

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE DE M'SILA

FACULTE : SCIENCES

DEPARTEMENT : SNV

N° : .....



DOMAINE : SNV

FILIERE : BIOLOGIE

OPTION : BIOTECHNOLOGIES VEGETALES

Mémoire présenté pour l'obtention  
Du diplôme de Master Académique  
En Biotechnologies Végétales

Par: - **DEBAB Karima**  
- **MADASSE Habiba**

Intitulé

**Identification de mutations ponctuelles  
dans des gènes par l'approche PCR-  
électrophorèse**

Soutenu devant le jury composé de :

KHALFA Hanane	MCB,	Université de M'Sila	<b>Présidente</b>
BENHISSEN Saliha	MCB,	Université de M'Sila	<b>Examinatrice</b>
YAHIAOUI Merzouk	MCB ,	Université de M'Sila	<b>Promoteur</b>

Année universitaire : 2019 /2020

# Remerciements

Nous adressons nos remerciements à Allah le tout puissant qui nous a aidé à réaliser ce travail.

Nous adressons nos remerciements à toutes les personnes ayant participé de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire.

Nous tenons à adresser tout particulièrement et en premier lieu nos plus sincères remerciements à notre rapporteur Dr **YAHIAOUI Merzouk** pour avoir accepté de nous encadrer et pour tous les encouragements, les conseils et les orientations qu'il nous a prodigués durant la préparation de notre mémoire .

Comme nous avons aussi l'obligation impérieuse d'adresser nos remerciements aux membres du jury .

Nous adressons nos remerciements à l'ensemble de l'équipe de laboratoire et de département.

# Dédicace

je dédie ce modeste travail à :

Mes très chers parents qui m'ont beaucoup soutenu et encouragé jusqu'au bout et qu'Allah leur accorde une longue vie.

Mon frère Oussama, Mes sœurs Khadîdja, Fatna, Mariem, Dellel.

Mon mari.

Mes amies : Bouchra, Wissem et tous les membres de groupe de Biotechnologie végétale.

Sans oublier de dédier ce travail à ma chère amie Madesse Habiba à qui je souhaite le bonheur et le succès dans sa vie.

En fin je le dédie à tous ceux qui j'ai connu de près ou de loin.

Karima

**Karima**

# Dédicace

Je dédie ce modeste travail à : Mes très chers parents qui m'ont beaucoup soutenu et encouragé jusqu'au bout et qu'Allah leur accorde une longue vie. Ma sœur Fayza, mon frère Khaled et ma grand mère Khaira et sa grande famille .

Mes amies : Bouchra, wisssem, Fatima et tous les membres de groupe de biotechnologie végétale.

Sans oublier de dédier ce travaille à Debeb Karima à qui je souhaite le succès dans sa vie. En fin je le dédie à tous ceux qui j'ai connu de près ou de loin.

**HABIBA**

# Sommaire

Introduction .....	01
<b>DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	
I. Réaction de polymérase en chaine (PCR).....	02
I.1. Définition .....	02
I.2. Principe .....	02
I.3. Les acteurs de la PCR.....	02
I.4. La réaction de polymérisation .....	03
I.5. Comment fonctionne la PCR.....	03
I.6. Notion de température de fusion « Tm ».....	04
I.7. Les étapes de PCR.....	04
I.7.1. Etape de dénaturation thermique .....	04
I.7.2. Etape de d'hybridation thermique .....	04
I.7.3. Etape d'élongation des amorces .....	05
I.8 Caractéristique de la PCR.....	06
I.8.1. Spécificité analytique .....	06
I.8.2. Sensibilité analytique .....	06
I.8.3. Reproductibilité .....	07
I.8.4. Précission .....	08
I.8.5. Répétabilité.....	08
I.9 Les types de PCR.....	08
I.9.1. PCR multiplexe .....	08
I.9.2. PCR simplexe .....	08
I.9.3. PCR point final .....	09

<b>I.9.4. PCR en temps réel .....</b>	<b>09</b>
<b>I.9.5. PCR nichée .....</b>	<b>09</b>
<b>I.9.6. PCR-Elisa .....</b>	<b>10</b>
<b>I.9.7. RT-PCR.....</b>	<b>1</b>
<b>I.9.7.1 Le teste de PCR .....</b>	<b>11</b>
<b>I.10. Application de PCR.....</b>	<b>12</b>
<b>I.11. Les avantages de PCR.....</b>	<b>13</b>

## **Matériel et méthodes**

<b>I. Souche étudiées .....</b>	<b>14</b>
<b>II. Objectif du travail .....</b>	<b>14</b>
<b>III. Culture des souches bactériennes .....</b>	<b>14</b>
<b>IV. Extraction de l'ADN.....</b>	<b>15</b>
<b>V. Recherche de gène par PCR.....</b>	<b>15</b>
<b>V.1. Recherche de gènes par PCR simplex.....</b>	<b>16</b>
<b>V.1.1. Composants des réaction PCR .....</b>	<b>16</b>
<b>V.1.2. Calcul des volumes et concentration des composants de  . sréactions PCR.....</b>	<b>17</b>
<b>V.2. Recherche de gènes par PCR multiplex.....</b>	<b>20</b>
<b>VI. Electrophorèse sur gel d'agarose .....</b>	<b>23</b>
<b>VII. Visualisation des fragments d'ADN .....</b>	<b>24</b>
<b>Résultats et Discussion .....</b>	<b>25</b>
<b>Conclusion .....</b>	<b>32</b>
<b>Références bibliographique .....</b>	<b>33</b>

# *Introduction*

## INTRODUCTION

*Escherichia coli* est une bactérie intestinale à Gram négatif, découverte en 1885 par Theodor Escherich, elle est très commune chez l'être humain et les mammifères et c'est un très bon modèle d'étude de la virulence bactérienne. En effet, cette bactérie est hétérogène : la majorité de ses souches sont dites commensales, elles colonisent l'intestin des animaux à sang chaud peu de temps après la naissance et participent aux fonctions de la flore intestinale dans la digestion des aliments et l'apport de certaines vitamines ; les autres souches sont dites pathogènes, elles sont subdivisées en souches à tropisme intestinal et ceux à tropisme extra intestinal.

Les souches d'*E.coli* acquises les gènes de virulence au cours de l'évolution de leur génomes. En effet, ces gènes correspondent à des séquences d'ADN bactérien, codant pour une protéine impliquée dans un processus menant à la virulence de la bactérie.

En pratique; dans les laboratoires de recherche spécialisés dans l'étude de la virulence bactériennes et ses mécanismes, afin de détecter les gènes impliqués, les chercheurs ont adopté une stratégie très efficace, basée sur le criblage de la région contenant le gène d'intérêt et ce par une approche « PCR-électrophorèse ».

Dans ce sens, nous nous sommes intéressés à la recherche de quelques gènes contenus dans le génome de souches d'*E. coli* phénotypiquement pathogènes, et ce en suivant l'approche PCR-électrophorèse, en ciblant par des amorces spécifiques les gènes *fimH* et *sfaS* par PCR simple et les trois gènes *fimH*, *papA* et *kpsMTII* par PCR multiplex.

