

REMERCIEMENTS

Tout d'abord je saisis cette occasion pour exprimer toutes ma reconnaissances et ma gratitude à Mme.la Directrice générale du laboratoire Fés Medina, **Dr.Ammor ASMAE** qui ma accordé le privilège de passer le stage au sein de la Régie.

Ensuite, je remercier vivement **Mr.Darouich MOHAMED** , le chef au sein du laboratoire Fés médina pour ses qualités humaines et professionnelles, aussi sa disponibilité.

Au terme de ce stage de fin d'étude, je tiens tout particulièrement a remercier mon encadrant **Dr.Ammor ASMAE** , pour ses conseils, sa confiance, son encadrement de haut niveau durant ce mois de stage et pour l'interet particulier qu'il m'a aporte a ce travail.

Mes vifs remerciements s'adressent aussi aux membres de jury **Pr. Harki EL houssaine** et **Pr.TELMÇANI Rachida** pour ses precieux conseils.

D'une façon plus generale, je remercie l'ensemble des enseignants de la FST pour m'avoir aporte intérêt à ma formation et d'accepter l'examination de ce projet.

Enfin, je remercie ceux et celle qu'ont contribuer de loin ou de prêt pour que ce travail puisse avoir le jour.

DÉDICACES

A mes très chers parents,

Aucun terme et aucune langue ne pourra exprimer mon amour et mes sentiments.

Dieu seul capable de vous récompenser pour tout ce que vous avez fait pour moi.

A tous mes professeurs,

S'il y a vraiment quelqu'un à remercier, ça sera vous. Merci pour vos efforts.

A tous les personnels du Laboratoire,

Pour les conseils, idées et le respect.

A tous mes ami(e)s,

Je vous remercie pour l'aide que vous m'avez apporté lors de la réalisation de ce projet.

Sommaire :

INTRODUCTION.....	1
Partie 1 : Etude bibliographique.....	3
I. Historique	3
II. Technique de bases de la biologie moléculaire.....	3
1. Prélèvement et méthodes d'analyse des acides nucléiques.....	3
a. Structure d'ADN	3
b. Extraction d'ADN	4
c. Estimation des quantités d'ADN.....	5
III. Analyse d'acide désoxyribonucléique.....	6
1. Hybridation insitu.....	6
2. Méthode de southern blot.....	6
3. PCR	7
4. Analyse des mutations.....	8
5. Le séquençage direct : méthode de sanger.....	9
IV. Analyse d'acide ribonucléique	9
a. Technique de northern blot	9
b. RT-PCR.....	10
V. Les technologies bio-informatique.....	13
1. PCR en temps réel	13
2. Séquençage a haute débit	13
3. Diagnostic des maladies acquises infectieuse.....	14
a. Tuberculose	14
b. Chlamydiae trachomatis	15
c. Virus VIH.....	17
Partie 2 : Partie Expérimentale.....	19

VI.	Matérielle et méthodes	19
A.	La tuberculose	19
1.	Réception des échantillons	19
2.	Recherche de BAAR	19
3.	Examen microscopique	24
4.	Culture sur milieu solide	25
B.	Chlamydiae.....	19
1.	Utilisation du cassette.....	26
C.	VIH	19
1.	Test ELISA	27
2.	Test rapide	28
VII.	Résultats et discussions.....	29
a.	Tuberculose	29
1.	Examen microscopique :.....	29
2.	Culture sur milieu de Jensen :.....	29
b.	Chlamydiae.....	30
1.	Résultat de teste rapide.....	30
c.	Virus VIH	31
1.	Test rapide	31
2.	Test ELISA	31
	CONCLUSION	32
	REFERANCES	33

Listes des figures :

Figure 1 : La biologie moléculaire dans un laboratoire de microbiologie.	1
Figure 2: Evolution des techniques de biologie moléculaire depuis la PCR à nos jours.....	2
Figure 3: Molécule d'ADN.....	4
Figure 4: Extraction d'ADN.....	5
Figure 5: Le principe de la FISH.....	6
Figure 6: southern blot	7
Figure 7: Le principe de PCR.....	8
Figure 8: le principe de méthode de sanger.....	9
Figure 9: le principe de northern blot.....	10
Figure 10: ADNc.....	11
Figure 11: le principe de RT-PCR.....	12
Figure 12: le principe de PCR en temps réel.....	13
Figure 13 : Hybridation sur membrane.....	14
Figure 14 : frottis de BK sous microscope avec G* 1000.....	25
Figure 15 : kit de chlamydiae.....	26
Figure 16: cassette de chlamydiae.....	27
Figure 17: Test ELISA	28
Figure 18: les étapes de dépistage de VIH	28
Figure 19 : cassette de VIH.....	29
Figure 20: bk positive sous microscope avec G*1000	29
Figure 21: milieu de Jensen avant la croissance du BK.....	30
Figure 22: la croissance sur le milieu de Jensen du BK.....	30
Figure 23: Test rapide	31

Listes d'abréviation :

ADN	: Acide désoxyribonucléique.
ARN	: Acide ribonucléique.
PCR	: Polymerase Chain Reaction.
ARNm	: ARN messenger.
AN	: Acides nucléiques.
Pb	: Paire de bases.
Kb	: Kilobase.
Nm	: Nanomètre.
DO	: Densité optique.
MI	: Millilitre.
HIS	: Hybridation in situ.
FISH	: Fluorescent in situ hybridation.
TBM	: Tuberculose multiresistante .
RIF	: Rifampicine .
BAAR	: Bacille acido-alcool-résistant .
NGS	: Next-generation sequencing .
BK	: Bacille de kokh .
ZN	: Ziehl Neelsen .

INTRODUCTION

La biologie moléculaire est omniprésente en biologie médicale et notamment en microbiologie. De nombreux articles démontrent son importance à la fois dans le diagnostic et le pronostic. Le nombre considérable d'articles sur ce sujet n'apporte pas de réponses claires sur le rôle de la biologie dans les laboratoires de microbiologie, qu'ils soient hospitaliers ou non. De cet état surgissent certaines questions, par exemple : la biologie moléculaire apporte-t-elle quelque chose à la microbiologie ? Dans lesquels les indications pour les tests de biologie moléculaire sont indiquées. La réponse n'est pas toujours simple. Depuis l'invention de l'amplification par PCR en biologie moléculaire, elle est rapidement devenue disponible dans les laboratoires de microbiologie clinique. En effet, bien que plus que les techniques microbiologiques traditionnelles, la biologie moléculaire a été retrouvée dans un grand nombre de laboratoires d'analyses. L'étude des agents infectieux à l'aide d'outils moléculaires est donc devenue nécessaire pour certaines indications. Après avoir rappelé les principales méthodes de recherche sur les agents, nous discuterons de leur place dans le laboratoire de microbiologie. Ensuite, nous discuterons d'exemples d'utilisations courantes de la molécule et nous examinerons son avenir proche.

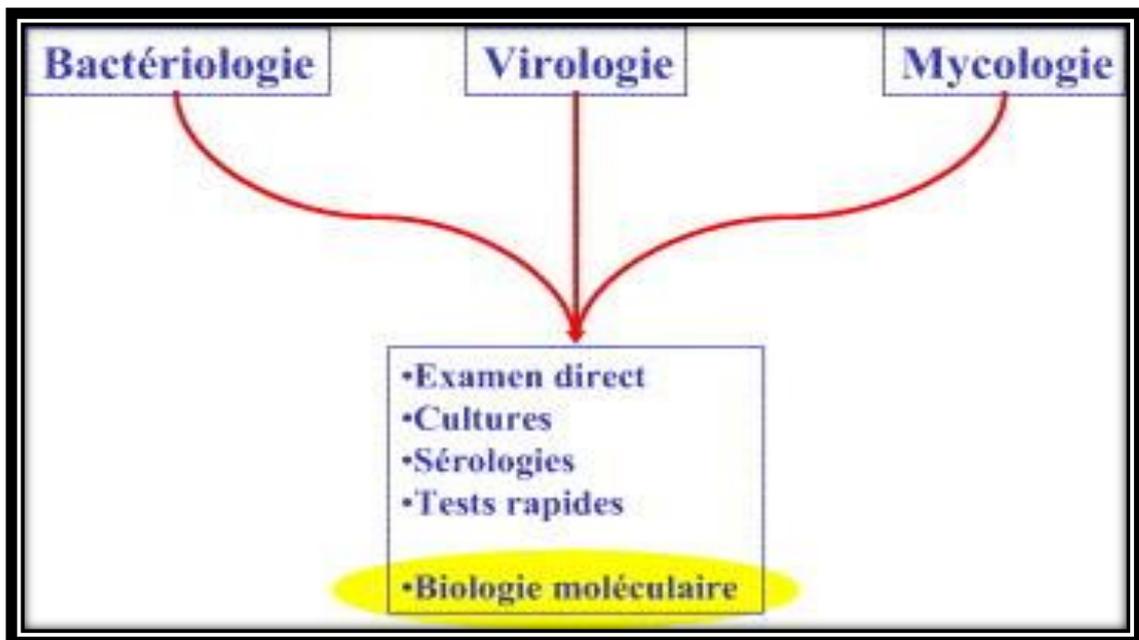


Figure 1 : La biologie moléculaire dans un laboratoire de microbiologie.

Les techniques de biologie moléculaire évoluent rapidement (figure2). Les principes et leurs instructions varient selon l'application. Bien que bon nombre de ces techniques soient différentes, elles ont toutes des avantages et des inconvénients en commun. [1]

