplaire. D’autres puces comptent 4 millions de sondes par cm² c’est-à-dire qu’elles permettent d’analyser en une seule fois plusieurs copies de notre ADN. Généralement, ces puces sont utilisées en recherche fondamentale (**Dupuy-Maury et Soularue, 2008**).

III-3 Les puces à ADN comme outils de détection

Des puces à ADN sont utilisées pour détecter un produit de PCR et remplacent ainsi la migration sur gel en validant la spécificité de l’amplification par sa complémentarité avec la sonde. Pour l’analyse d’un échantillon simple, cette procédure est peu compétitive par rapport à la PCR en temps réel ou à l’électrophorèse capillaire. En revanche, dans le cas d’un échantillon complexe, les puces à ADN permettent l’analyse simultanée d’un grand nombre de fragments. Des puces permettant d’identifier les bactéries présentes dans un échantillon sur la base de l’analyse des séquences d’ARN ribosomique 16s sont en développement dans plusieurs institutions. L’ADN total est extrait à partir d’un échantillon et l’ensemble des ADN codant pour les ARN 16s sont amplifiés, en utilisant des amorces universelles, et hybridés sur des puces portant des sondes spécifiques de l’ARN 16s des espèces recherchées. Les domaines d’application des puces à ADN sont aujourd’hui très nombreux. Cet outil est développé pour la surveillance du bioterrorisme avec un ensemble de sondes spécifiques des agents pathogènes potentiellement utilisés, le génotype, le diagnostique et le contrôle agroalimentaire et industriel (**Glaser, 2005**).

IV Avantages et inconvénients des techniques de biologie moléculaire

Les techniques d’identification ainsi que les critères de classification mis à la disposition des microbiologistes évoluent sans cesse. Le développement des techniques de biologie moléculaire a, en particulier, introduit de nouveaux critères d’identification basés sur l’étude de la présence de certains gènes, sur l’étude de leur séquence... L’extrême variété des génomes a permis la différenciation de germes jusqu’alors confondus, de définir des gènes ou des séquences d’ADN spécifiques (facteurs de virulences particuliers, résistance à une Famille d’antibiotique...) (**Géraldine et Sébastien, 2003**). Nous allons tenter dans ce chapitre de tirer les avantages, mais également les inconvénients de l’intérêt d’étudier le génotype plutôt que le phénotype.

IV-1 Avantages

- Pour commencer nous pouvons noter que d’une manière générale, l’ADN est résistant. Les prélèvements à étudier en biologie moléculaire sont donc faciles à transporter et à conserver. Les techniques de biologie moléculaires sont à priori :
- Très sensibles parfois d’avantage que la culture (PCR *Chlamydia trachomatis* par exemple). La PCR peut dans certains cas s’appliquer directement à l’échantillon à analyser, supprimant ainsi les délais de mise en culture et les problèmes liés aux germes non cultivables.
- Très spécifiques, particulièrement les sondes moléculaires commercialisées pour l’identification des espèces bactériennes en culture. La réaction permet de détecter la présence d’ADN cible parmi de très nombreux autres microorganismes.
- Détection d’organismes morts, difficilement cultivables: lors de l’extraction de l’ADN ou de l’ARN, l’échantillon peut être soumis à des traitements drastiques sans que cela n’altère la qualité de l’analyse. Ceci constitue un des gros avantages par rapport aux méthodes basées sur la culture de microorganismes ou même sérologiques où l’intégrité de l’antigène est nécessaire.

- Beaucoup plus rapides et automatisables.
- Lecture objective des résultats : elle est accomplie par un lecteur dans un grand nombre de cas et non plus interprétée subjectivement par le technicien de laboratoire, comme dans le cas de lecture des réactions d'immunofluorescence par exemple **(Géraldine et Sébastien, 2003)**.

IV-2 Inconvénients

- Cette grande spécificité peut à l'inverse entraîner un certain nombre de faux négatifs: en effet, l'apparition de mutations dans les séquences cibles peut être responsable de faux négatifs.
- L'existence d'inhibiteurs des polymérases dans les échantillons peut également entraîner l'apparition de faux-négatifs.
- Le risque de contamination des échantillons à analyser par de l'ADN amplifié peut être à l'origine de faux-positifs.
- Certains coûts de réactifs commercialisés restent élevés. Le coût des équipements et de l'aménagement du laboratoire est très variable selon la méthode utilisée.
- La maîtrise de la qualité des analyses de biologie moléculaire est encore délicate à obtenir. La mise en place de contrôles qualité est difficile à mettre en place et elle alourdit les coûts.
- La sensibilité des sondes nucléiques est limitée et autorise rarement leur emploi pour le diagnostic direct.
- La réalisation d'un diagnostic direct moléculaire ne dispense pas de la culture (antibiogramme) **(Géraldine et Sébastien, 2003)**.



Chapitre III : Microorganismes recombinants

En 1976, la manipulation du bagage génétique d'un microorganisme devient une réalité lorsque les méthodologies du clonage de l'ADN, de la synthèse d'oligonucléotides et de l'expression génétique furent rassemblées dans une seule expérience, dans laquelle une protéine humaine fut exprimée pour la première fois à partir d'ADN recombinant, l'expression réussie de l'insuline humaine destinée au traitement du diabète suivi peu après, ce qui en fit le premier produit commercial de l'industrie des biotechnologies (Gilmaw et Zoller, 1994).

I-Obtention d'un microorganisme recombinant

Les protéines sont de nos jours d'une importance fondamentale pour la recherche ainsi que pour le milieu industriel. C'est pourquoi notre intérêt s'est porté sur la production de protéines recombinantes.

Une protéine recombinante est qualifiée ainsi dans la mesure où elle est produite de manière exogène dans une cellule dont l'ADN a été modifié par recombinaison génétique. Ce processus biotechnologique, aussi appelé "clonage", s'appuie sur :

- l'emploi d'un vecteur transportant le gène d'intérêt codant pour la protéine recherchée.
- L'utilisation d'une cellule hôte qui sera chargée de synthétiser la protéine via le gène inséré.
- Des phases de production, de séparation et d'extraction de la protéine de la cellule hôte dans laquelle elle a été produite.