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'un travail de recherche, mené par le Docteur YAHIAOUI M. portant sur la virulence et la résistance aux antibiotiques de souches cliniques d'*Escherichia* à l'origine d'infections urinaires communautaires.

*Données*  
*bibliographiques*

## Réaction de polymérase en chaîne (PCR)

### I. Définition

L'Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology (**Datta, Smite et al ,2000**) définit plus précisément la PCR comme étant « méthode par laquelle une séquence spécifique de nucléotides d'un acide désoxyribonucléique double-brin est amplifiée. La séquence est identifiée par l'utilisation de courts oligonucléotides synthétiques complémentaires des deux régions terminales de la séquence d'ADN à amplifier : ces nucléotides sont rallongés par une ADN polymérase à partir de la lecture de la matrice d'ADN. Les nouvelles chaînes couvrent la région délimitée par les deux régions terminales choisies. Les chaînes naissantes sont dénaturées par la chaleur et le processus est répété un grand nombre de fois.

### II. Principe

La PCR est une suite de cycles ,qui se répètent en boucle ,comportant chacun trois paliers de température. De plus, chacun de ces paliers est caractérisé par une réaction chimique distincte. En moyenne une PCR comporte entre 20 et 40 cycles.

### III. Les acteurs de la PCR

**1** ADN matrice : avant la réaction de PCR , l'ADN est extrait à partir de l'échantillon que l'on veut analyser (salive, cheveux, cellules, fossile...) puis, cet extrait purifié en ADN ,contenant le fragment d'ADN que l'on souhaite amplifier ,peut être utilisé en PCR.

**2** ADN polymérase : Tout les ADN polymérase qui sont utilisées en PCR sont thermostable ,c'est-à-dire qu'elles ne sont pas dénaturées à des hautes températures requises (jusqu'à 100°C). la Taq polymérase est l'enzyme la plus utilisée(**Winter et al ,1999**).

Le rôle de l'ADN polymérase en PCR est de copier les nucléotides d'ADN. L'enzyme se fixe à l'ADN simple brin et synthétise un nouveau brin complémentaire du brin d'origine .les ADN polymérase ont besoin d'une courte région d'ADN double brin pour initier la synthèse (**Winter et al.,1999**).

**3** Les amorces :sens et inverses :ce sont des oligonucléotides d'une taille comprise entre 17et 30 Pb. Idéalement ,ils doivent être parfaitement complémentaires de la cible à analyser et posséder une composition global de 50%(G+C) .par ailleurs,ces amorces ne doivent pas s'hybride sur elles-mêmes (auto-hybridation) ou entre elles ,ni former de boucles sur elles-mêmes (structure en épingle ) .Si c'est le cas ,elles formeront des bondes parasites appelées dimères d'amorces. La présence de ceux -ci diminuera la sensibilité de la PCR.

4 Les nucléotides dNTPs :les quatres désoxyNucléotides-Triphosphates :dGTP,dATP , dCTP et dTTP, seront assemblés par la Taq-polymérase et formeront le brin d'ADN complémentaire .

5 Le Magnésium ( $Mg^{++}$ ) : ce cation est un cofacteur indispensable au bon fonctionnement de la polymérase et à l'incorporation des précurseurs . Il doit être apporté en concentration précise sous forme de  $MgCl_2$ .

Tous ces composants seront mélangés dans le même tube réactionnel .

6 Le milieu réactionnel : le milieu réactionnel de la PCR comporte l'ADN à amplifier, les dNTPs,les deux amorces, laTaq polymérase, un tampon et des ions magnésium ( $MgCl_2$ ) . Ces deux derniers composants définissent un milieu avec un PH optimal et une concentration saline optimale pour le bon fonctionnement de l'enzyme .

#### IV. La réaction de polymérisation

La PCR est une technique automatisée. En effet , la réaction de PCR se fait dans un thermocycleur .

L'appareil contient un bloc chauffant ou l'on insère les tubes contenant notre mélange pour la réaction de PCR et ou la température peut varies très rapidement et très précisément de  $0^{\circ}C$  à  $100^{\circ}C$  .

Le thermocycleur est alors programmé pour effectuer les différents cycles de la PCR. Ainsi ,chaque cycle est composé d'une succession de paliers de température prédéterminée ,et d'une durée bien définie .Ces deux paramètres ,température et temps , dépendent de la taille de la séquence à amplifier de la taille et de la composition en désoxyribonucléotides des amorce .

#### Comment fonctionne la PCR ?

D'après **Winter et al .(1999)** ,ont conclut que la PCR permet l'amplification de la séquence d'ADN par la répétition des cycles de synthèse d'ADN . Chaque molécule d'ADN synthétisée joue le rôle d'un ADN matrice pour la synthèse de nouvelles molécules cibles au cycle suivant . Au cour des premiers cycles , la quantité d'ADN augmente en force puis il atteint un plateau . Dans les cycles suivants ,et suite à l'augmentation de la quantité d'ADN ,des duplexes risques de se former entre les brins néosynthétisés et que les composants de la réaction commencent à diminuer , ce qui ralenti la vitesse de synthèse de l'ADN .

### V. Notion de température de fusion « Tm »

Quand un ADN double brin est chauffé au-delà d'une certaine température, les deux brins d'ADN se séparent par rupture des liaisons hydrogènes. L'ADN devient simple brin. La valeur de la température correspondant à ce phénomène s'appelle la température de fusion ou Tm (« melting temperature »). En pratique, la Tm correspond à la température où 50% de l'ADN est sous forme simple brin et 50% de l'ADN sous forme double brin, Cette Tm dépend de plusieurs facteurs :

- La composition en bases : les appariements A-T (deux liaisons hydrogènes) sont moins stables que les appariements G-C (trois liaisons hydrogènes) en milieu salin (NaCl).
- La composition en sels du milieu : une diminution de la concentration en sels du milieu diminue la force ionique et par conséquent diminue la Tm et inversement. Par convention, on parle de solution stringente quand la concentration en sels est faible (la Tm diminue alors).
- Le taux de mésappariements (ou *mismatches*) : on considère qu'il y a une diminution du Tm de 1°C pour 1 % de mismatch dans l'ADN.
- La longueur du fragment : cet effet est minime quand la taille des fragments hybridés est supérieure à 500 pb.
- La présence d'agent « déstabilisation » (par exemple la formamide) (**Begard et al., (1999)**)

### VI. Les étapes de PCR

#### VI.1. Etape de dénaturation thermique

Durant cette étape de 30 à 60 secondes généralement, le milieu réactionnel est porté à une température élevée, avoisinant 95°C, les liaisons hydrogènes reliant les deux brins d'ADN sont alors rompues par la chaleur. Cette température est supérieure à la température de dénaturation (Tm) de l'ADN qui passe alors sous forme simple brin. Chaque brin servira de matrice.