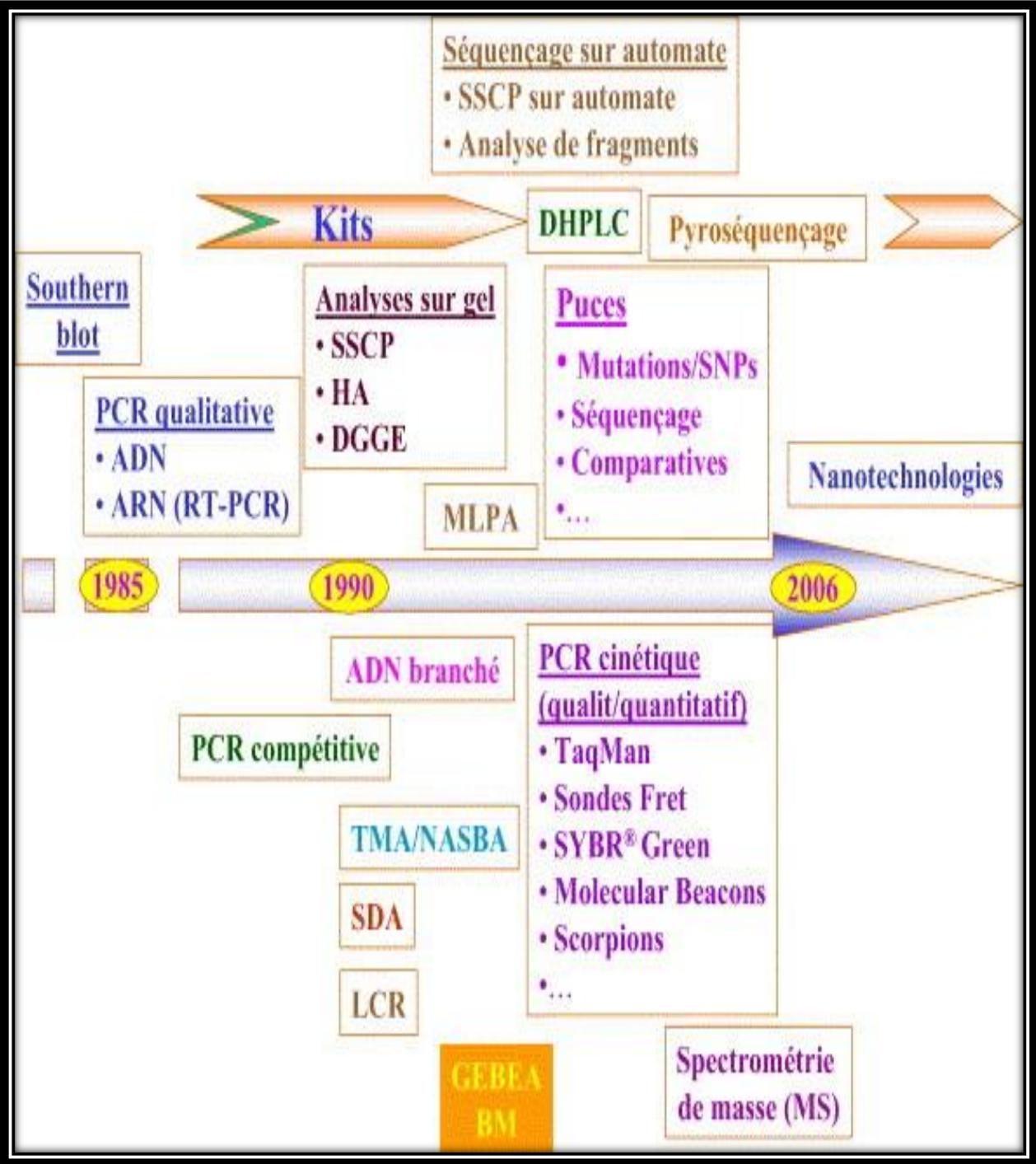


Figure 2: Evolution des techniques de biologie moléculaire depuis la PCR à nos jours.

Partie 1 : Etude bibliographique

I. Historique

Biologie moléculaire est un terme consacré par l'usage. « Biologie moléculaire » devrait inclure tous les aspects moléculaires des études portant sur la vie. Il en va en pratique un peu différemment et l'on entend par là tout ce qui concerne les gènes, les produits des gènes, les aspects moléculaires de l'hérédité, c'est dire que « génétique moléculaire » (Clark 2005) ou « génomique » (Gibson 2004) seraient à la limite plus appropriés. La biologie moléculaire comprend aussi, et depuis peu, tout ce qui concerne les techniques dérivées de l'étude et de l'analyse de l'ensemble du génome, c'est-à-dire la génomique. D'une manière générale, la génomique inclut l'étude de la structure du contenu et de l'évolution du génome, et recouvre de fait la génétique moléculaire, mais en pratique « génomique » recouvre également tout ce qui concerne l'expression génique aussi bien au niveau des ARN messagers (le transcriptome) qu'à celui des protéines (la protéomique) .[2]Ce qui définit peut-être le mieux la biologie moléculaire telle qu'on la pratique actuellement, c'est qu'elle permet de mieux considérer la vie comme ce qu'elle est fondamentalement c'est-à-dire un processus unique, commun aux plantes, aux bactéries, aux insectes et aux animaux, ayant un ancêtre commun et que l'incroyable panoplie de techniques diverses qui constitue actuellement la Biotechnologie s'applique à toutes les formes de la vie (Clark 2005). C'est dire que l'Évolution, au sens darwinien du terme, doit toujours rester au cœur de la réflexion biologique [2](Darwin 1859, Ridley 2004, Stearns 2005).

II. Technique de bases de la biologie moléculaire

1. Prélèvement et méthodes d'analyse des acides nucléiques

a. Structure d'ADN

La molécule d'ADN est la plus grosse molécule de masse moléculaire variant de 3.3.10⁹ chez l'homme à 10⁵ chez les bactéries. C'est une double hélice faite de deux monomères enroulés uns sur les autres. Cette molécule est composée d'une succession répétitive de nucléotides eux-mêmes, dans l'ordre, d'une base purique ou pyrimidique, d'un désoxyribose, et d'un acide phosphorique. La séquence sucre-acide phosphorique est la séquence invariable de l'ADN. Les

nucléotides ne se distinguent pas les uns des autres par leur base. Il y en a, dans l'ADN, quatre types : A, et la Guanine, G, qui sont des purines, Cytosine, C, et la Thymine, T, qui sont des Pyrimidines. La Thymine est la seule base spécifique de l'ADN, ne se retrouve pas dans l'Acide Ribonucléique, RNA, où est remplacée par l'Uridine, U.

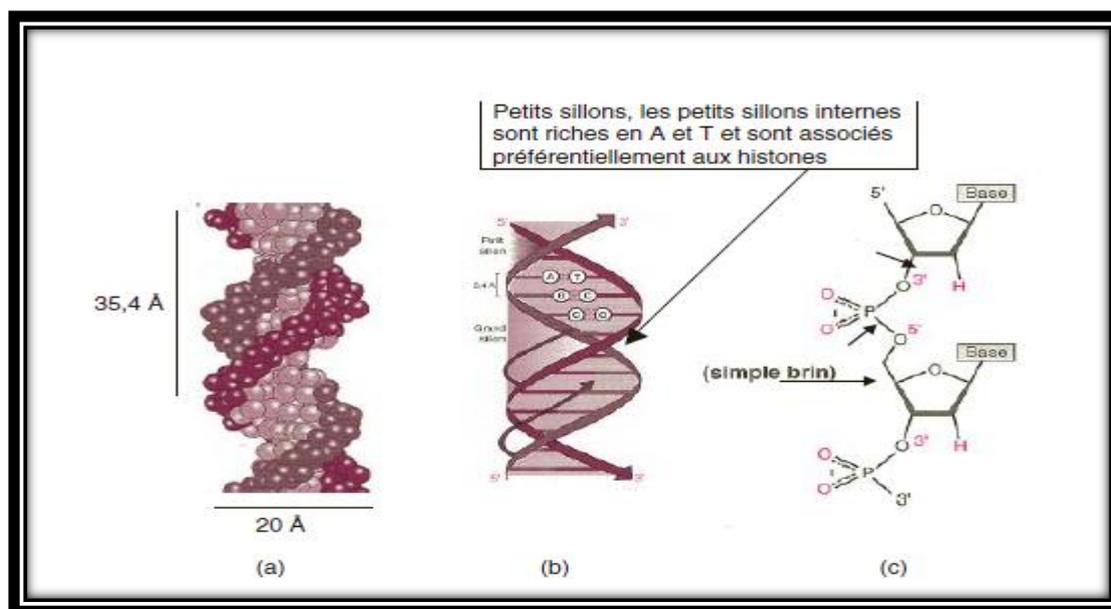


Figure 3: Molécule d'ADN.

b. Extraction d'ADN

L'extraction d'acides nucléiques à partir de matériel biologique nécessite la lyse, l'inactivation des nucléases cellulaires et la séparation de l'acide souhaité des débris cellulaires. La procédure de lyse idéale est souvent un compromis technique et doit être suffisamment rigoureuse pour perturber le complexe initial, mais suffisamment douce pour préserver l'acide nucléique cible. Les procédures de lyse courantes sont les suivantes :

- manipulation de produits chimiques
- digestion enzymatique.

La rupture de la membrane et l'inactivation des nucléases intracellulaires peuvent être combinées. Par exemple, une solution simple peut contenir pour solubiliser la membrane cellulaire et des sels chaotropiques pour inactiver les enzymes intracellulaires.[3]

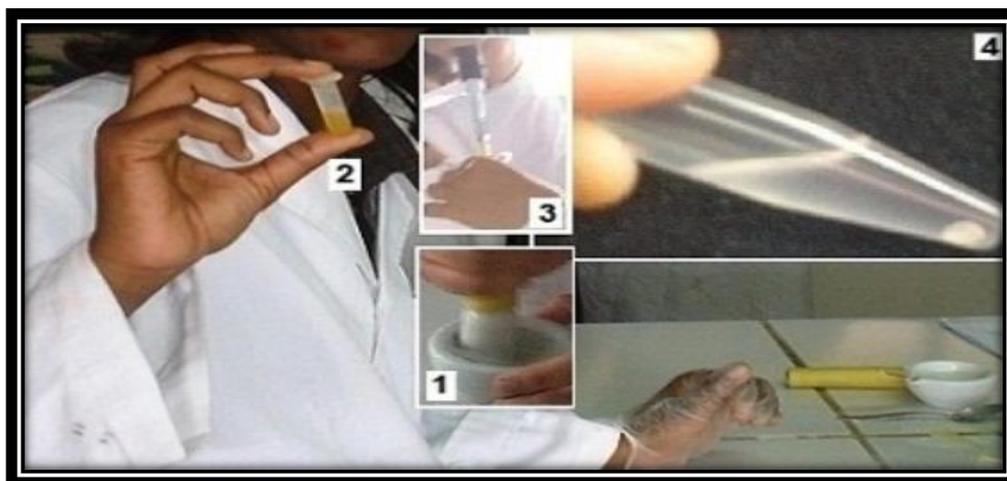


Figure 4: Extraction d'ADN

c. Estimation des quantités d'ADN

Il est rarement nécessaire d'effectuer un dosage très précis et dans la pratique une simple estimation de la concentration suffit.

Elle est effectuée par photométrie (spectrophotométrie), les bases puriques et les bases pyrimidiques absorbant fortement dans l'ultraviolet dans un longueur d onde de 260 nm.

Une unité de densité optique à un longueur d onde de 260 nm correspond à :

Une solution d'ADN double brin à 50 micro/ml une solution d'ARN ou d'ADN simple brin à 25 micro/ml.