Le clonage d'un gène consiste à insérer un gène d'intérêt dans un vecteur et transformer des bactéries avec ce vecteur. Une fois inséré dans la bactérie, ce gène pourra, selon les besoins, être amplifié en vue d'un séquençage, ou exprimé en vue de la production de la protéine associée à ce gène.

Ce procédé biotechnologique permet de produire des molécules trop complexes à synthétiser chimiquement. Ainsi, l'enjeu économique de cette stratégie est énorme, notamment pour l'industrie pharmaceutique. Mais l'intérêt de cette synthèse est aussi valable pour le domaine de la recherche, où la production de protéines est un besoin fondamental pour leur étude, ainsi que pour la génétique (Cherkaoui-malki, 2006).

Historiquement, les premières expériences de production de protéines humaines dans les bactéries furent des protéines d'intérêt thérapeutique comme l'insuline (1979). La production de protéines ou l'élaboration d'organismes transgéniques ne sont pas des techniques limitées aux bactéries. D'autres méthodes de transformation peuvent aussi être employées, par exemple l'utilisation de vecteurs différents des plasmides (virus modifiés, phages, cosmides, phagemides, etc (Lionnet et Croquette, 2005).

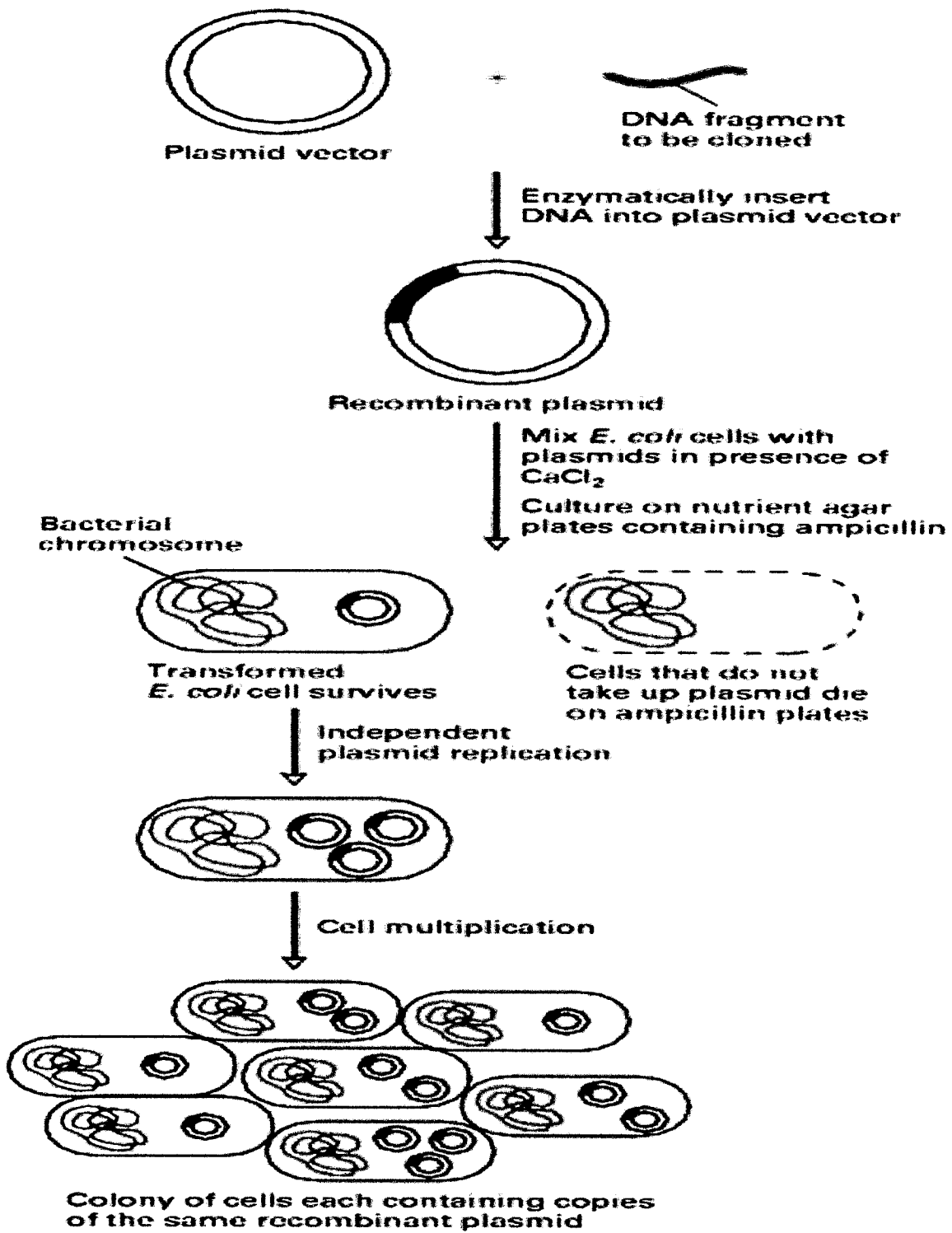


Figure 7 : Clonage et expression de gènes chez la bactérie (Abdelkrim, 2009).

II-Production de l'insuline

L'insuline humaine est le premier médicament produit par génie génétique pour lequel un brevet a été déposé, c'est une hormone importante qui règle le métabolisme des sucres, ce dernier est produit par un petit nombre de cellule du pancréas et est sécrétée dans la circulation sanguine. Certains individus ne produisent pas assez d'insuline et ont par conséquent un taux de sucre trop élevé. On parle alors de diabète. Les personnes atteintes d'un diabète grave doivent s'injecter de l'insuline quotidiennement pour mener une vie normale (**Gilmaw et Zoller, 1994**). Autrefois, l'insuline provenait d'un pancréas de bœuf ou de porc (**Dorchy et Sternon, 2006**). Depuis les années 80, elle est également produite grâce au génie génétique (**Gilmaw et Zoller, 1994**).

Chez les mammifères, l'insuline est exprimée sous forme d'une chaîne unique de *pré-pro-hormone*, qui est sécrétée à travers la membrane cytoplasmique, il contient des acides aminés excédentaires qui ne sont pas présentes dans l'hormone mature.