#### VI.2. Etape d'hybridation des amorces

Le mélange réactionnel est ensuite rapidement refroidi jusqu'à la température d'hybridation (Th) à laquelle les amorces, en excès dans le mélange, vont pouvoir se

fixer sur la totalité des séquences cibles . Au cours de cette étape crucial de la PCR ,la quantité d'une cible bien déterminée va imposer l'hybridation d'une quantité d'amorces proportionnelle à la quantité de la cible, et cela à chaque cycle à fin de permettre une amplification de type exponentiel . Il faut donc 100%d'hybridation si l'on souhaite s'affranchir des variations aléatoires possibles .

Généralement située entre 45 et 60 °C, la température d'hybridation correspond généralement à la température de fusion ( $T_m$ ) du duplexes moins 5 à 10 ° C et dépend essentiellement de trois principaux paramètres :

- Composition en base de l'amorce : la liaison hydrogène additionnelle de la paire de base G-C rend les duplexes GC-riches beaucoup plus stables que les duplexes AT-riches .
- Longueur et concentration de l'amorce : le taux de renaturation est en effet proportionnel à ces deux paramètres .De fortes concentration d'amorces favorisent ainsi la formation de duplexes .
- Composition du mélange réactionnel : influence de la composition ionique du milieu ( $Mg^{++}$ , $Na^+$ ,additifs...).

Les sites d'hybridation des amorces sont choisi de telle manière que l'ADN polymérase synthétise la région d'intérêt au cours de l'étape d'extension .A cette étape , la cinétique et alors d'ordre 2:dans un premier temps , les amorces cherchent lentement leurs séquence complémentaire dans un mouvement brownien pour qu'une fois retrouvées, elles puissent s'hybrider de manière plus rapide. Le phénomène qui survient alors est décrit sous le terme de **Zippping de l'ADN** et débute au niveau de sites bien précis de la séquence , appelés noyaux de nucléation (**Smith ,Britten et al.1975 ;Murugan 2002;Sikorav , Orlan et al .2009**) .

### VI.3. Elongation des amorces

Au cours de cette phase ,la température remonte rapidement jusqu'à 72°C, température de polymérisation optimale de la Taq polymérase . Cette ADN polymérase –ADN dépendante va alors synthétiser un brin complémentaire à partir des deux amorces hybridées en 'lisant' la séquence du brin matriciel dans le sens 3 'OH vers 5'P ( polymérisation par extension d'amorces ). Elle étend ainsi les amorces au niveau de leurs extrémités 3'OH en incorporant correctement les nucléotides présents dans le milieu selon les règles d'appariement établies en 1953 par WATSON &CRICK (**Watson and Crick 1953**) .Cette caractéristique rend alors

compte de fidélité enzymatique (Keohavong and Thilly 1989 ;Eckert and Kunkel 1990;Echert and kunkel 1991 ) de la Taq polymérase . On observe donc à cette étape la polymérisation d'un brin néo-synthétisée dont la séquence est complémentaire de celle du brin matriciel défini comme cible . Le temps alloué pour cette étape est dépend de la taille de l'amplicon et de la processivité de l'enzyme (Von Hippel, Fairfield et al .1994). il doit être en excès de manière à permettre un rendement de synthèse optimal .

Tout ces étapes sont réalisées les unes après les autres aussi rapidement que possible (Wittwer, Fillmore et al .1990) au cours de 30 à 40 cycles d'amplification durant lesquels la quantité d'amplicons va augmenter de manière exponentielle .

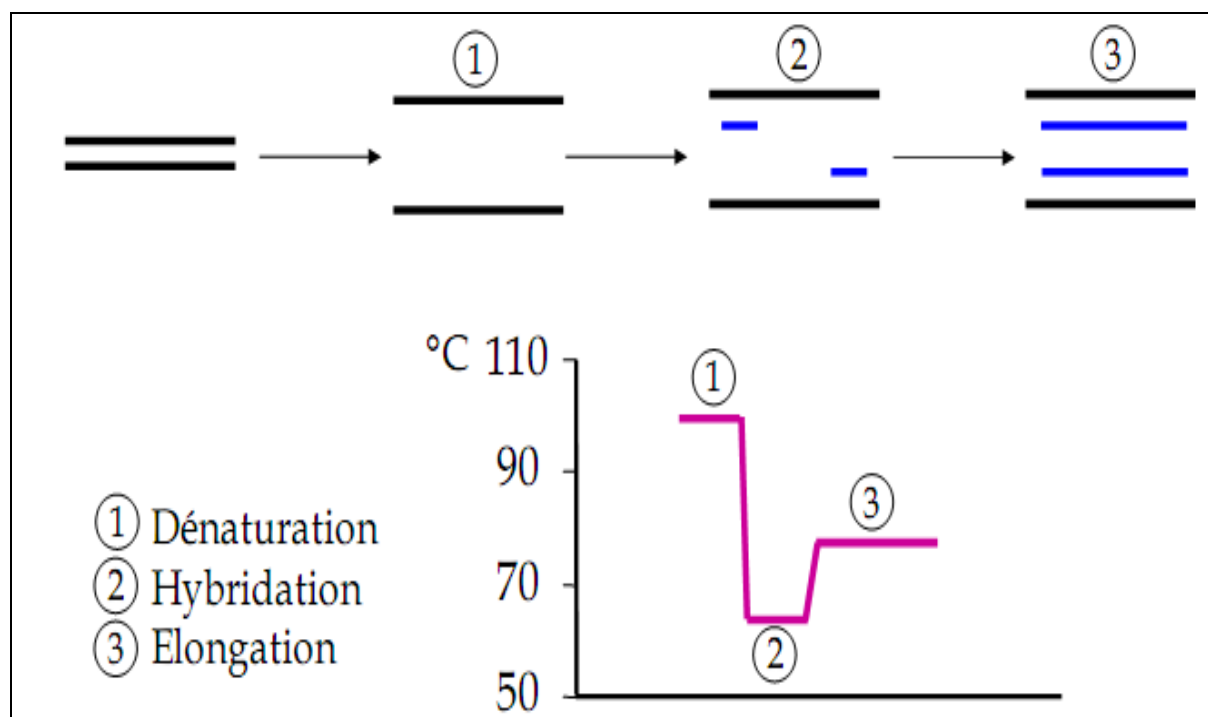


Figure 1 : les étapes de la PCR

### VII. Caractéristique de la PCR

On peut distinguer cinq caractéristiques majeures que sont la spécificité et la sensibilité analytique , la reproductibilité , la précision et la répétabilité .

#### VII.1. Spécificité analytique

Elle est conférée par le caractère ciblé de la détection d'une séquence connue existant dans le milieu réactionnel au milieu de séquences non spécifiques également présentes dans le mélange réactionnel. Elle est importante dans des conditions ordinaires de détection, c'est -à-dire lorsque la séquence cible est présente en quantité suffisante dans l'échantillon . Cette

spécificité vient cependant à disparaître lorsque l'on se rapproche des limites de quantification. La notion de spécificité ,notamment concernant l'évaluation des amorces ,sera fortement considérée dans les études réalisées au cours de cette thèse .