Aussi il convient de rechercher une éventuelle contamination protéique car les protéines absorbent non seulement à 280 nm mais aussi à 260 nm. Pour cette raison on fait une seconde mesure de DO à 280 nm. Un ADN pur doit avoir un rapport DO_{260} / DO_{280} compris entre 1,8 et 2. Une éventuelle contamination par du phénol peut être recherchée en mesurant l'absorption à 270 nm.[4]

III. Analyse d'acide désoxyribonucléique

1. Hybridation insitu

- C'est une technique rapide basée sur l'hybridation de l'échantillon avec une sonde fluorescente spécifique d'une région particulière d'un chromosome .
- Elle permet de mettre en évidence des remaniements chromosomique sur noyaux au repos.
- Avec les progrès des techniques, il est possible de générer aujourd'hui des fragments d'ADN de tailles variées correspondant à différentes parties d'un chromosome.
- Pour la Fish., on utilise des sondes spécifiques de région chromosomique ou des sondes capable de s hybrider sur les bras d'une paire chromosomique donnée.[5]

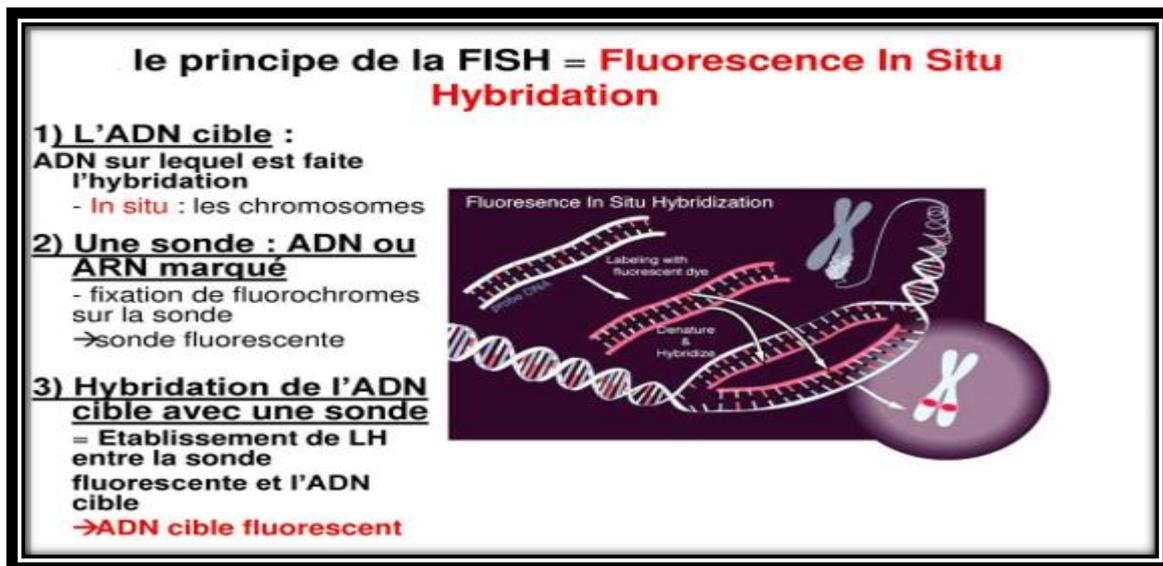


Figure 5: Le principe de la FISH

2. Méthode de southern blot

Les blots sont des techniques de transferts d'ADN, d'ARN et de protéines sur un support de sorte qu'ils peuvent être séparés.

Cette technique permet de localiser une séquence d'ADN parmi les fragments ayant migrés, grâce à une sonde marquée. Donc permet de détecter une séquence d'ADN génomique unique. C'est de repérer dans le génome d'une cellule un fragment particulière d'ADN dont la séquence est complémentaire du fragment recherché. Par exemple un gène donné en utilisant une sonde marquée Le « repérage » se fait par hybridation entre la sonde marquée et le fragment d'ADN. Le marquage de la sonde avec un radioélément permet de visualiser et de quantifier l'hybridation.[5].

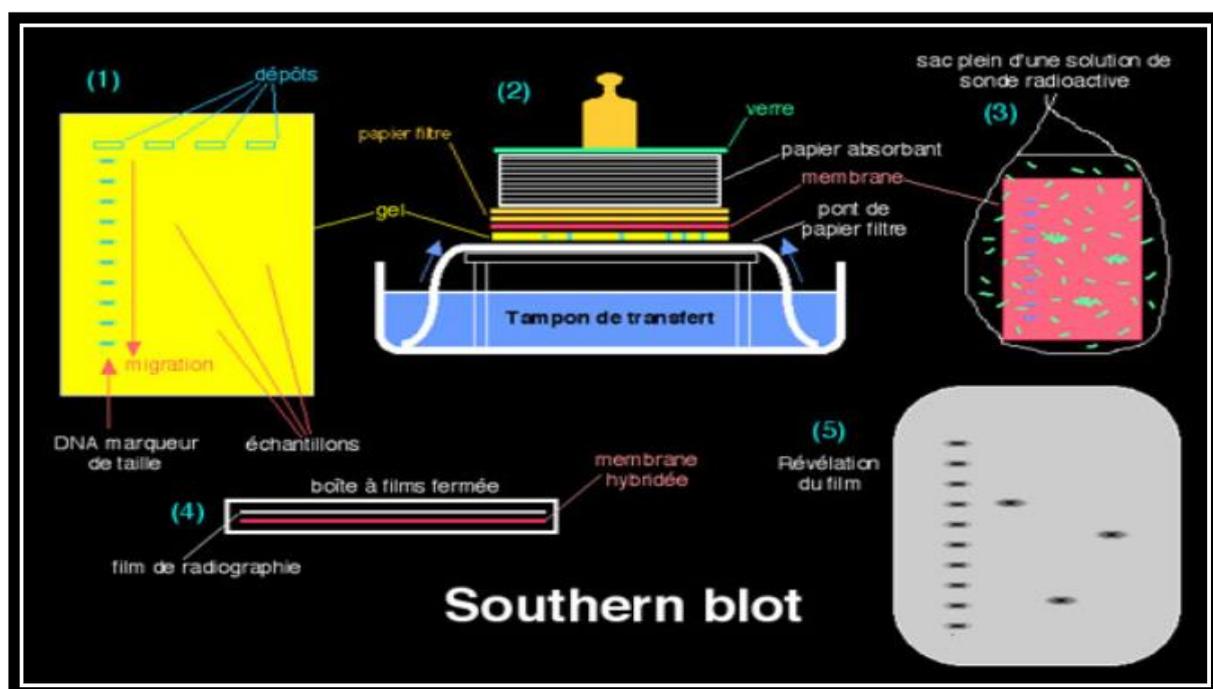


Figure 6: southern blot

3. PCR

PCR une méthode révolutionnaire développée par Kary Mullis dans les années 1980. La PCR est basée sur l'utilisation de la capacité de l'ADN polymérase à synthétiser un nouveau brin d'ADN complémentaire du brin matrice à amplifier. Parce que l'ADN polymérase ne peut ajouter un nucléotide que sur un groupe 3'-OH libre, elle a besoin d'une amorce à laquelle elle peut ajouter le premier nucléotide pour élongation.

Et elle permet d'encadrer une région spécifique de la séquence à amplifier. A la fin de la réaction PCR, la séquence spécifique sera accumulée en milliards de copies (amplicons). [6]

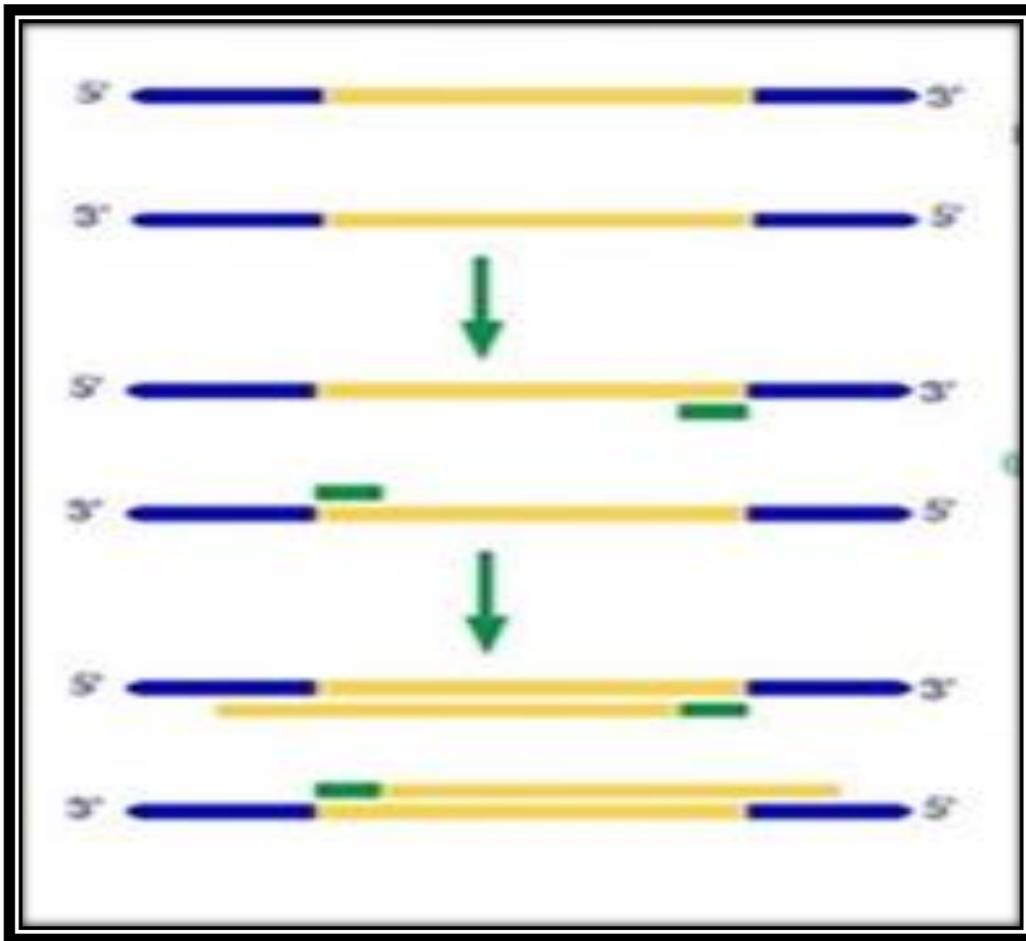


Figure 7: Le principe de PCR

4. Analyse des mutations

Le mot mutation définit tout changement du matériel héréditaire survenant soit dans la lignée germinale, soit dans les cellules somatiques.

Seules les mutations germinales peuvent être transmises à la descendance et sont à l'origine des maladies héréditaires

Il y a plusieurs types de mutations par substitutions, délétions, insertions et par remaniements géniques.

Pour étudier les mutations pouvant affecter le fonctionnement des gènes, plusieurs méthodes peuvent être utilisées :

- L'établissement de la séquence des nucléotides constituant ce gène, méthode relativement lourde mais faible (séquençage direct).
- Deux autres méthodes de séquençage indirect de recherche de mutations ponctuelles, le polymorphisme conformationnel des structures simple brin et l'électrophorèse en gel de gradient dénaturant [8][9][10].