Le principal défi posé à la production d'insuline recombinante était d'obtenir une insuline assemblée sous sa forme mature ; l'approche initiale a été de construire des gènes synthétiques à partir d'oligonucléotide qui codaient séparément pour les chaînes A et B.

Ils étaient insérés individuellement dans le gène d'*E. Coli* qui code pour la b-galactosidase, afin que la bactérie produise de grandes protéines de fusion contenant les séquences de l'insuline attachées à l'extrémité de l'enzyme b-galactosidase. Ces grandes protéines étaient purifiées à partir des extraits bactériens, et les chaînes d'insuline étaient relarguées par un traitement au bromure de cyanogène, un réactif qui coupe les liaisons peptidiques après les résidus méthionine. Comme un codon méthionine avait été inséré dans la protéine de fusion au point de jonction entre la B-galactosidase et des chaînes d'insuline, le traitement au bromure de cyanogène détachait les chaînes d'insuline intactes de ces protéines. Elles étaient purifiées, mélangées, et reconstituées en molécules d'insuline actives. Cette approche a été raffinée par la production d'une seule protéine de fusion b-galactosidase /insuline qui peut être coupée en une seule étape pour libérer une insuline mature. Une méthode similaire est désormais appliquée pour la production commerciale d'insuline recombinant (**Gilmaw et Zoller, 1994**).

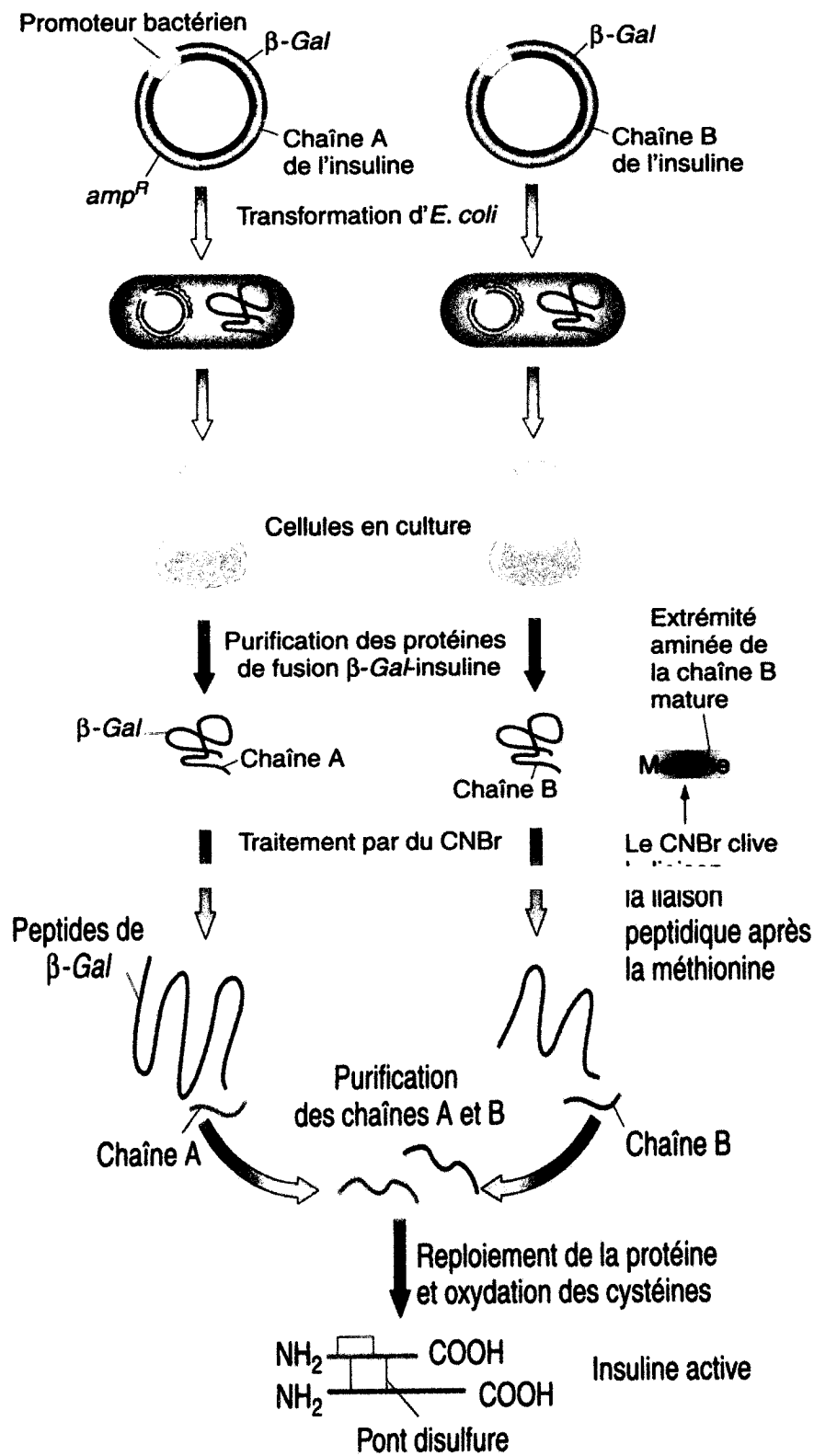


Figure 8 : Production de l'insuline par *E. coli* (Griffiths et al., 2001).

III- La production d'hormone de croissance humaine dans des bactéries

Les hormones sont des “messagers”, responsables de la régulation de processus variés dans le corps comme la croissance, la faim, la soif, la reproduction, la composition corporelle, le métabolisme et le bien-être. Les hormones sont produites dans deux parties du cerveau, appelées **hypothalamus** et la **glande hypophyse**. Un taux bas d'hormones résulte généralement d'un problème dans l'une ou l'autre de ces glandes ou les deux (**Vera et Butler, 2009**).

L'hormone de croissance (= GH, Growth Hormone) est produite par l'hypophyse (**Jeu, 2008**). Son rôle est de Stimuler la croissance et le développement post-natal (**Mercier, 2010 ; Cottier et Guerry, 2000**). Une quantité trop faible de GH dans l'organisme d'un jeune enfant conduit au nanisme. On peut palier cette déficience en administrant l'hormone par injection aux enfants dont la taille est anormale mais seule l'injection de l'hormone de croissance d'origine humaine a alors un effet (**Jeu, 2008**).