### VII.2. Sensibilité analytique

Elle est conférée par le caractère exponentiel de la réaction et fait référence au nombre minimum de copies de séquences cibles présentes dans un échantillon pouvant être mesuré avec précision par PCR en temps réel . Généralement ,la sensibilité est exprimée comme étant la limite de détection ( LOD, définie plus loin) ,c'est -à-dire la concentration pouvant être détectée à l'aide d'une réaction de PCR optimisée ( **Kramer and Coen 2001**) avec une certitude raisonnable (la plupart du temps ,avec 95%de probabilité ).Cette notion de sensibilité sera elle aussi considérée au cours de ces travaux.

### VII.3. Reproductibilité

Elle est conférée par le caractère cyclique de la réaction .En effet, une réinitialisation de ses différents paramètres est observée à chaque cycle avec théoriquement une efficacité initiale maximum et une synchronisation des réaction .Cette précision à long terme (ou variance inter-essai) fait référence à la variation des résultats observés entre les différentes exécutions de programmes thermiques de PCR entre différents laboratoires ayant réalisé la même analyse . Elle est généralement représentée par l'écart-type (SD) ou le coefficient de variation (CV) du nombre de copies ou de concentrations . Il a cependant été démontré que les valeurs caractéristiques de chaque amplification , notée Cq (pour cycle de quantification) , générées à partir de différents runs sont sujettes à une variation inter -run inhérente ( **Hellemans,Morties et al. 2007**). Il n'est donc pas approprié de calculer des ratios de variation de Cq inter-run .

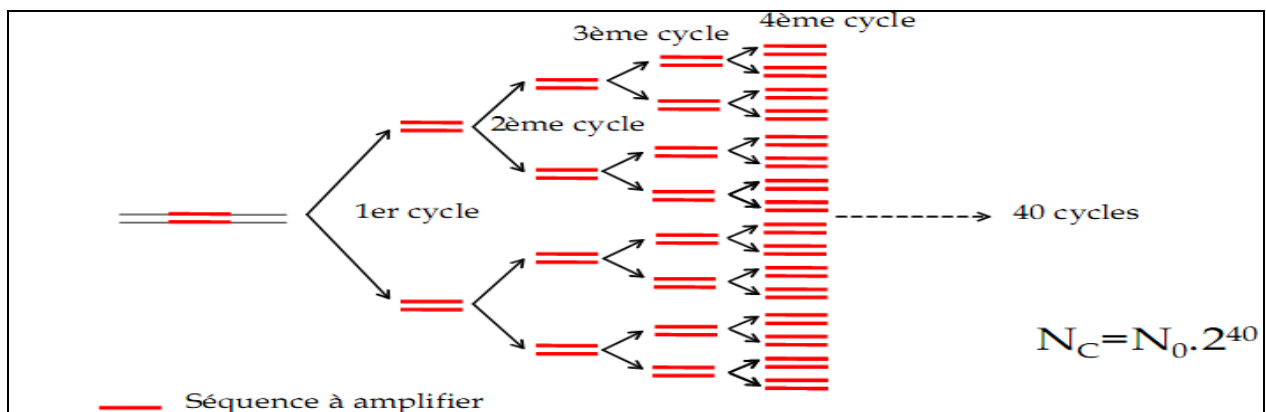


Figure 2 : La PCR, une amplification exponentielle.

### VII.4. Précision :

Elle fait référence à la différence entre les concentrations expérimentalement mesurées et les concentrations réelles, représentées par le calcul du facteur existant entre les valeurs les plus hautes et les valeurs les plus basses ou d'estimations du nombre de copies .

### VII.5. Répétabilité :

C'est une précision à court terme (ou variance intra-essai) qui fait référence à la précision et à la robustesse de l'analyse lorsque les mêmes échantillons sont analysés à plusieurs reprises. Elle peut être exprimée par l'écart-type (SD) de la variance des Cq . Le coefficient de variation (CV) du nombre de copies ou la variance de la concentration sont aussi des valeurs statistiques permettant d'apprécier cette notion . Le coefficient de variation ne doit toutefois pas être utilisé lorsque des Cq sont considérés (**Schmittgen and Livak 2008**).

## VIII. Les types de PCR

### VIII.1. PCR multiplexe

La PCR multiplexe (*multiplex PCR*) est un protocole conçu pour augmenter plus d'un amplicon à la fois , par l'utilisation d'au moins trois amorces par réaction de PCR . Les produits de PCR ne seront alors compétitifs que pour la polymérase , les dNTP et, peut-être , le marqueur d'ADN . Il est aussi envisageable d'augmenter différents types d'ADN reconnus par un même couple d'amorces(**David et Urlotte, 2002**).

Dans la PCR multiplex, il peut être difficile de trouver un contrôle endogène adéquat :

- Plus abondant que toutes les cibles à quantifier ;
- Qui ne modifie pas les niveaux d'expression selon les conditions d'expérience ou avec différents échantillons.

### VIII.2. PCR simplexe

Ces technologies sont souvent sélectionnées lorsque le nombre de marqueurs est faible et le nombre d'échantillons important .Elles ne nécessitent pas d'équipement particulier en dehors d'un thermocycleur et d'un lecteur de fluorescence en temps réel ou en point final indépendant ou passe .Les PCR simplexe ( utilisant un seul couple d'amorces) et leurs tests diagnostiques moléculaires distinctes à une seule cible ,témoins internes le plus souvent intégrés ,la sensibilité est plus que la PCR multiplexe (**Tagu et al .,2018**).

### VIII.3. PCR point final

Amplification d'une séquence d'ADN (1 à 2 kb) délimitée par des amorces spécifiques. L'ADN polymérase utilisée est thermorésistante, ce qui permet l'automatisation des cycles d'amplification. Elle ne possède pas de fonction d'édition (activité exonucléasique 3' → 5' permettant la correction des erreurs de copie (proofreading)), et commet une erreur toutes les 10<sup>10</sup>.

Dans le cas d'une PCR point final, après amplification, on effectue une migration par électrophorèse sur un gel d'agarose contenant du bromure d'éthidium. Ce dernier deviendra fluorescent en présence de nucléotides sous lumière UV et permettra de visualiser les différents fragments ayant migré. On obtient une lecture qualitative : il y a ou non présence du fragment de la longueur attendue. Une lecture semi-quantitative peut être effectuée par comparaison des intensités des signaux visualisés. En PCR point final on observe les résultats seulement à la fin de la totalité des cycles (**Rampaud., 2009**).