5. Le séquençage direct : méthode de sanger

La méthode de séquençage la plus utilisée est celle qui a été découverte par Sanger. Elle met en œuvre, dans sa version initiale, une succession d'étapes comportant la séparation des deux brins d'ADN, l'hybridation d'une amorce marquée par un élément radioactif ou un dérivé fluorescent et une polymérisation par une ADN polymérase en présence de didésoxyribonucléotides triphosphate (ddNTP). [11]

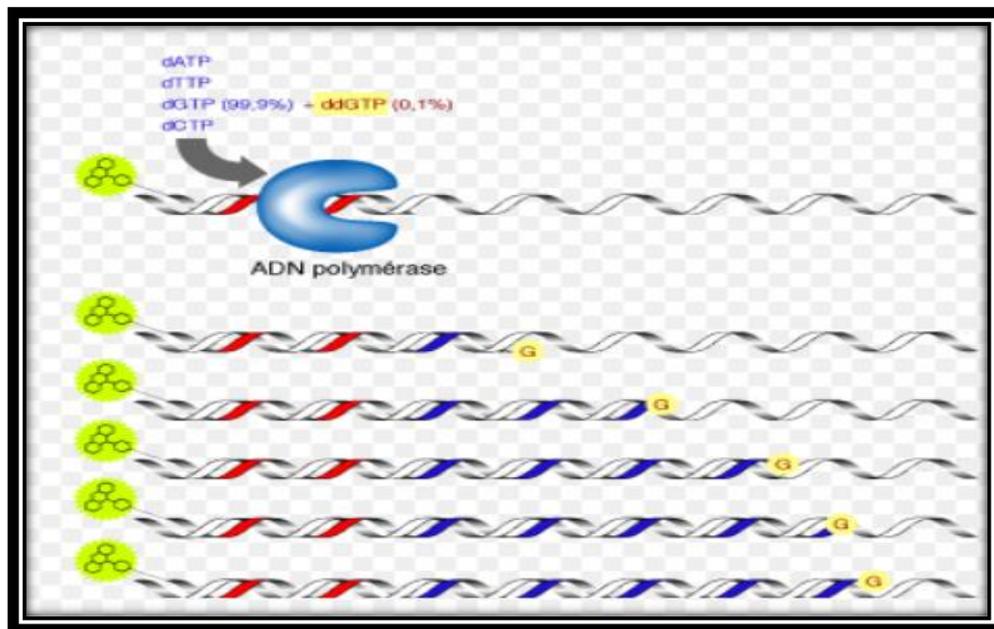


Figure 8: le principe de méthode de sanger

IV. Analyse d'acide ribonucléique

a. Technique de northern blot

➤ Les étapes de northern blot :

- Extraction des ARN totaux

- Dénaturation des ARN : chauffage ou agents dénaturants afin d'éliminer les structures pour que la migration ne s'effectue qu'en fonction de la taille et pas de la forme. Mais aussi pour rendre les ARN accessible à l'hybridation avec la sonde.
- Migration électrophorétique en gel d'agarose : Séparer les molécule ARN en fonction de leur taille.
- Transfert sur membrane .
- Hybridation avec sonde dénaturante .
- Lavage : élimination des sondes fixés sur la membrane de façon non spécifique, c'est à dire non en interaction via une complémentarité de séquence.
- Révélation de la position des sondes [12] .

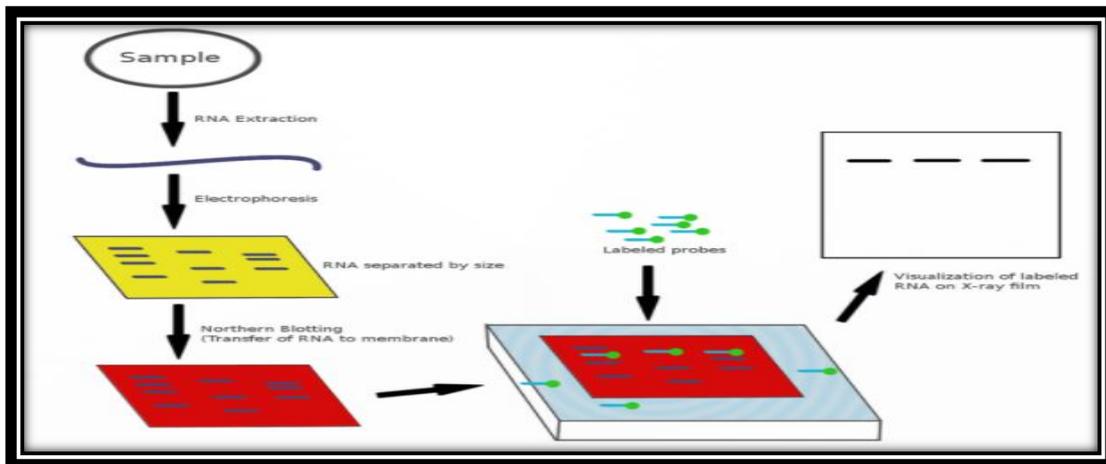


Figure9: le principe de northern blot

b. RT-PCR

La RT-PCR est une technique combinée opposée à la PCR. Il permet la synthèse du complément d'ARN avec le désoxyribonucléotide en utilisant l'ADN polymérase ARN-dépendante.

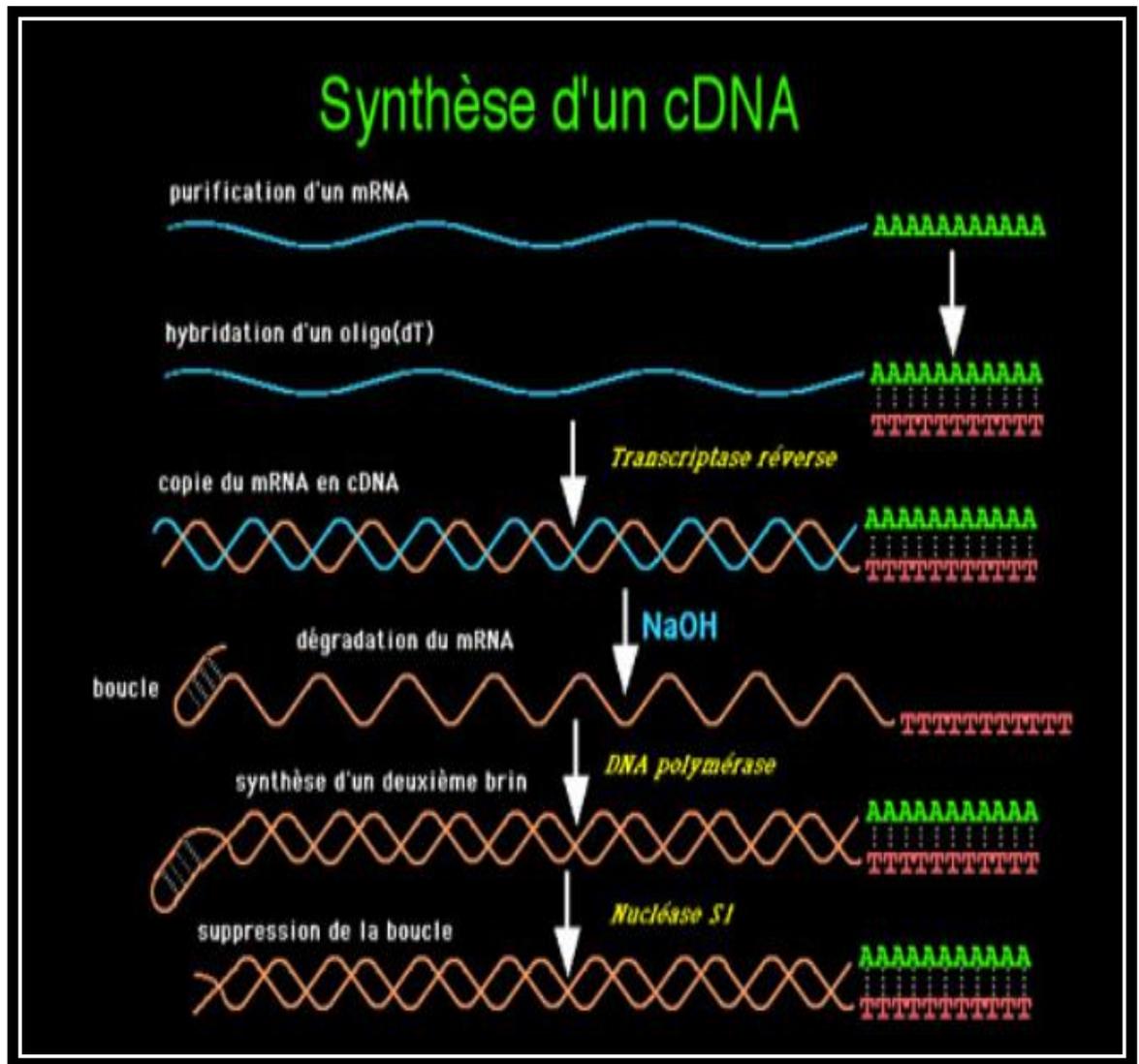


Figure 10: ADNc

Cet ADNc est généralement destiné à l'amplification.[13]

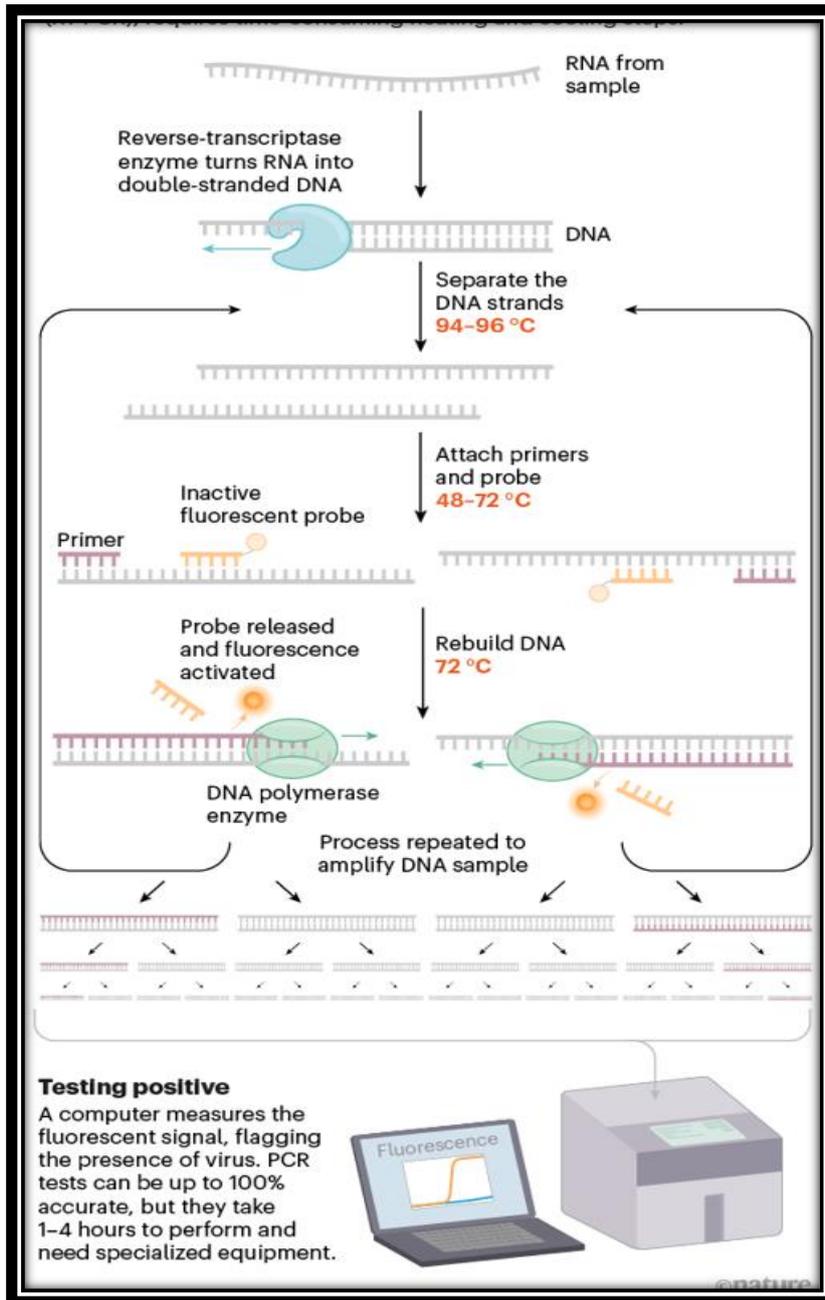


Figure 11: le principe de RT-PCR

V. Les technologies bio-informatique

1. PCR en temps réel

La PCR en temps réel est une révolution dans l'utilisation de la PCR. La technique consiste à mesurer la quantité d'ADN polymérisé à chaque cycle à l'aide d'un marqueur fluorescent. Il permet selon son principe de faire des mesures mais il nécessite un thermocycleur spécial.