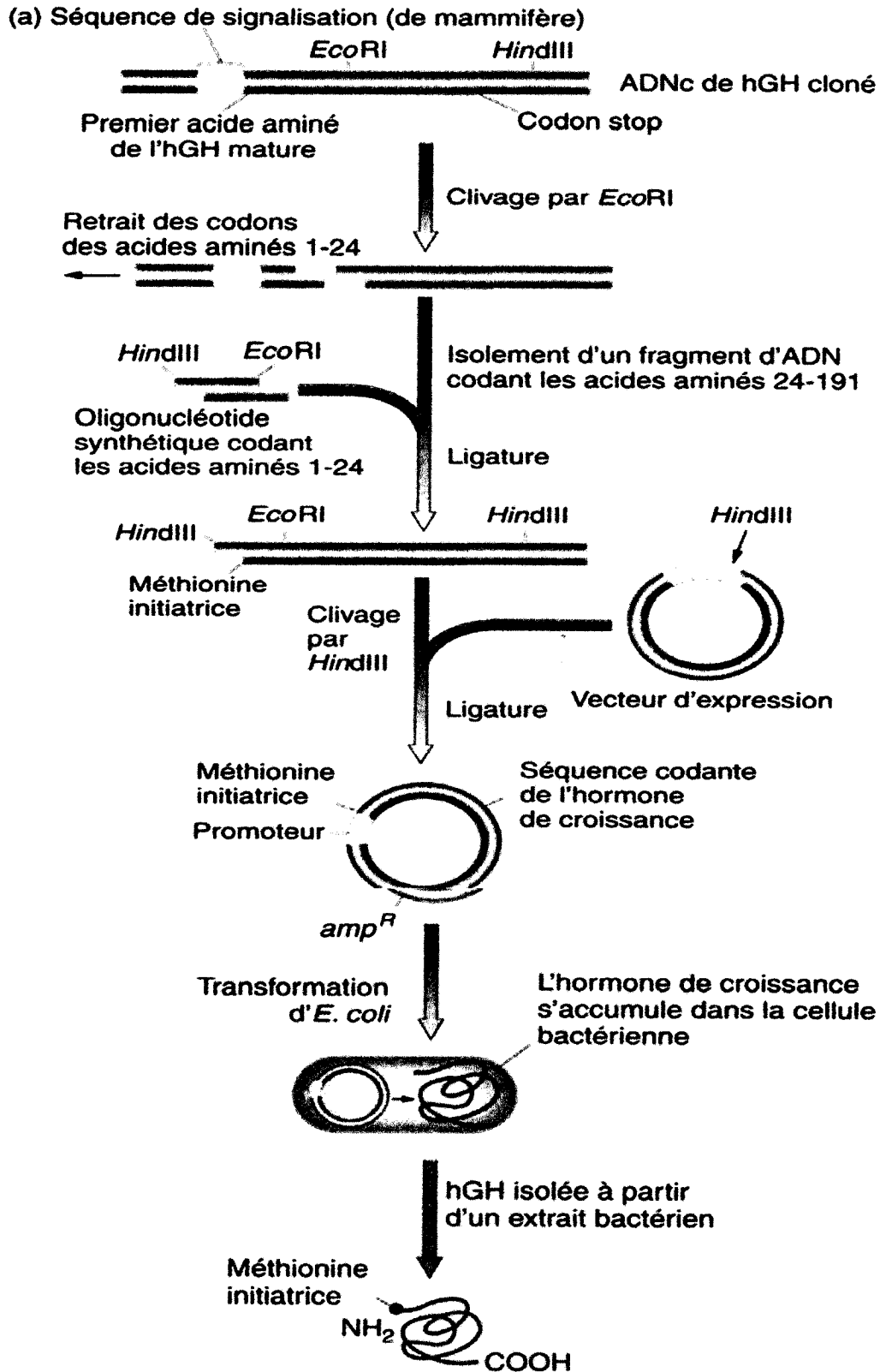


Figure 9 : La production d'hormone de croissance humaine par *E. coli* (Griffiths et al., 2001).

IV-les vaccins à base des micro-organismes recombinants

Ces dernières années, les techniques de production de vaccin ont quelque peu évolué, et les apports récents de la génétique et de la biologie moléculaire ont permis de combattre de nouvelles maladies. Il existe trois grandes familles de vaccins : les vaccins atténués, les vaccins inactivés, et ceux issus du génie génétique (Petignat et al., 2006).