### VIII.4. PCR en temps réel

La technologie de PCR en temps réel devient de plus en plus populaire dans différents secteurs d'activité. Cette technologie est basée sur la détection et la quantification d'un reporter fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction de PCR. Étant donné qu'elle utilise généralement des systèmes en tubes fermés et que la quantification ne requiert aucune manipulation post-amplification, les problèmes de contamination post-PCR par les amplicons sont significativement réduits. Le processus complet est automatisé du début à la fin rendant cette technologie très performante pour des applications d'analyses à grande échelle. Cet article présente une description des principes à la base de la PCR en temps réel, des différentes technologies de détection des amplicons et des exemples d'applications courantes.

Le principe de la PCR en temps réel repose sur la possibilité de suivre la quantité d'ADN présente dans la réaction à tout instant et non à la fin de la PCR (PCR en point final).

### VIII.5. PCR nichée

Cette technique dite nested-PCR ou PCR nichée se pratique comme la PCR avec le couple d'amorces externes pour dix cycles d'amplification. À cette étape on ajoute un excès d'une ou de deux amorces internes avant de prolonger l'amplification pour encore 25 cycles environ. Cette procédure permet le plus souvent d'obtenir l'amplification spécifique d'un seul fragment.

Les amorces spécifiques sont essentielles dans les techniques de PCR car elles seules vont déterminer le fragment à amplifier. Lorsqu'il existe des séquences homologues, cette spécificité n'existe plus et la technique doit être modifiée pour mieux cibler le fragment à amplifier.

On utilise deux couples d'amorces. Des amorces externes dont la spécificité peut permettre d'amplifier à la fois un petit nombre de séquences homologues et des amorces internes permettant d'amplifier spécifiquement une des séquences révélées par le couple d'amorces externes.

### VIII.6. PCR-Elisa

Le produit amplifié est marqué au cours de la PCR grâce à une des deux amorces marquées (par exemple, par un résidu de digoxigénine). Après fixation en microplaque à l'aide d'une sonde capture, la révélation est effectuée à l'aide d'un anticorps spécifique (par exemple, antidigoxigénine) (Lamoril et al., 2007).

### VIII.7. RT-PCR

L'acronyme **RT-PCR** signifie *Reverse Transcriptase PCR*, soit une PCR après transcription inverse d'un acide ribonucléique (ARN) en ADN complémentaire (ADNc). En réalité, il s'agit d'une PCR « classique » réalisée sur un ADN complémentaire, qui est une copie d'un ARN obtenue par une transcription inverse (Tellaa, 2013).

La RT-PCR a été mise au point pour utiliser les ARN comme matrice d'amplification de la PCR. Elle est certainement la méthode la plus sensible pour détecter (et éventuellement quantifier) les ARN messagers au niveau d'un organe, d'un tissu ou d'une cellule. Dans ce but elle est souvent réalisée *in situ*, c'est-à-dire sur du matériel biologique fixé. Elle est également utilisée pour la construction de banque d'ADNc. le tri d'ARNm (Differential Display RT-PCR) ainsi que la construction de sondes d'ADN (tellaa, 2013).

L'une des difficultés de cette méthode concerne la préparation des ARN qui peuvent être très facilement dégradés et contaminés par de l'ADN génomique (Tellaa, 2013).

### Le test de RT-PCR

D'après un avis formulé par la Haute autorité de santé (HAS) le 6 mars 2020 ,les tests de détection du Sars-CoV-2 doivent être réalisés non pas sur des échantillons de sang mais sur des prélèvements nasopharyngés.

« concrètement ,un écouvillon est introduit dans la narine jusqu'au rhinopharynx afin de recueillir des sécrétions éventuellement infectées par le nouveau coronavirus »,expliquait le 18mars à **Sciences et Avenir** ,le docteur Philippe Pier, Président de la section Biologie médicale de l'Ordre national des pharmaciens. Des crachats ou d'autres sécrétions des voies respiratoires telles que le liquide bronchoalvéolaire peuvent également être prélevés par un médecin. Un biologiste médical ou un infirmier protégé par un équipement approprié ,expliquait –il .Après le prélèvement,le virus peut alors être recherché au moyen de la technique de transcription inverse et d'amplification aussi appelée RT-PCR.

Plus précisément ,la RT-PCR permet de détecter le génome du SARS-CoV-2 ,constitué d'un acide nucléique proche de l'ADN appelé ARN ,dans les prélèvements. « Des fragments d'acide nucléique complémentaires à certaines séquences bien connues de l'ARN du virus doivent d'abord être ajoutées au prélèvement ainsi qu'une enzyme appelée Reverse Transcription » ,décrivait le 18 mars 2020 un virologue interrogé par Science et Avenir .Le prélèvement traité est alors introduit dans une machine appelée thermocycleur . Si le prélèvement est infectieux , alors les fragments d'acide nucléique réussissent à s'attacher au matériel génétique du Sars-Cov-2 et la Reverse Transcriptase est capable de synthétiser un brin d'ADN .Ce brin d'ADN est alors amplifié par une deuxième enzyme ajoutée au prélèvement appelée ADN polymérase .Finalement, si le virus est présent dans le prélèvement, une certaine quantité d'ADN synthétique peut être produite et mesurée en un temps compris entre 1h30 et 6h .Si au contraire le prélèvement n'est pas infectieux ,aucun ARN viral ne peut être rétro-transcrit et mesuré.