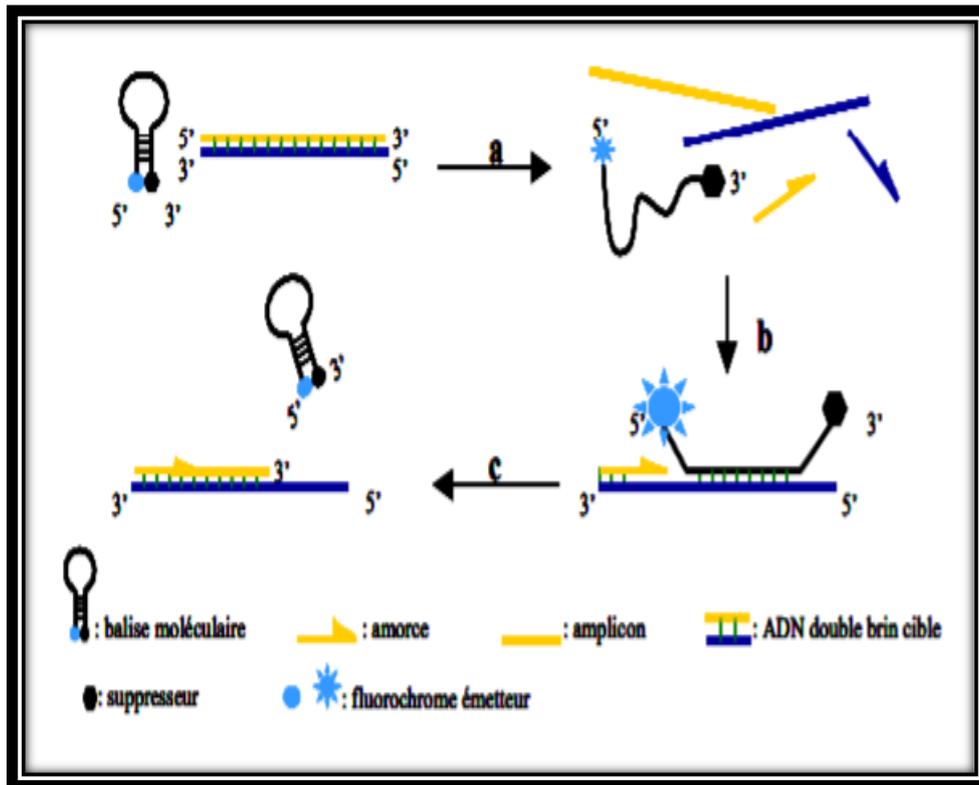


Figure 12: le principe de PCR en temps réel

2. Séquençage a haute débit

Le séquençage à haut débit ou next-generation sequencing (NGS) est une méthodologie moléculaire qui permet le séquençage rapide de milliers à des millions de molécules d'ADN ou d'ARN simultanément, en déterminant l'ordre unique et spécifique des bases des acides nucléiques. Cet outil permet donc le séquençage de plusieurs gènes et de plusieurs individus simultanément, en comparant la séquence du patient à une séquence de référence. Diagnostic moléculaire des principaux agents pathogène.

3. Diagnostic des maladies acquises infectieuses

a. Tuberculose

Maladie due à une mycobactérie du complexe tuberculoses. La plus fréquente Mycobacterium tuberculosis ou bacille de Koch. Maladie transmissible par voie aérienne : formes pulmonaires ou laryngées.

➤ Polymérase chaîne réaction (PCR)

La polymérase chaîne réaction (PCR) a été utilisée dès le début des années 1990 pour la détection des mycobactéries et principalement celle de la tuberculose. L'extraction constitue une étape préalable indispensable à la détection de l'ADN des mycobactéries et peut être réalisée avec des résultats satisfaisants en utilisant des coffrets d'extraction adaptés aux différents types de prélèvements (tissus, sang...). Maintenant, des automates d'extraction permettent d'obtenir des résultats équivalents. L'amplification génique repose sur l'amplification des acides nucléiques ADN après l'extraction.

➤ PCR en temps réel

La polymérase chaîne réaction (PCR) en temps réel (RT PCR) permet de suivre en temps Réel l'amplification des acides nucléiques, elle a fait l'objet de nombreuses évaluations dans Le cadre du diagnostic de la tuberculose. La RT PCR fait appel à deux amorces et une sonde Spécifique de la séquence d'intérêt. La sonde est marquée à ses extrémités par un quencher D'une part, et un fluorophore d'autre part. Lors de la PCR, l'activité 5' exonucléasique de la Taq polymérase provoque la libération du fluorophore qui s'éloigne alors du « quencher » augmentant ainsi la fluorescence émise dans le milieu. La fluorescence devient Proportionnelle à la quantité d'acide nucléique formé, elle-même proportionnelle à la quantité Initiale d'acide nucléique cible. Cette technique présente de nombreux avantages : plusieurs fluorophores peuvent être utilisés simultanément (PCR multiplex), temps d'amplification courts (inférieurs à deux heures), traitement informatisé des données permettant de tester un nombre important d'échantillons en un temps réduit.

➤ Test PCR Xpert MTB/RIF

PCR Xpert TBM/RIF est une méthode très développée de PCR en temps réel (Xpert MTB/RIF, Cepheid, Sunnyvale, CA, Etats-Unis), qui permet de détecter à la fois la présence de MTB et d'une mutation du gène *rpoB* indiquant une résistance à ATB la rifampicine en moins de deux heures [14]. Cette technique est également performante dans les cas infectés par le VIH, avec une augmentation de 45% dans la détection des cas par rapport à l'examen direct au microscope et peut être utilisé pour le diagnostic de la tuberculose extra pulmonaire à partir d'une gamme d'échantillons biologiques. La Xpert MTB / RIF Assay a été rapidement adoptée par l'OMS en Décembre 2010 [15]. Cette technique, outre sa rapidité, semble avoir une sensibilité nettement plus élevée dans les échantillons négatifs à l'examen microscopique (72 %) que les méthodes PCR traditionnelles commercialisées. D'après des analyses de littérature, les performances de l'Xpert MTB/RIF, toujours comparé à la culture comme technique de référence, sont les suivantes : sensibilité variant de 43 % pour les liquides (Plevre, ascite, LCR...) à 81 % pour les biopsies ; spécificité allant de 97 % à 99 % selon le type de prélèvement. [16].

b. Chlamydiae trachomatis

La chlamydiae trachomatis est la bactérie responsable d'une infection sexuellement

PCR

L'infection avec la bactérie *Chlamydia trachomatis* est l'ITSS (MTS) . Elle est très souvent asymptomatique et, non traitée, peut entraîner des complications touchant les organes génitaux et la fertilité.

La technique de dépistage utilisée (PCR) est basée sur la détection de l'ADN ou ARN de la bactérie après amplification. Les résultats sont généralement positifs environ 2 semaines après infection. Les meilleurs résultats sont obtenus lorsque les tout premiers millilitres d'urine sont recueillis sans désinfection préalable chez la femme, avec ou sans désinfection chez l'homme, après au moins une heure sans uriner. Un prélèvement vaginal ou endocervical peut être plus approprié chez la femme qui doit également subir un examen gynécologique.

PCR suivie d'une électrophorèse sur gel en gradient Dénaturant (PCR-DGGE)

Les applications de cette technique chez les chlamydiae sont peu nombreuses. Elle a été utilisée sauf chez *C. trachomatis*.

PCR-DGGE pour but de la recherche des mutations au sein du gène *omp1*. Des isolats cliniques de sérovar D, E et F ont ainsi été étudiés. Chacun des quatre Domaines de la MOMP a été amplifié puis analysé par électrophorèse sur gel en gradient dénaturant. Chaque sérovar présentait un profil de migration spécifique. Aucune variation de séquence n'a été observée au sein des souches de sérovar F. Contrairement, des profils de migration différente de celui de la souche de référence ont été identifiés parmi les souches de sérovar D et E, suggérant la présence de variants. Le séquençage des DV a permis de classer les souches de sérovar D en trois groupes, D, D1 et D2. Les souches du groupe D1 présentaient des substitutions non-synonymes au sein du DC1, et les souches du groupe D2 des substitutions non-synonymes additionnelles au sein du DV4. En ce qui concerne les souches de sérovar E, deux variants ont été identifiés par PCR-DGGE, ne différant respectivement de la souche de référence que par au niveau protéique.

PCR en temps réel

Le prélèvement qui peut être gynécologique, urétral ou urinaire – est mis en contact avec un mélange réactif comprenant des amorces spécifiques des germes à rechercher, des nucléotides isolés (constituants primaires de l'ADN) et une enzyme, la TAQ polymérase. Cette enzyme est capable, même à haute température, de reconstituer un ADN double brin en incorporant les nucléotides du milieu réactionnel sur un brin isolé porteur de l'amorce.

Les amorces sont couplées à un marqueur fluorescent qui est activé lorsque l'amorce se fixe sur l'ADN cible du germe recherché, ce qui permet d'établir sa quantification.

Dans un premier temps, le mélange réactionnel est chauffé à 95°C ce qui sépare les brins d'ADN en deux. Les amorces se fixent alors sur leur cible si celle-ci est présente puis les polymérases

reconstituent à partir de ces amorces deux copies d'ADN double brin identique à l'ADN initial. Ce cycle se renouvelle jusqu'à ce que le signal fluorescent soit détectable.

c. VIRUS VIH

Le VIH est une particule sphérique de 120 nm de diamètre, composée au niveau de l'enveloppe la plus externe, qui est dérivée de la membrane cytoplasmique de la cellule hôte et de la glycoprotéine des tissus hérissés.[17].

Pour simplifier, trois méthodes principales dominent le processus : l'hybridation moléculaire et l'amplification génique ou PCR .

Techniques :

Hybridation : Détection directe d'ADN ou d'ARN sur membrane

Le principe de l'hybridation moléculaire :

- Formation d'un hybride acide nucléique viral de/sonde spécifique du génome viral recherché, sur différents supports, membranes, microplaques, tubes, etc.
- Détection immunologique enzymatique d'hybrides moléculaires : par anticorps anti-nucléique double brin, ou marquage à froid de la sonde puis détection colorimétrique, fluorescence ou chimiluminescence.

Hybridation sur membrane

Hybridation à des sondes moléculaires sur un support et spécifiques soit d'un virus sauvage, soit d'un virus muté, puis détection immuno-enzymatique. Les sondes sont présentes sur des bandelettes, un peu à la manière des antigènes fixés sur les bandelettes d'immunoblots .