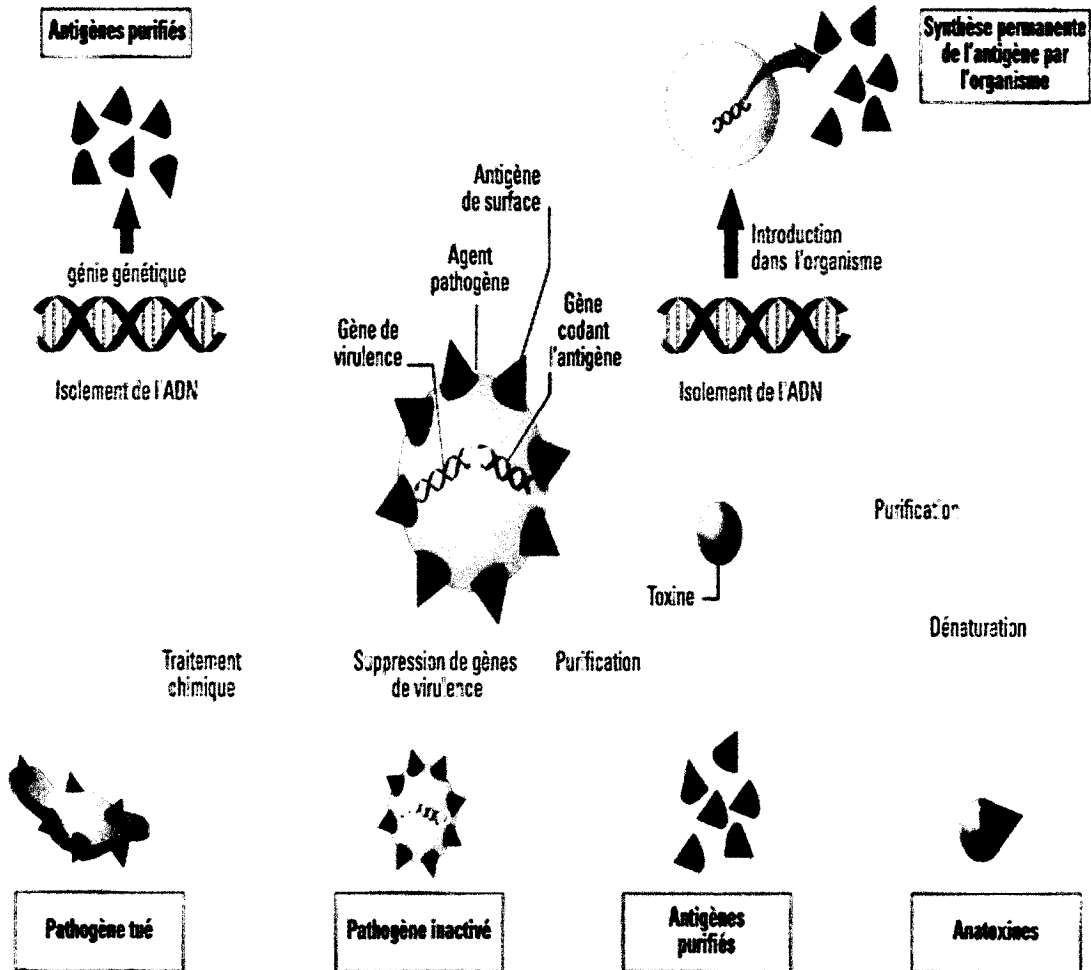


Figure 10 : Les différentes méthodes de fabrication des vaccins (Steimle, 2005)

Un vaccin efficace procure une immunité humorale et immunité à médiation cellulaire, qui préviennent le développement de la maladie après une exposition au pathogène correspondant. Cela se fait en présentant des déterminants antigéniques appropriés au système immunitaire d'une façon qui mime les infections naturelles. Les vaccins viraux conventionnels sont constitués de souches des virus vivants inactivés ou de souches atténuées, mais cela ne va pas sans poser des problèmes. La croissance de beaucoup de virus n'est, par exemple, pas adaptée à l'obtention de titres élevés sur culture de tissu, c'est le cas du virus de l'hépatite B. On court le danger d'une maladie due au vaccin lorsqu'on utilise des virus inactivés du fait que des virus compétents pour la réplication peuvent être restés dans l'inoculum. En Europe, des cas de fièvre aphteuse ont été attribués à cette cause. Finalement, il peut y avoir une réversion des souches de virus atténués vers le phénotype virulent à la suite d'une réplication chez la personne vaccinée. Cela se produit environ une fois ou deux par million de personne recevant le vaccin vivant antipoliomyélique. La technologie de l'ADN recombinant offre quelques solutions intéressantes (Primrose et al., 2004).

Etant donnée la facilité d'expression de gènes hétérologue dans de nombreux systèmes procaryotiques et eucaryotique, il n'est pas difficile de produire de grandes quantités de matériel immunogène purifié utilisable comme vaccin sous-unitaire. Toute une série de gènes prometteurs du point de vue immunologique ont été clonés et exprimés. Mais, en générale, les résultats ont été décevants. Par exemple, de tous les peptides du virus de la fièvre aphteuse, seul VPI s'est avéré avoir un pouvoir vaccinant. Cependant, le polypeptide VPI recombinant était un très mauvais immunogène. Il peut être pas si surprenant que les vaccins sous-unitaires produits de cette façon n'entraînent pas la réponse immune désirée parce qu'ils manquent d'authenticité (Primrose et al., 2004).

Le vaccin contre l'hépatite B disponible dans le commerce diffère sur ce point car l'expression de l'antigène de surface chez la levure entraîne la formation de particule semblable à des virus. On observe un phénomène similaire avec un vecteur Ty de levure portant un gène de protéine de capsid de HIV. Ces vaccins sous-unitaires ont également un autre désavantage : comme ils sont inertes, ils ne se multiplient pas chez la personne vaccinée et ne produisent donc pas de réponse immune cellulaire efficace, nécessaire à la guérison d'une maladie infectieuse (Primrose et al., 2004).

IV-1-Les vaccins bactériens recombinants

Une approche remplaçant celles des vaccins vivants consiste à se servir comme point de départ de *Salmonella typhimurium*, un organisme contaminant les aliments. On peut atténuer ces organismes par l'introduction de lésions dans les gènes *aro*, qui codent pour des enzymes impliquées dans la biosynthèse d'acides aminés aromatiques, de l'acide p-aminobenzoïque et des enterochélines. Alors que des doses de 10^4 *S. typhimurium* de type sauvage sont toujours létales pour les souris, les mutants *aro* ingérés par la bouche ne tuent pas les souris même en utilisant des doses allant jusqu'à 10^{10} . Les souches mutantes peuvent quand même provoquer des infections limitées par auto-contrôle chez les souris et on peut les détecter en faibles quantités dans des organes comme le foie et la rate. Ces types de souches de *S. typhimurium* sont particulièrement intéressantes comme transporteurs d'antigènes hétérologue car on peut les absorber par la bouche et parce qu'ils stimulent chez l'hôte les réponses immunes humorale, sécrétoire et cellulaire (Jones et al., 1991).

Une grande variété d'antigènes hétérologues a déjà été exprimée dans ce type de souches vaccinales (Primrose et al., 2004).

L'utilisation de la souche vaccinant BCG (souche atténuée à partir de *Mycobacterium bovis*) (Kourilsky, 2004). Comme autre vecteur possible a de nombreux avantages, dont son absence, bien connue, de danger, son coût bas, son utilisation répandue comme vaccin chez les enfants et

la possibilité d'introduction d'une protection prolongée avec une seule dose. Plusieurs souches de BCG recombinantes exprimant des gènes étranger de façon stable ont été construites et les résultats préliminaires des études sur des animaux sont très encourageants. Un autre vecteur possible est *Streptococcus gordonii*, un commensal de la flore buccale humaine (Fischetti et al., 1993).