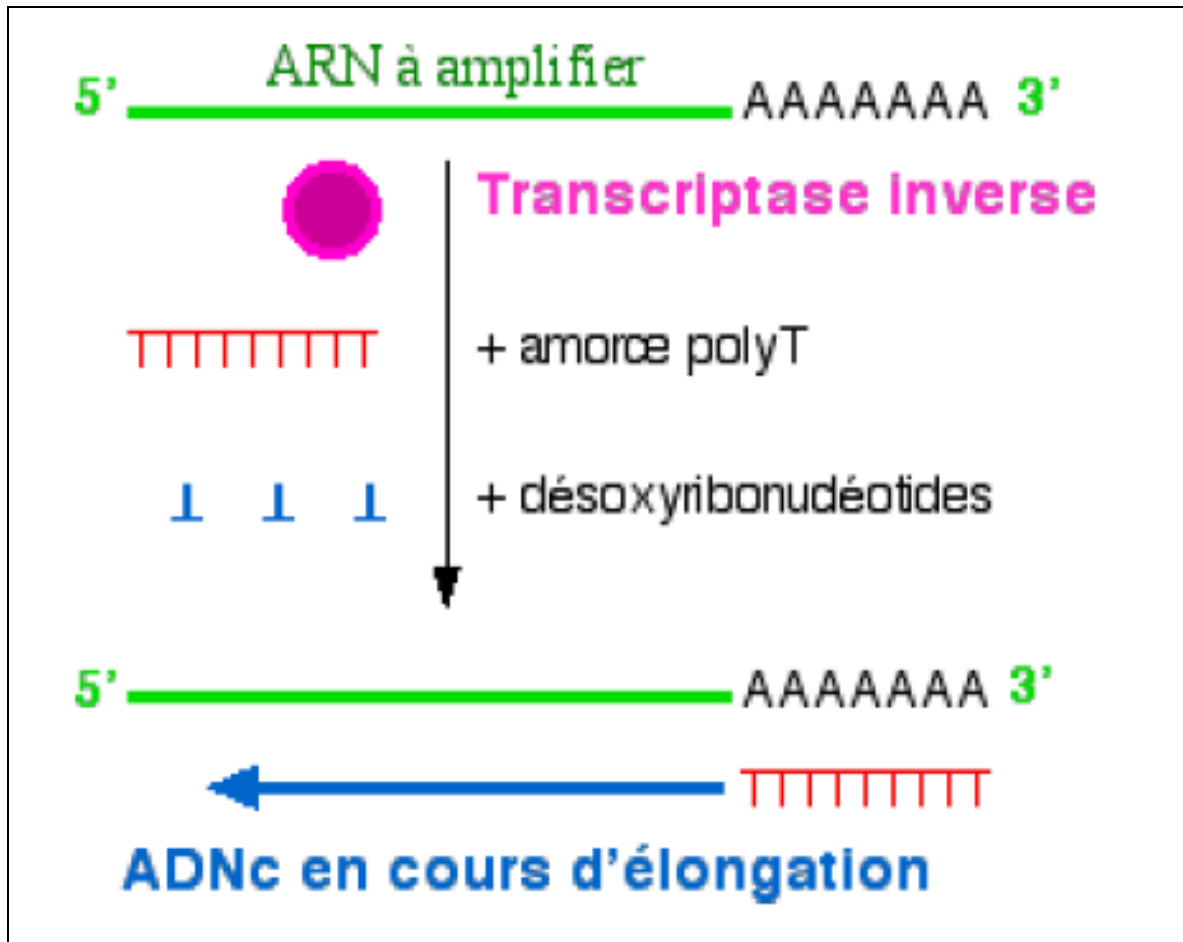


Figure 3 : RT PCR

### IX. Application de PCR

La PCR est très couramment utilisée dans de nombreux domaines :

- En médecine : pour diagnostiquer des maladies génétiques (myopathie , mucoviscidose, etc.) ,des infections virales comme le maladie d' aujourd'hui Corona virus (COVID19 ), (SIDA, Hépatite C SRAS) ,bactériennes (tuberculose ) ou parasitaires (toxoplasmose),mais aussi des cancers .
- En recherche fondamentale : multiples applications routinières .
- En médecine légale : pour identifier une personne par son empreinte génétique dans le cadre d'une enquête judiciaire ,et pour un test de paternité.
- En agroalimentaire :

- Pour identifier des variétés ou des espèces végétales et animales , pour sélectionner de nouvelles variétés de fruits et légumes, comme la tomate .
- Pour le contrôle de la qualité des produits agroalimentaires ,détecter la présence d'OGM dans un aliment par exemple.
- En historique : pour des études phylogénétiques sur des squelettes fossiles (ADN fossile), rechercher les liens de parenté entre les individus (cas les plus célèbres :les enfants de Louis XVII, ou ceux du tsar Nicolas II).
  - Pour l'étude des migrations des populations humaines et animales (en Island, les indiens d'Amérique ).
  - Pour la détection d'infection virales ,bactériennes et parasitaires sur des momies égyptiennes et andines .

### **X. Les avantages de PCR**

- Sensibilité : la PCR est une technique très sensible car capable de générer une très grande quantité d'acide nucléique à partir de quelques copies de la séquence recherchée.
- Rapidité : Aussi elle permet un important gain de temps par rapport aux autre techniques comme la culture (élimination des temps de cultures et d'incubation).
- Spécificité.

*Matériel et  
méthodes*

## MATERIEL ET METHODES

### I. Souches étudiées

Ce travail a fait l'objet d'une étude menée sur 20 souches d'*Escherichia coli* isolées à partir des urines de patients externes (non hospitalisés), au laboratoire central de l'hôpital Sidi Belloua de Tizi Ouzou.

Cette collection inclue les souches pour lesquelles les données des patients étaient disponibles. Les critères d'inclusion ont été: âge >10 ans, culture des urines positive, symptômes d'infections urinaires non compliquées (un ou plusieurs des symptômes suivants: fréquence et urgence de la miction, dysurie, douleur sus-pubienne, brûlures mictionnelles). Cette collection comprend des souches provenant de patients du sexe féminin et masculin. Une étude antérieure, menée au laboratoire de Génétique de l'université Houari Boumediene d'Alger, a permis d'identifier ces souches et de caractériser sur le plan phénotypique leur résistance aux antibiotiques et leur caractéristiques de virulence.

### II. Objectif du travail

L'objectif de ce présent travail est de rechercher les gènes codant pour des caractéristiques de virulence chez 20 souches d'*E. coli* ayant causées des infections urinaires, et ce, par une approche PCR-électrophorèse.

### III. Culture des souches bactériennes

Un total de 30 souches d'*E. coli* virulentes ont fait l'objet de matériel biologique dans ce travail.

Un contrôle positif des réactions PCR a été aussi utilisé. Il s'agit d'une souche d'*E. coli* positive pour les gènes des adhésines: *fimH* (Fimbriae de type 1) et *sfaS* (fimbriae S). La présence de ces gènes chez cette souche a été confirmée par le séquençage dans une étude menée par Yahiaoui et *al.* (2015).

Un contrôle négatif a été aussi utilisé pour la validation des résultats des différentes réactions PCR. Il s'agit d'une souche d'*E. coli* de référence, phénotypiquement non virulente, et dont le génome est dépourvu des gènes des adhésines: *fimH* (Fimbriae de type 1) et *sfaS* (fimbriae S).

L'ensemble des souches ont été mises en culture dans un bouillant LB (Luria-Bertani) pendant 24h à 37°C, puis,ensemencées sur milieu gélosé du type MH (Muller Hinton) et incubées pendant 24h à 37°C. Les colonies obtenues après culture bactérienne (pure), ont fait l'objet d'une extraction de l'ADN génomique total.

#### **IV. Extraction de l'ADN**

Plusieurs techniques d'extraction d'ADN sont possibles. Certaines permettent une extraction rapide et directe de l'ADN à partir des cellules. D'autres indirectes, nécessitent de recourir à un protocole en plusieurs étapes. Le choix de ces méthodes dépend de la nature de l'ADN ciblé et de l'objectif de la manipulation (identification interspécifique ou intraspécifique d'une culture pure, résolution de mélange microbien) (**Vincent et al., 2006**).

L'ADN est obtenu par un chauffage de 10 minutes à 95°C d'une suspension bactérienne dans 100 µl d'eau distillée ultra-pure, préparée à partir d'une culture de 24 heures sur gélose Mueller-Hinton. Après lyse cellulaire et libération de l'ADN, la suspension est ensuite centrifugée pendant 3 minutes à 12000 rpm. Le surnageant obtenu, utilisé comme source d'ADN pour les réactions PCR, est conservé à -20°C (**Feria et al., 2002**).