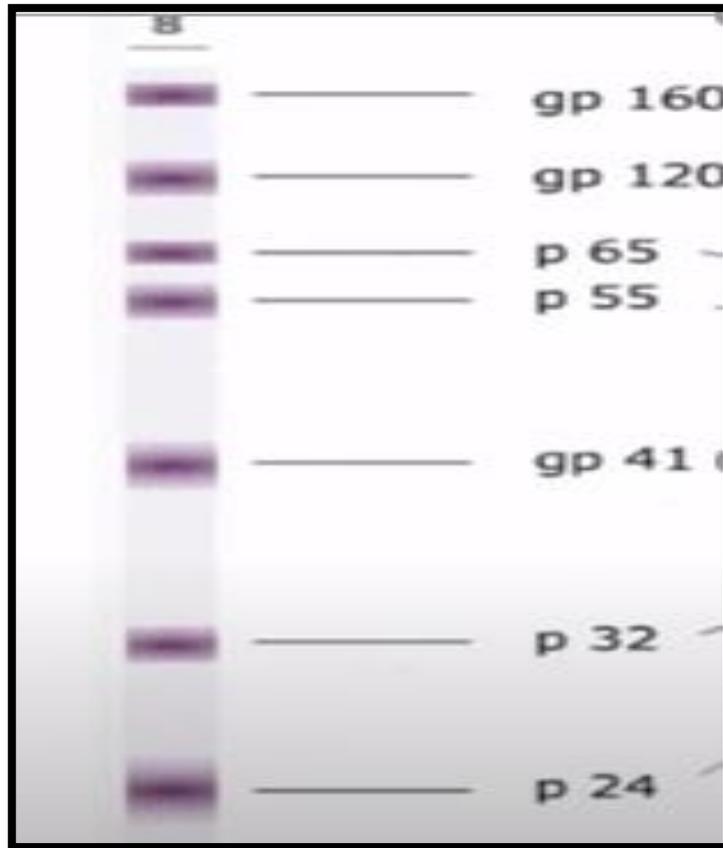


Figure 13: Hybridation sur membrane

➤ **Amplification génique par PCR**

- Amplification génique plus recopiage d'une portion du génome viral grâce à des amorces et à l'action d'une polymérase .

➤ **PCR « en temps réel »**

- Technique qualitative : indique l'existence de virus, lorsque le virus ne peut pas être cultivé, ou lorsque le liquide ne peut pas être bien cultivé.

Détection ou quantification de l'ADN pendant la phase exponentielle par incorporation

d' une molécule fluorescente ou hybridation de sondes spécifiques émettant une fluorescence .[18]

VI. Matérielle et méthodes

A. La tuberculose

1. Réception des échantillons

Les échantillons sont prélevés par une infirmière au niveau des services du laboratoire. Ils sont généralement recueillis le matin à jeûne dans des récipients plastiques étiquetés transparents et résistants à l'écrasement. Chaque récipient doit porter une demande d'examen spécifique de la recherche de BAAR. Il doit obligatoirement porter les mêmes informations sur le patient.

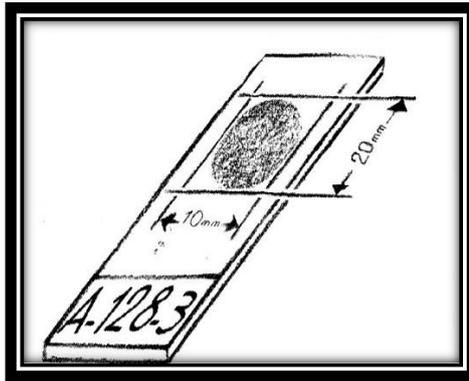
Chaque échantillon doit être enregistré dans le registre du laboratoire, sous un numéro d'ordre, l'âge, le type d'échantillon, la date du jour de la réception et ainsi l'identification de la séquence (c.-à-d. 1 pour le premier, 2 pour le deuxième et 3 pour le troisième prélèvement). Les prélèvements qui ne sont pas emmenés directement au laboratoire doivent être conservés au froid (4 C°) dans une boîte d'une durée ne dépasse pas 3 à 4 jours.

2. Recherche de BAAR

➤ Préparation des frottis

Saisissez chaque lame par la partie numérotée, placez-la à cheval sur un porte-lame, la partie gravée face à vous. Prenez le crachoir correspondant au numéro de la lame, placez le crachoir sur le côté droit du porte-lame et placez son capuchon à côté.

- Passez la poignée en métal sur la flamme, chauffez-la en rouge et laissez-la refroidir.
- Prélever une parcelle de crachat en choisissant si possible une parcelle purulente.
- Faire un frottis aussi fin que possible de 2 cm x 1 cm sur la lame.



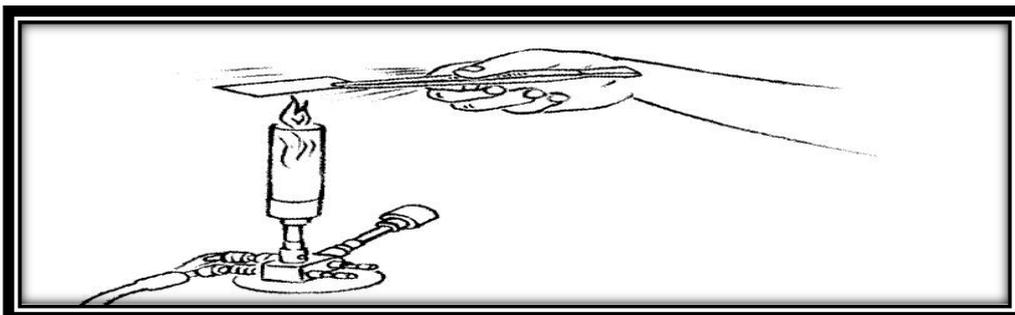
- Placer la lame sur le séchoir.
- Flamber l'anse métallique pour la stériliser avant de prendre un autre crachoir.
- Préparer les autres lames de la même façon.

Séchage

- Laisser sécher les frottis à l'air pendant au moins 15 minutes (15 à 30 min). Ne pas utiliser la flamme pour sécher le frottis.

Fixation

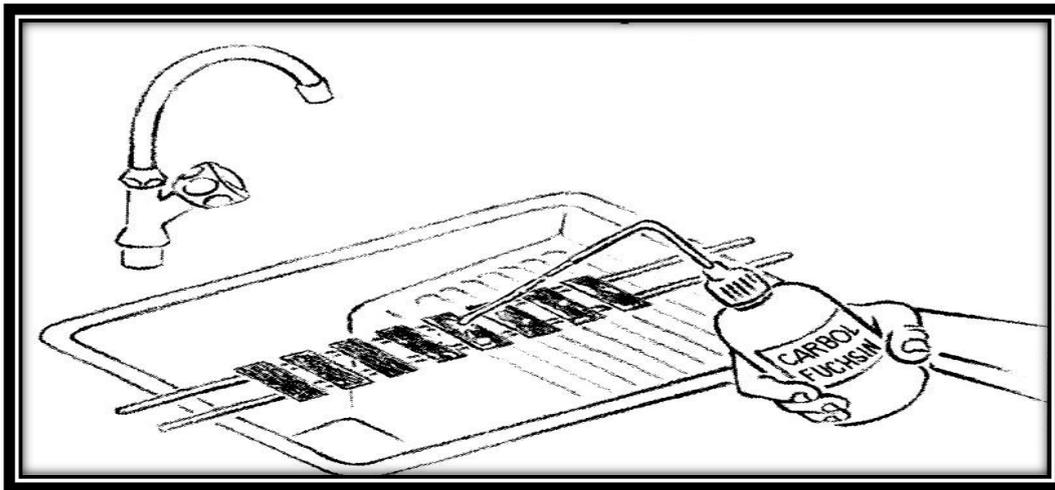
- Prendre avec une pince chaque lame par sa partie gravée, frottis tourné vers le haut.
- Passer la lame 3 fois (en 3 à 5 secondes) à travers la flamme du bec bunsen ou de la lampe à alcool.



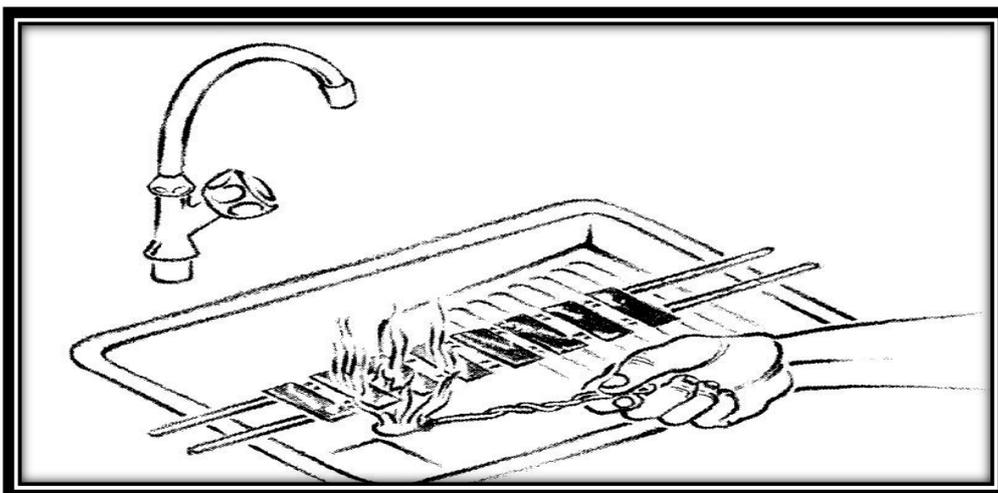
Replacer la lame sur le séchoir propre.

Coloration de Ziehl-Neelsen

- Placer les lames sur le porte-lame, frottis tournés vers le haut, en faisant attention qu'elles ne se touchent pas.



- Couvrir les lames avec de la fuchsine phéniquée de Ziehl. La fuchsine doit être filtrée au travers d'un filtre en papier, placé dans un entonnoir au-dessus des lames.
- Chauffer sous les lames, très doucement, jusqu'à émission de vapeurs, avec un tampon monté à l'extrémité d'une baguette métallique et imbibé d'alcool à brûler.

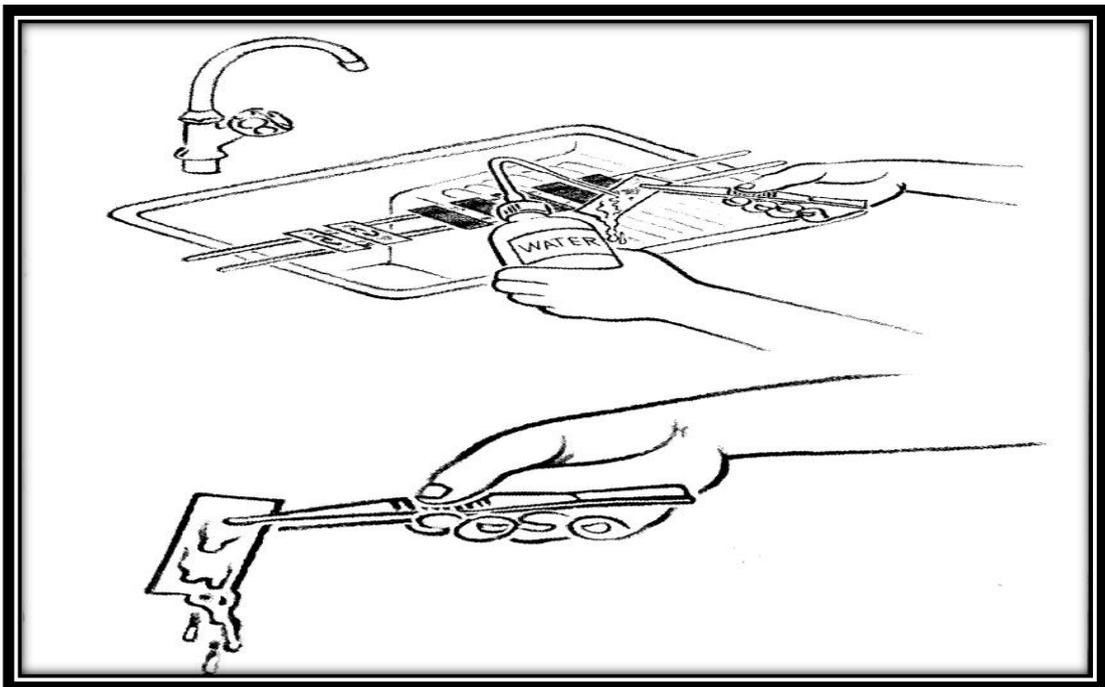


En aucun cas le colorant ne doit bouillir ou se dessécher sur la lame.