Une autre approche encore, pour préparer des vaccins, a été élaborée. Grâce aux données des séquences complètes du génome. Ils ont voulu fabriquer un vaccin contre les méningocoques de groupes b mais ont été gênés par le fait de la séquence des protéines exposés à la surface est très variable. En partant de la séquence complète du génome d'un groupe de souche B de *Neisseria meningitidis*, ils ont identifié 350 protéines constituant des antigènes potentiellement vaccinant. La totalité des 350 antigènes-candidas ont été exprimés dans *E. coli*, puis purifiés et utilisés pour immuniser des souris. Les sérums des souris ont permis d'identifier des protéines qui sont exposés à la surface des méningocoques, qui sont conservées dans une série de souches, et qui induisent la production d'anticorps bactéricides, une propriété corrélée avec une efficacité vaccinale chez l'homme (Primrose et al., 2004).

IV-2 les vaccines à base des virus recombinants

Les vaccins à virus recombinants sont destinés à stimuler la réponse immunitaire, aussi bien cellulaire qu'humorale. Les chercheurs utilisent un vecteur, généralement un virus inoffensif pour l'homme, dans lequel on insère un ou plusieurs gènes du VIH fabriqués par génie génétique. Cette construction qui est non-pathogène pour l'homme est appelée "virus recombinant" (Paris et al., 2006).

Les poxvirus recombinants ont démontré leur efficacité vaccinale en stimulant une réponse immunitaire protectrice chez l'hôte contre divers pathogènes. Au sein de ces virus, le virus myxomateux (VM) a déjà montré son potentiel vaccinal recombinant chez quelques espèces (Kevin et al., 2011).

❖ Chez l'hôte naturel, le lapin

Le virus myxomateux a d'abord été envisagé comme vecteur chez le lapin, bien qu'il produit de nombreuses protéines immuno-modulatrices.

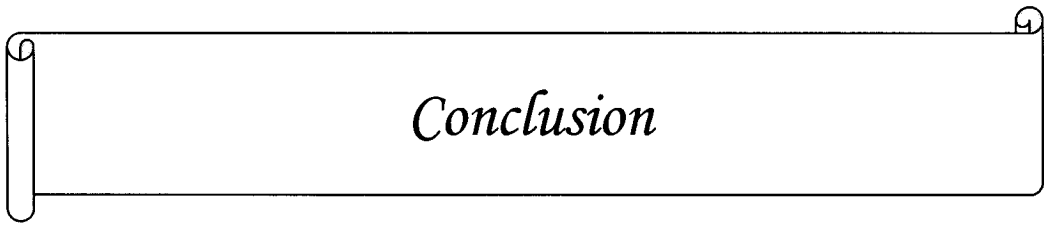
L'avantage d'un tel vecteur dans l'espèce cunicole est qu'il offre alors une double protection, contre l'insert et contre le vecteur lui-même. La vaccination d'individus avec un virus myxomateux SG33 exprimant la protéine de capsid VP60 du virus de la maladie hémorragique du lapin (MHD) induit la production d'anticorps anti-VP60 et anti-myxomateux. La synthèse d'anticorps exprimée contre l'hémagglutinine de l'influenza exprimée par un virus myxomateux recombinant est similaire à celle lorsque le vecteur est un recombinant de la vaccine.

Dans la vaccination de population de lapins, l'utilisation d'une souche de terrain peu virulente, la souche 6918 isolée en Espagne, favorise la transmission horizontale du virus recombinant entre individus, afin de les protéger contre la MHD, grâce à la protéine de capsid VP60 du virus de la MHD exprimée par le recombinant (Kevin et al., 2011).

❖ Virus myxomateux : vecteur vaccinal chez d'autres espèces

Le potentiel de vecteur vaccinal du VM chez les espèces non-Leporidae a été démontré initialement par la vaccination efficace de chat contre la calicivirose féline en utilisant un VM recombinant possédant le gène de capsid du virus félin : il favorise la production d'anticorps sériques neutralisants du virus cible.

L'utilisation d'un VM recombinant sur le mouton montre le potentiel immunogène du VM et de son transgène dans cette espèce, mettant en avant le potentiel de vecteur vaccinal du VM chez les petits ruminants (**Kevin et al., 2011**).



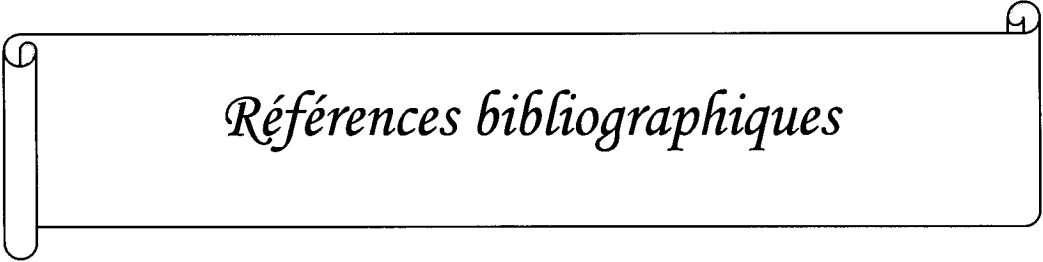
Conclusion

La biologie moléculaire possède, sans doute, aujourd'hui un champ d'application très large et nous ouvre des perspectives nouvelles. Il s'agit incontestablement d'une technologie clé pour ce troisième millénaire.

L'utilisation des techniques de la biologie moléculaire pour la détection et l'identification des microorganismes permet, tout d'abord, un gain de temps réel. Mais, il ne faut pas utiliser les techniques de biologie moléculaire lorsque les techniques traditionnelles font mieux et à moindre coût. C'est seulement en cas d'insuffisance de ces techniques que la biologie moléculaire doit être utilisée (bactéries non cultivables ou nécessitant un temps d'incubation prolongé, difficulté d'identification) ou pour différencier une souche virulente d'une souche non pathogène. La généralisation des tests de biologie moléculaire ne se fera probablement que lorsque leur degré d'automatisation sera suffisant pour permettre une réduction des coûts financiers et/ou une économie en personnels.

Les techniques de biologie moléculaire ont permis également de faire produire par des micro-organismes recombinants des protéines eucaryotes comme des hormones, des vaccins, des anticorps monoclonaux et elles offrent des perspectives nouvelles pour la production de protéines recombinante à des fins thérapeutiques. Cependant, comme toute technique, la biologie moléculaire a ses limites. Ainsi, dans un organisme vivant, la production d'une protéine de nature et de fonction données peut nécessiter des informations présentes à plusieurs endroits de l'ADN.