#### **V. Recherche de gènes par PCR**

Différentes PCR peuvent être réalisées pour la détection spécifique d'espèces ou de gènes. Elles ont en commun l'appareillage : thermocycler (**Vincent et al., 2006**). La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une méthode permettant l'amplification d'une séquence spécifique d'ADN. La réaction PCR nécessite 2 amorces oligonucléotidiques entourant la séquence cible d'ADN, chacune étant complémentaire à un des deux brins d'ADN. Les amorces sont généralement ajoutées en excès par rapport à la quantité d'ADN à amplifier dans le mélange réactionnel. Ce dernier est également composé de l'ADN polymérase, de dNTPs (désoxyribonucléotides triphosphate), de sels (MgCl<sub>2</sub>, KCl), d'un tampon et de l'échantillon d'ADN. La PCR est effectuée à l'aide d'une suite de cycles, comportant trois étapes chacun, la dénaturation, l'hybridation et l'extension. La première étape consiste à dénaturer l'ADN double brin en ADN simple brin à l'aide de la chaleur, 94°C. Lors de la deuxième étape, le mélange réactionnel est refroidi à 45-60°C, chacune des amorces reconnaît et se lie à sa séquence d'ADN complémentaire. Les amorces sont positionnées de manière à ce que leur extrémité 3' soit face à face afin que la synthèse d'ADN ait lieu dans la région se trouvant entre les deux amorces. Lors de la dernière étape, l'ADN polymérase se lie à

l'extrémité 3' de chaque amorce liée et utilise le dNTPs afin de pouvoir synthétiser un nouveau brin d'ADN dans la direction 5' vers 3'. Lors de cette étape, l'ADN polymérase possède une température optimale pour la réplication d'ADN de 72°C (Reece et al., 2004). Après un cycle de la réplication PCR, une nouvelle copie de chaque brin d'ADN produit est synthétisée et le nombre de cycle peut varier entre 20 et 40.

### **V.1. Recherche de gènes par PCR simplex**

Les PCR simplex (utilisant un seul couple d'amorces) ont été réalisées en utilisant des amorces spécifiques ciblant les gènes codant pour des caractères de virulence chez *E. coli*.

Deux gènes codant pour la virulence chez *E. coli* ont été recherchés. Il s'agit des gènes des adhésines: *fimH* (Fimbriae de type 1) et *sfaS* (fimbriae S).

Les séquences des amorces utilisées pour amplifier ces deux gènes sont données dans le tableau I.

Les conditions des réactions PCR pour l'amplification de ces deux gènes sont données dans le tableau II

#### **V.1.1. Composants des réactions PCR**

Les réactions PCR simplex ont été réalisées dans un volume final de 12,5 µl qui comporte (Tableau III):

- Tampon de la GoTaq polymérase (1x),
- MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM),
- Quatre désoxyribonuléotides (200 µM),
- Amorces sens (0,5 µM),
- Amorces reverse (0,5 µM),
- GoTaq DNA polymérase fournie par Promega (0,312 unités),
- 2,5 µl d'ADN matrice.

Les concentrations indiquées pour chaque composant de la réaction PCR sont celles recommandées par la firme fournisseur.

### V.1.2. Calcul des volumes et concentrations des composants des réactions PCR

Pour chaque réaction PCR, les composants doivent être à des concentrations adéquates aux exigences de l'amplification du gène recherché. Pour cela, les volumes de chaque composant inclus dans les réactions d'amplification doivent être précis.

Nous avons alors procédé au calcul des concentrations finales, ainsi que les volumes de tous les composants des réactions PCR, et ce, selon les recommandations d'amplification des deux gènes des adhésines: *fimH* (Fimbriae de type 1) et *sfaS* (fimbriae S):

- **Taq polymérase :**

Pour réaliser des réactions PCR de 12.5 µl avec les ingrédients de Mix (mélange des composants de la réaction PCR, commercialisé à des concentrations définies et standards):

- On cherche la concentration de Taq dans une réaction de 12.5 µl, sachant que le Mix PCR contient la Taq à une concentration de 50 unité/ml (50unité/1000µl).
- Le Mix est concentré 2x on doit le rendre 1x concentré : donc le volume de Mix à prendre pour une réaction de 12.5 µl est de 6.25 µl.
- On cherche la concentration de Taq dans ces 6.25 µl de Mix : on a 50 unité de Taq dans 1000 µl de Mix, donc dans 6.25µl de Mix on aura 0.3125 unités de Taq.
- La concentration de Taq finale dans notre réaction de 12.5 µl est de 0.3125 unités.
- On va chercher le volume de Taq à prendre pour avoir la concentration de 0.3125 unités :  
On a : la Taq est commercialisée à une concentration de 5unités/µl. Donc 0.3125 unités correspondre à **0.0625µl** de Taq.

- **dNTP**

On cherche la concentration des DNTP dans le Mix :

- Sachant que le Mix contient les DNTP à une concentration de 400µM.
- Le Mix est concentré 2x on doit le rendre 1x concentré : donc le volume de Mix à prendre pour une réaction de 12.5 µl est de 6.25 µl. donc la concentration des DNTP dans 6.25 µl du Mix est de 200 µM.
- Donc on cherche la concentration des DNTP qu'il ya dans ces 6.25µl de Mix.
- La solution mère des DNTP est commercialisée à une concentration de 10mM=10000µM.
- La concentration finale de DNTP dans notre réaction est de 200µM. donc le volume de DNTP à prendre de la solution mère pour avoir cette concentration est de **0.25µl** pour une réaction PCR de 12.5 µl.

- **MgCl<sub>2</sub>**

On cherche la concentration des MgCl<sub>2</sub> dans le Mix :

- Le Mix est concentré 2x on doit le rendre 1x concentré : donc le volume de Mix à prendre pour une réaction de 12.5 µl est de 6.25 µl.
- La concentration finale de MgCl<sub>2</sub> dans une réaction PCR de 12.5 µl est de 1.5mM.
- La solution mère de Mgcl<sub>2</sub> est concentrée à 25mM.
- Donc le volume de MgCl<sub>2</sub> à prendre de la solution mère pour atteindre cette concentration finale est **0.75µl**.

- **Tampon de la GoTaq polymérase**

Le Tampon de l'enzyme est commercialisé 5x concentré. Dans nos réactions PCR de 12.5µl on l'utilise concentré 1x. ceci revient à prendre **2.5µl** du Tampon pour une réaction PCR de 12.5µl.