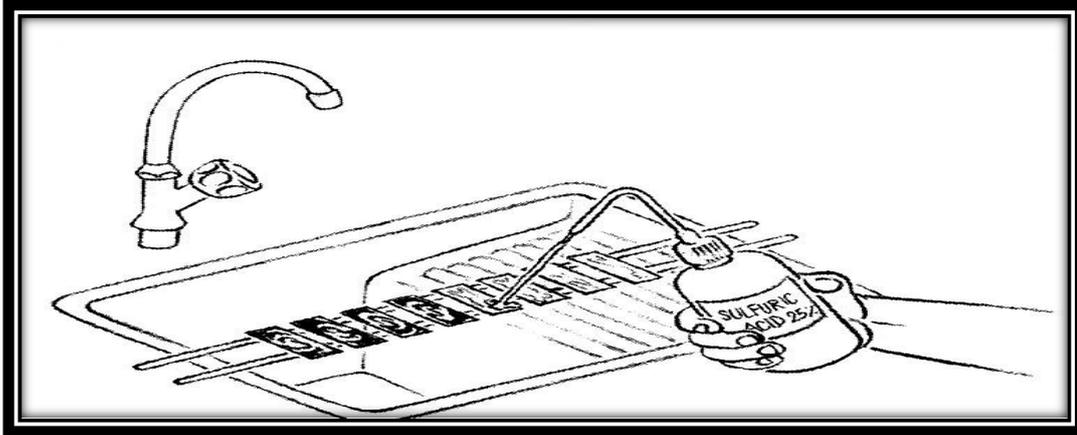
- Laisser agir le colorant chaud pendant 3 minutes.
- Répéter deux fois le chauffage du colorant.

Décoloration

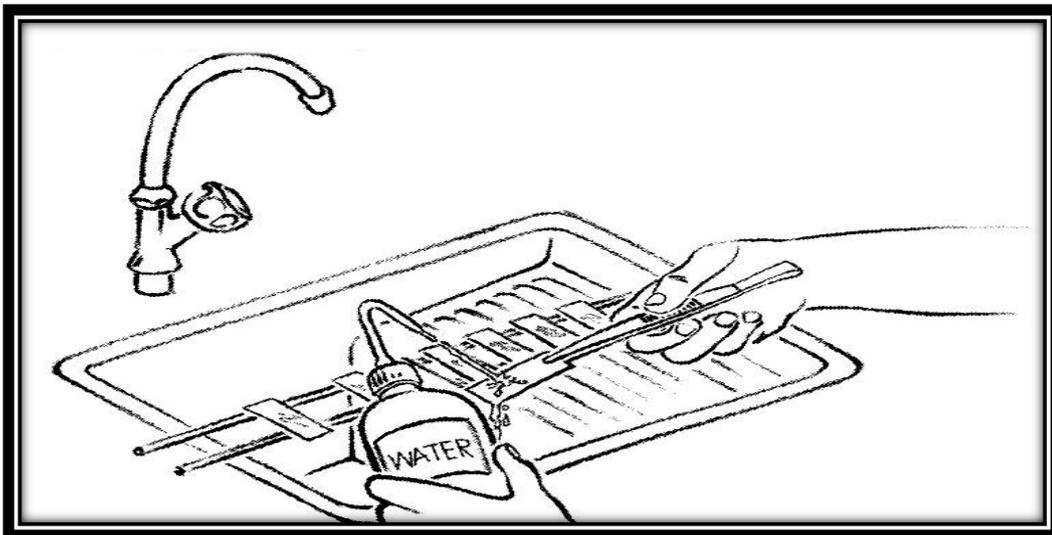
- Rincer chaque lame séparément à l'eau du robinet jusqu'à ce que le colorant libre soit entraîné.
- Replacer toutes les lames sur le porte-lame et couvrir chaque lame séparément avec de l'acide.
- Laisser agir 3 minutes.



- Laver à l'eau.
- Couvrir d'alcool à 95°.



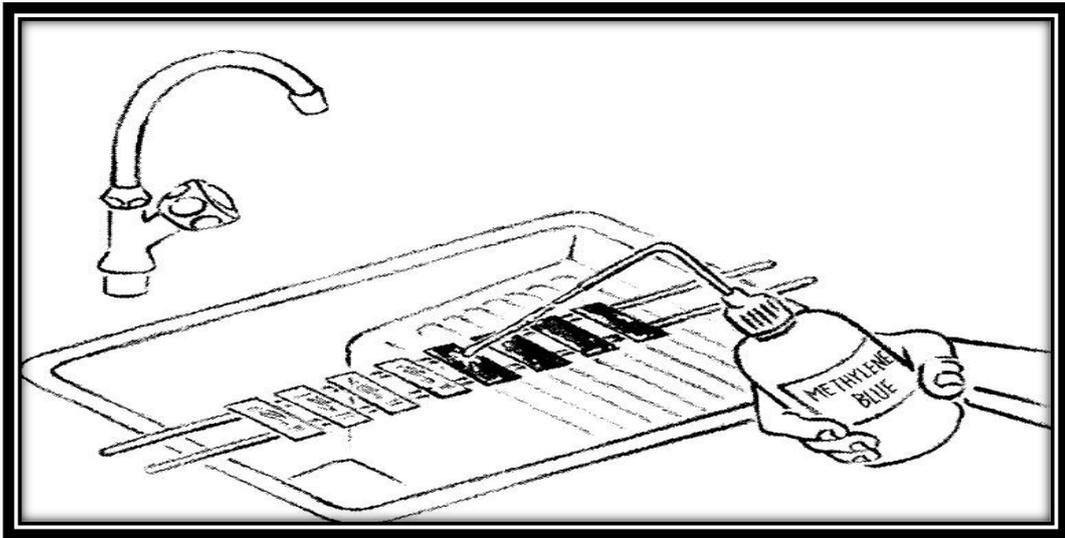
- Laisser agir 5 minutes.
- Rincer à nouveau à l'eau.



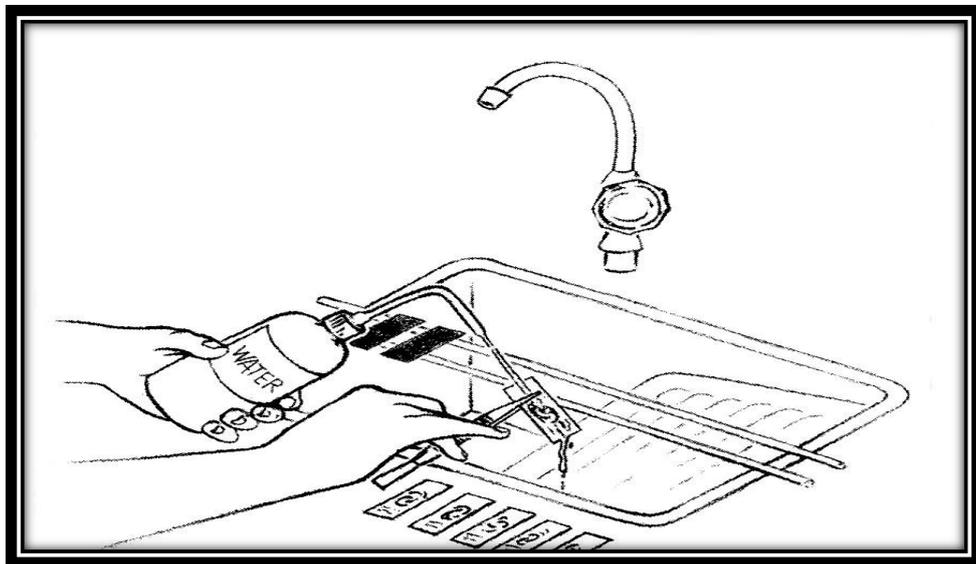
- Décolorer une seconde fois avec l'acide jusqu'à ce que toute coloration ait pratiquement disparu.
- Rincer à nouveau à l'eau chaque lame séparément.

Contre-coloration

- Replacer les lames décolorées sur le porte-lame et recouvrir les frottis avec du bleu de méthylène à 0,3 % pendant 1 minute.



- Rincer chaque lame à l'eau et laisser sécher à l'air libre.



La décoloration des frottis peut être obtenue en utilisant uniquement de l'acide sulfurique à 25 % à plusieurs reprises jusqu'à obtenir une décoloration totale du frottis.

3. Examen microscopique

La lecture microscopique se fait à l'immersion au grossissement 10 x100.



Figure 14 : frottis de BK sous microscope avec $G^* 1000$

4. Culture sur milieu solide

La culture sur milieu Löwenstein-Jensen est la plus employée pour diagnostiquer des BAAR de façon très délicate en raison de la croissance très lente de ce bacille

Technique :

Fluidification – Décontamination :

Dans un tube à centrifuger, conique, stérile, de 50 ml, à fermeture hermétique :

- Verser 2 à 3 ml d'expectoration.
- Ajouter deux fois le volume d'expectoration en soude (NaOH) à 4%.
- Ajouter quelques gouttes d'indicateur de pH (bleu de bromothymol).
- Agiter vigoureusement à l'aide d'un vortex.
- Incuber dans une étuve à 37°C, pendant 20 minutes.

Neutralisation :

Neutraliser à l'aide d'une solution d'acide sulfurique à 4%. La neutralité est atteinte lorsque la solution vire au jaune.

Centrifugation :

Centrifuger à 3.000 T/min pendant 20 mn (température fixée à 20 -25°C). Éliminer le surnageant, le verser doucement et en une seule fois dans un pot contenant de l'eau de javel à 5° chlorométrique.

➤ **Ensemencement du culot**

Resurprendre le culot et ensemer des tubes de milieu solide (2 à 3 gouttes ou 0,2 ml par tube) .

Déposer une goutte sur une lame pour un examen microscopique de la morphologie des bacilles.

Incuber les tubes à 37°C.

B. Chlamydiae

1. Utilisation du cassette



Figure 15 : kit de chlamydiae

On met sur l'échantillon 6gouttes de la solution B et puis 5gouttes de la solution A dans un tube et puis on vide sur cassette 3gouttes de la solution et on laisse 2minutes et après on fait la lecture. Ce test rapide de dépistage de l'infection à chlamydia est un test immun chromatographique et sert à la détection qualitative de chlamydiae. La membrane de test est revêtue d'anticorps spécifiques d'antigènes, monoclonaux au niveau de la ligne de test (T) ainsi qu'avec des anticorps de chèvre anti-souris au niveau de la ligne de contrôle (C). Au cours du test, les antigènes de chlamydia éventuellement présents dans la solution d'antigène extraite réagissent avec les anticorps de chlamydia. Grâce aux forces capillaires le mélange réagit avec les anticorps de chlamydia sur la membrane et génère une ligne rose au niveau de la zone de test (T).