Si la technologie génétique sait parfaitement identifier, isoler et modifier un gène particulier, elle a beaucoup plus de difficultés à l'heure actuelle pour déterminer les liens existant entre les différents gènes. En outre son coût, parfois exorbitant, posent encore des problèmes qui restreignent, pour l'instant, le champ d'application de la biologie moléculaire.



Références bibliographiques

Abdelkrim J (2009). Nouvelles technologies de séquençage : quelques applications en écologie moléculaire, *Molecular Ecology Resources*. p 9.

Ameziane N, Bogard M, Lamoril J (2006). Principe de biologie moléculaire en biologie clinique, Elsevier. SAS. Rue linois. P 325.

Baltimore L, Zipursky B, Darnell M (1997). Biologie moléculaire de la cellule, 3^é édition, De Boeck Université S, a. p 245.

Bernot A (1999). L'analyse des Génome, 2^é édition, Nathan. p 19.

Buffet-Janvresse C, Cattolico L, Dupré J-M, Petit F. (SD). Détection de microorganismes pathogènes dans les eaux estuariennes de la seine, Université de Rouen. p 3.

Carol E (SD). PCR et séquençage du gène ARN 16s : application en bactériologie, N18, Biomnis Paris. P2.

Cherkaoui-malki M (2006). Stratégie de Co-expression de protéines recombinantes, Université de Bourgogne Dijon. P 3.

Cottier, Guerry (2000). Génie Génétique et Clonage, Les organismes Transgéniques. P 86.

Diguta C (2010). Ecologie des moisissures présentes sur baies de raisin, universite de bourgogne, p 53.

Durant J (1997). Biotechnologie: ce que vous aimeriez savoir, EFB Task Group on Public Perception of Biotechnology. P 2.

Dorchy h, Sternon J (2006). Les analogues de l'insuline, clinique de diabétologie, hôpital universitaire des enfants reine Fabiola. P 1.

Dupuy-Maury F, Soularue P (2008). Le point sur les puces à ADN, AFM – Association Française contre les Myopathies. p 4.

Donatin E, Drancourt M (2011). Diagnostic des infections bactériennes par les puces à ADN, Springer-Verlag France, vol 39. p 3.

Etienne H (2010). Les rétrovirus endogènes et la recherche sur le sida: confusion, consensus, ou science, *Journal of American Physicians and Surgeons*, vol 15, N°3. P 3.

Etienne J (1999). Biochimie génétique Biologie moléculaire, 5^é édition, Masson, paris. p 256.

Etienne J, Clauser E, Housset C, Roingeard P (2006). Biologie moléculaire, 9^e édition, Elsevier Masson S.A. S. p 199.

- Fischetti V, Medaglini D, Oggioni M, Pozzi G** (1993). Expression of foreign proteins on Gram-positive commensal bacteria for mucosal vaccine delivery. *Curr Opin. Biotechnol.* 4. P 603.
- Fortier, E** (2006). Transformation Génétique de *PSEUDOZYMA Spp*. Par electrophoration, Eveline Fortier. p 1.
- Gassen H-G, Sachse G-E, Schulte U, Hrsg. A** (2004). Méthodes de biologie moléculaire. p 6.
- Gilmaw W, Zoller W** (1994). ADN Recombinant 2^{ème} édition. De boek-wesmael S .A, Bruxelles. PP 453-456.
- Gigas C, Angulata C** (1998). Application des techniques moléculaires de PCR- RFLP et de PCR-RFLP-SSCP dans l'étude de différenciation génétique Université de Pau et des Pays de l'Adour Secteur Ecologie. p 5.
- Griffiths, Gelbart, Miller, Lewontin** (2001). Clonage et vecteur de clonage ou Technologie de l'ADN recombinant, Licence d'Informatique. pp 45-46.
- Griffiths, Gelbart, Miller, Lewontin** (2001). LA PCR Polymérase Chain Réaction, Cours Assistant stérilisation I. p 7.
- Géraldine D, Sébastien F** (2003). Biologie Moléculaire en routine au laboratoire de bactériologie. p15.
- Glaser P** (2005). Les puces à ADN vont-elles révolutionner l'identification des bactéries, *Médecine Sciences*, vol. 21, n° 5. p 541.
- Gilbert G, Berrouard M** (2009). Teste PCR, laboratoire de diagnostic en phyto-protection. p 4.
- Gilbert G, Vézina L** (2009). L'utilisation de la PCR, un test de Laboratoire plus rapide pour détecter *ERWINIA TRACHEIPHILA*, Bactérie responsable du flétrissement bactérien chez les cucurbitacées, laboratoire de diagnostic en phyto-protection. p 3.
- Haddad N, Boulouis H-J, Maillard R** (2001). Technique d'étude moléculaire des isolats : Principes et fiabilité, *Epidémiol et santé anim.* P 26.
- Housset C, Raisonnier A** (2010). Biologie Moléculaire, Objectifs au cours de Biochimie PAES, Université Pierre et Marie Curie. pp 188-202.
- Hamdan M, Bernabeu N, Vergés Y, Buirette C, Calonge J, Herman M, Tatin C** (2011). Organisation, évolution et fonction du génome, Tutorat associatif toulousain(PACES). P 13.

- Iglesias M** (2009). Ajout d'un contrôle d'inhibition dans des kits STR multiplex, Laboratoire AURIGEN, Lausanne. P 7.
- Jones p W, Dougan G, Hayward C, Mackensie N, Collins P, Chatfield S.N** (1991). Oral vaccination of Calves against experimental salmonellosis using a double *aro* mutant of *Salmonella typhimurium*. *Vaccine*, **9**, pp 29-34.
- Jacques K, Simpure** (1999). Cours de Génie Génétique, Science Vol. 286. p 27.
- Jorde B, Carey J, Bamshad M, White R** (2004). Génétique médicale, Elsevier (S A S).p 12.
- Jeu F_a** (2008). Questions-réponses : Contrôle de l'hormone de croissance, Agence mondiale antidopage (AMA). p 1.
- Jeu F_b** (2008). Hormones Hypophysaire, monsonis – milan. p 2.
- Kourilsky P** (2004). Histoire de la science des vaccins, Chaire doimmunologie moléculaire. P 6.
- Kevin C, Germain, Etienne** (2011). Vaccination par des virus myxomateux recombinants exprimant un epitope du virus influenza a aviaire, Ecole nationale vétérinaire detoulouse. p 78-79.
- Lionnet T, Croquette V** (2005). Introduction à la Biologie Moléculaire. p17.
- Lynn B, Jorde J, Carey M, Bamshad R** (2004). Génétique médicale, Elsevier (S A S), p 12.
- Maftah A, Julien R** (2003). Biologie moléculaire, 2^e édition Dunod, Paris. P 116.
- Misra V** (2007). La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) dans le diagnostic des maladies infectieuses vétérinaires. p1.
- Moulessehoul** (2008). Biologie moléculaire 3^e édition, Office des Publications Universitaires. p 20-25.
- Mercier J** (2010). Hormones hypophysaires, monsonis – milan. p 2.
- Najimi B, El Jaafari S, Jlibéne M, Jacquemin J-M** (2003). Applications des marqueurs moléculaires dans l'amélioration du blé tendre pour la résistance aux maladies et aux insectes, Biotechnol. Agron. Soc. Environ. p 19.
- Pompidou A** (1999). Biotechnologie 5 édition, technique Documentation .p23.
- Primrose. Twyman. OLD** (2004). Principes de génie génétique 6^e édition, De Boeck et larcier. PP 21 -23.

Petignat C, Blanc O, Bally R (2006). Microbiologie pathogène de l'infection, Cours Assistant stérilisation I. p 20.

Paris Y, Rocbaron S, Brest G (2006). Le vaccin contre le SIDA, nous y croyons, Agence national de recherches sur le SIDA et les hépatites virales. p 7.

Swaminathan B, Feng P (1994). La détection rapide de bactéries pathogènes d'origine alimentaire. Annu Rev Microbiol. P 148.

Steimle D (2005). Des médicaments au service de l'humanité, (EFPIA) fédération européenne d'associations et d'industries pharmaceutiques, P 2.

Schmid, R.D (2005). Atlas de poche de biotechnologie et de génie génétique, Editions Flammarion. p 230.

SupAgro C (2006). Les technologies basées sur l'ADN Le polymorphisme de longueur des fragments de restriction ou RFLP, IPGRI and Cornell University. p 4-7.

Vera F, Butler C (2009). Insuffisance hypophysaire hormonale multiple .p 3.

Weinman S, Méhul P (2004). Toute la biochimie, Dunod, paris. p 346.

Zhu Y.Y, Machleder E.M, Chenchik, Li.R, Siebert P.D (2001). Reverse Transcriptase Template Switching: A SMARTApproach for Full-Length DNA Library Construction, Clontech laboratories, Palo Alto, CA, USA. V30. P 892.

Techniques de Biologie Moléculaire :

Application aux Microorganismes

Membres de jury :

Examinatrice : M^{elle} Amira Samiya

Encadreure : M^{me} Abdelfatteh Farida

Préparé par :

Bouchalma Zahia

Benzeghioua Amina

Date et heure :

28-06-2012

10 :45-11 :45

RESUME :

Les techniques de biologie moléculaire présentent l'avantage de permettre l'étude du génome indépendamment de la culture des microorganismes ainsi que la manipulation de leur patrimoine génétique afin de leur donner des caractères désirés (ex : capacité de produire des protéines eucaryotes utiles à l'homme). Ces techniques s'appuient sur quatre outils de base : des enzymes (polymérase, enzymes de restriction), l'hybridation moléculaire, l'électrophorèse et le séquençage. La combinaison de ces outils conduit à des techniques qui constituent pour nombre d'entre elles un outil remarquable de détection et de typage des microorganismes (amplification en chaîne, RFLP et southern blotting, séquençage et puce à ADN,...), en complément du phénotypage. Leur apport à la microbiologie et à la biotechnologie est donc considérable, mais elles présentent aussi diverses limites qu'il convient de connaître au mieux pour adapter cet outil à l'objectif recherché.

Mots clés : biologie moléculaire, détection, microorganismes, microbiologie.

SUMMARY:

Molecular biology techniques can analyse the genome without the cell culture of the targeted microorganisms as well as the manipulation of their genomes order to give them desired characters (ex: protein eucaryotes capacity use ful for the man). These techniques are based on four principles: enzymes (polymerases, restriction enzymes), molecular hybridisation, electrophoresis and sequencing. The combination of these tools leads to techniques which constitute for number of them a remarkable tool of detection and typing of the micro-organisms (PCR, Southern blotting, RFLP, micro-arrays...). Complementing phenotypicity. These techniques bring a new benefice for microbiology and biotechnology they present also different that should be known limitations should be assessed to adapt these tools to individual scientific goals.

Key words: molecular biology, detection, micro-organisms, microbiology.

تلخيص:

تتميز تقنيات علم الأحياء الجزيئي بأنها تسمح بدراسة علم الجينات بدون حاجة إلى زراعة الأجسام الدقيقة فضلا عن الذخيرة الوراثية من أجل إعطائها الخصائص المرغوب فيها (إنتاج بروتينات حقيقية النوى المفيدة لدى الإنسان).

ترتكز هذه التقنيات على أربع وسائل قاعدية: الأنزيمات (بلمرة، إنزيمات القطع)، التهجين الجزيئي، الهجرة الكهربائية.

و الربط بين هذه الوسائل يؤدي إلى خلق تقنيات من أجل أعداد ما بينها وسيلة واضحة لكشف نمطية الأجسام الدقيقة (مختلف التقنيات مثل تهجين السلاسل، صفائح التهجين النووي) و يكمل الفينوتيباج الذي يعتبر مضمونه للأجسام الدقيقة و علم البيوتكنولوجيا مهما و لكنه في نفس الوقت يقدم حدود متنوعة و التي تكون ملائمة لمعرفة أفضل حتى تتمكن من تكييف هذه الوسيلة مع موضوع البحث.

الكلمات المفتاحية: البيولوجيا الجزيئية، الكشف، جسم دقيق، علم الجراثيم.