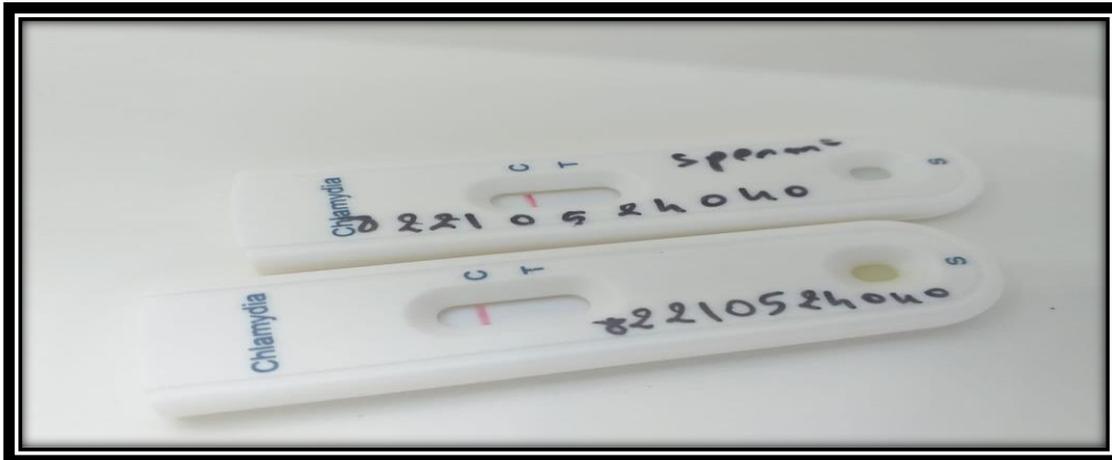


Figure 16: cassette de chlamydiae

C. Virus VIH

Tests de dépistage :

- Deux types de tests de dépistage sont utilisés
 - Tests ELISA (Enzyme Linke Immunosorbent Assay)
 - Tests rapides

1. Test ELISA :

- La première étape se base sur la détection d'anticorps produits en réponse à une infection par le VIH, ce sont les anticorps anti-VIH.
- Détectent les mêmes types d'anticorps (antiVIH-1 M, O, et anti-VIH-2) que les ELISA avec résultats obtenus en 2 à 5 min.
- Se conservent à température ambiante.



Figure 17: Test ELISA

2. Test rapide :

La première étape se base sur cassette comme la procédure suivante :

Sida : les autotests

Avant le test :

- Ne pas manger, boire ou faire de soins dans la bouche 30 minutes avant
- Enlever les produits dentaires couvrant les gencives (dentiers...)

Comment ça marche ?

1. Prélèvement d'un échantillon de salive



2. Le prélèvement est placé dans un liquide de dépistage



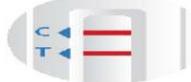
3. Si une ligne apparaît à côté du « C », le test fonctionne correctement



4. Résultats

Négatif : aucune autre ligne n'apparaît

Positif : une ligne apparaît à côté du « T » montrant la présence d'anticorps anti-VIH et la possible contamination



Efficacité :

- Si le test est **négatif** : 99,9 % de fiabilité
- Si le test est **positif** : 91,7 % de fiabilité, 8,3 % de faux-positifs (il faut donc confirmer par un véritable test de dépistage)

Source : fabricant (Oraquick)



Figure 18: les étapes de dépistage de VIH

- Peuvent être effectués sur le sérum, plasma et sang total prélevé au bout du doigt.



Figure 19 : cassette de VIH

VII. Résultats et discussions

a. Tuberculose

1. Examen microscopique :

Après la coloration des lames par ZN à chaud, frottis sont BAAR positive frottis marqués par un microscope sous forme des bâtonnets isolés en petites amas, colorées rose par la fuchsine phénique, droits ou incurvés, plus moins fragmentés.



Figure 20: bk positive sous microscope avec G*1000

2. Culture sur milieu de Jensen :

Après 3 ou 4 semaines d'incubation à l'étuve à 37° C. Le bacille de koch apparaissait comme épais, grossier, immobile et a été isolé dans du chou-fleur à partir de crème beige.



Figure 21: milieu de Jensen avant la croissance du BK



Figure 22: la croissance sur le milieu de Jensen du BK

Et aussi selon J.C. YOMBI ; U.N. OLIGNA qui publie dans la revue de décembre 2015 accorder les mêmes résultats

b. Chlamydiae

1. Résultat de test rapide

La présence d'une ligne rose au niveau de la zone de test indique un résultat positif tandis que l'absence d'une ligne rose indique un résultat négatif. Comme contrôle de procédure, une ligne rose apparaîtra toujours au niveau de la zone de contrôle (C) indiquant un volume d'échantillon suffisant. Et Comme le souligne le Dr Tartina Legkoby, chef de projet médical

au service d'évaluation comportementale professionnelle, les tests de chromatographie membranaire sont des tests unitaires faciles de sensibilité variable.

Leur utilisation est limitée à l'échantillonnage de l'intérieur du col de l'utérus.

c. Virus VIH

1. Test rapide :



Figure 23: Test rapide

2. Test ELISA :

Pour ce test on base sur l'apparitions de la coloration ou pas . S'il ya une coloration on dit positive si pas négative et ça en fonction de la mesure du DO. Lorsque il ya une coloration donc la réaction se fait (la transformation du substrat vers le produit).Et aussi selon l'article de l'ONUSIDA MISE À JOUR de novembre test de dépistage ELISA et test rapide le plus utile et pour ELISA ; adapté aux banques de sang qui analysent plus de 100 échantillons par jour pour un dépistage de masse à des fins de surveillance dans d'autres cas ; les tests simples/rapides ne nécessitent pas d'équipement spécial ou de compétences particulières car ces deux types de tests sont également fiables l'un pour l'autre tant qu'ils sont utilisés correctement.

CONCLUSION

Pendant mon stage initial intitulé l'intérêt de la biologie moléculaire dans le diagnostic des maladies infectieuses. J'ai appris beaucoup de méthodes biologiques à travers la pratique exercée sur mon sujet de stage qui m'ont aidées à le diagnostiquer ces maladies infectieuses étudiées à savoir : TUBERCULOSE, CHLAMYDIAE, VIH.

La biologie moléculaire a permis une avancée significative dans le diagnostic des maladies infectieuses, notamment avec les nouvelles technologies de biologie moléculaire, d'automatisation et de bio-informatique. Cependant, il reste un domaine de recherche en raison de sa complexité évolution permanent. Les techniques de biologie moléculaire sont des techniques qui offrent une meilleure sensibilité et spécificité et un gain de temps considérable par rapport aux méthodes conventionnelles.

La biologie moléculaire est l'étude de la structure et des fonctions des macromolécules biologiques, et plus spécifiquement des acides nucléiques telle que (ADN et ARN). Elle reste un point de rencontre entre la génétique et la microbiologie. La découverte de la PCR dans les années 80 est une révolution de la biologie moléculaire .et a rendu son usage accessible à de nombreux laboratoires dans la place du diagnostic. Ainsi l'automatisation de ses techniques, et l'utilisation en pratique des nouvelles technologies. La microbiologie a largement bénéficié de ces techniques dans le diagnostic, et l'interprétation d'affections des maladies acquises infectieuses très diverses.

Pour le diagnostic des maladies acquises infectieuses, la PCR reste la méthode la plus utilisée et la plus usagée .Elle à la fois rapide et efficace et spécifique pour chaque maladie.

REFERANCES

- [1] J. Lamoril, M. Bogard, N. Ameziane, J.-Deybach, and P. Bouizegarène, “Biologie moléculaire et microbiologie clinique en 2007,” *Immuno-analyse Biol. Spécialisée*, vol. 22, no. 1, pp. 5–18, Feb. 2007, doi: 10.1016/j.immbio.2006.11.003.
- [2] B. Swynghedauw, *Biologie et génétique moléculaires*, vol. 2000, no. 206. 2000.
- [3] M. Somma, “WORLD HEALTH ORGANIZATION REGIONAL OFFICE FOR EUROPE WELTGESUNDHEITSORGANISATION REGIONALBÜRO FÜR EUROPA ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE BUREAU REGIONAL DE L’EUROPE Analyse d’échantillons alimentaires pour la présence d’organismes génétiquement modifiés.”
- [4] “No Title,” doi: <http://acces.ens-lyon.fr/biotic/biomol/techgen/html/glossair.htm>.
- [5] “Les techniques d’étude : la cytogénétique moléculaire - ppt video online télécharger.” <https://slideplayer.fr/slide/11829381/> (accessed May 31, 2021).
- [6] H. Études, “de l’ Université de recherche Paris Sciences et Lettres à partir de premisses incertaines,” 2017.
- [7] “Réaction en chaîne par polymérase (PCR).” <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/> (accessed May 31, 2021).
- [8] “Biochimie génétique biologie moléculaire Elsevier / masson.” <https://www.unitheque.com/biochimie-genetique-biologie-moleculaire/abreges-pcem/elsevier-masson/Livre/4372> (accessed Jun. 02, 2021).
- [9] “- Freifelder D. *Biologie moléculaire*. Ed Masson, paris, 1990 : 28-46 / 174-175.
- [10] “Passarge E. *Atlas de poche génétique*. Médecine Sciences Flammarion. Editions 2003 : 20-322.
- [11] “Mini Manuel de Biologie moléculaire - Cours + QCM + QROC - Livre et ebook Sciences de la vie et santé de Abderrahman Maftah - Dunod.” <https://www.dunod.com/sciences-techniques/mini-manuel-biologie-moleculaire-cours-qcm-qroc-0> .

- [12] “Cartes mémoire : Southern Blot / Northern Blot / Western Blot | Quizlet.”
- [13] R. C. Heller, S. Chung, K. Crissy, K. Dumas, D. Schuster, and T. W. Schoenfeld, “Engineering of a thermostable viral polymerase using metagenome-derived diversity for highly sensitive and specific RT-PCR,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 47, no. 7, pp. 3619–3630, Apr. 2019.
- [14] B. Ninet, P. Roux-Lombard, J. Schrenzel, and J.-P. Janssens, “Nouveaux tests pour le diagnostic de la tuberculose,” *Rev. Mal. Respir.*, vol. 28, no. 6, pp. 823–833, Jun. 2011.
- [15] M. Raviglione et al., “Scaling up interventions to achieve global tuberculosis control: progress and new developments,” *Lancet*, vol. 379, no. 9829, pp. 1902–1913, May 2012.
- [16] “Les nouveaux tests de diagnostic de la tuberculose - EM consulte.” <https://www.em-consulte.com/article/134788/les-nouveaux-tests-de-diagnostic-de-la-tuberculose> (accessed Jun. 06, 2021).
- [17] O. Gb, *Manuel sur le VIH et le SIDA à l’usage du Personnel*, no. July. 2004.
- [18] “Taxonomie.” <http://www.microbes-edu.org/etudiant/methodediag.html> (accessed Jun. 10, 2021).
- [19] “Taxonomie.” <http://www.microbes-edu.org/etudiant/methodediag.html> (accessed Jun. 10, 2021).
- [20] I. Le, “Test de dépistage de l’ infection à chlamydia.”