- **Amorces**

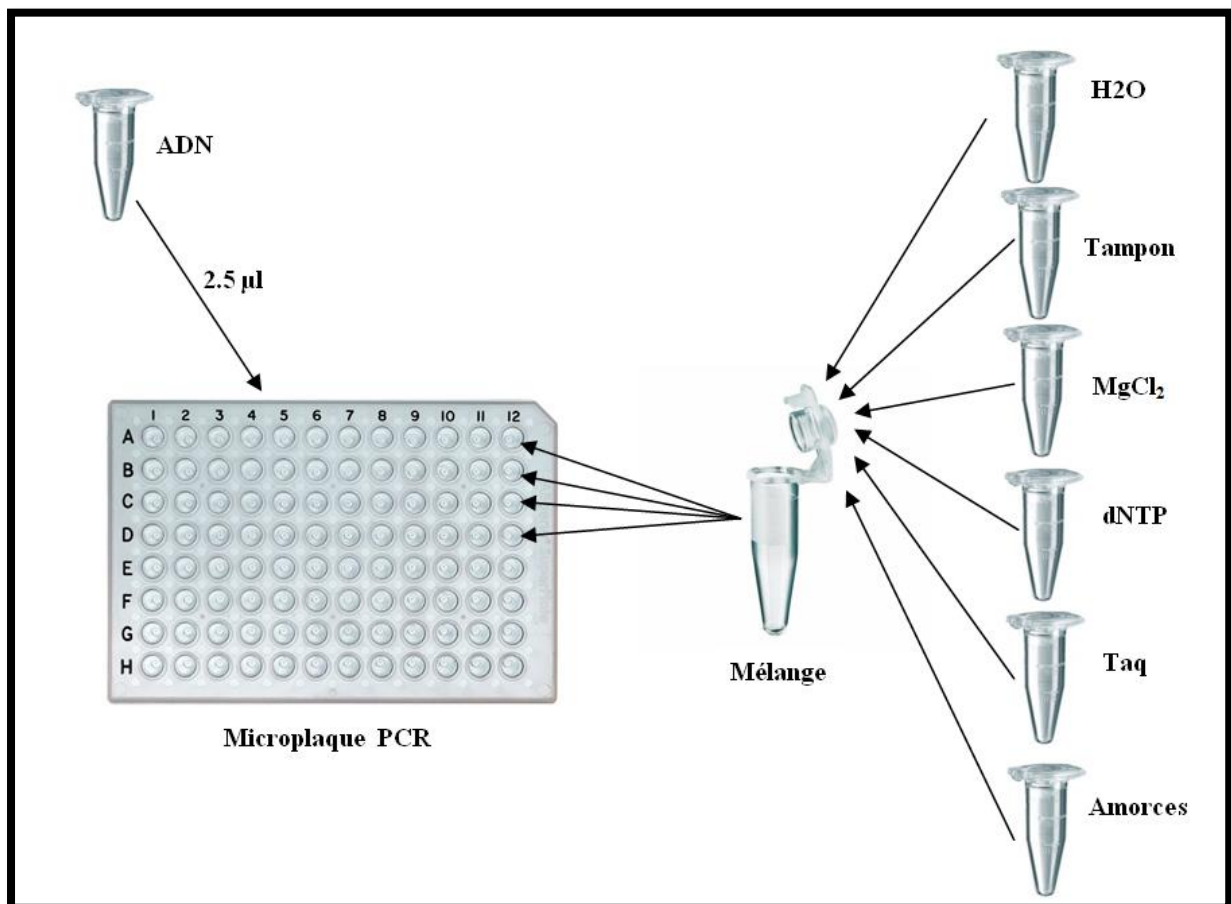
Elles sont commercialisées à une concentration de 25µM. Dans des réactions PCR standards dont la concentration en amorces n'est pas exigée, on les utilise concentré à 0.5µM. Dans des réactions PCR de 12.5µl on prend alors un volume d'amorce de **0.25µl**.

**Tableau III:** Composant d'une réaction PCR simplex de 12.5µl.

Concentrations mères	Volumes pour une réaction de 12.5µl	Concentrations finales
H <sub>2</sub> O	5.94µl (qsp)	/
5X GoTaqFlexi buffer	2.5µl	1X
MgCl <sub>2</sub> 25mM	0.75µl	1.5 mM
dNTPs 10mM	0.25 µl	200µM
Amorces sens (25µM)	0.25µl	0.5µM
Amorces reverse (25µM)	0.25µl	0.5 µM
GoTaq Flexi DNA polymerase 5u/µl	0.0625µl	0.3125 unité

Par faute de pipetage des petits volumes des différents réactif, nous avons procédé à la réalisation d'un mélange réactionnel dans un tube eppendorf, contenant, l'eau, le Tampon de la GoTaq polymérase (1x), le  $MgCl_2$  (1,5 mM), les quatre désoxyribonuléotides (200  $\mu M$ ), l'amorces sens (0,5  $\mu M$ ), l'amorces reverse (0,5  $\mu M$ ), et la GoTaq DNA polymérase fournie par Promega (0,312 unités) aux concentrations calculées à l'effet de l'amplifications des deux gènes des adhésines: *fimH* (Fimbriae de type 1) et *sfaS* (fimbriae S). Par la suite, nous avons réparti le contenu du mélange réactionnel dans des puits d'une microplaque dédiée à la PCR. Dans chaque puits nous avons déposé 10 $\mu l$  du mélange réactionnel, auxquels, nous avons rajouté 2.5 $\mu l$  d'ADN matrice. Le volume total dans chaque puits est alors 12.5 $\mu l$  (**Figure 4**).

La microplaque est ensuite placée dans un thermocycler pour enchaîner les étapes d'amplification des gènes.



**Figure 4:** Schéma des étapes de réalisation du mélange réactionnel pour PCR.

## V.2. Recherche de gènes par PCR multiplex

Les réactions PCR multiplex (utilisant deux ou plus couples d'amorces) ont été réalisées dans un volume final de 25 µl qui comporte (**Tableau IV**):

- Tampon de la GoTaq polymérase (1x),
- MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM),
- Quatre désoxyribonuléotides (200 µM),
- Amorces sens (0,5 µM),
- Amorces reverse (0,5 µM),
- GoTaq DNA polymérase fournie par Promega (0,625 unités),
- 5 µl d'ADN matrice.

Les PCR multiplex ont été réalisées en utilisant des amorces spécifiques ciblant les gènes *fimH*, *papA*, *kpsMTIII*.

Les conditions utilisées sont : 1 cycle de 94°C/4 min, 10 cycles de 94°C/1 min, 65°C/30 sec (diminution de 1°C/cycle), 70°C/2 min, 24 cycles de 94°C/1 min, 55°C/30 sec, 70°C/2 min, et 1 cycle final de 70°C/5 min (Tableau V).

Les séquences des amorces utilisées pour amplifier ces deux gènes sont données dans le tableau I.

**Tableau IV:** Composant d'une réaction PCR multiplex de 25 $\mu$ l.

Concentrations mères	Volume pour une réaction de 25 $\mu$ l	Concentration finales
H <sub>2</sub> O	12.6 $\mu$ l (qsp)	/
5X GoTaqFlexi buffer	5 $\mu$ l	1X
MgCl <sub>2</sub> 25mM	0.75 $\mu$ l	1.5 mM
dNTPs 10mM	0.5 $\mu$ l	200 $\mu$ M
Amorces sens 1 (25 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l	0.5 $\mu$ M
Amorces reverse 1 (25 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l	0.5 $\mu$ M
Amorces sens 2 (25 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l	0.5 $\mu$ M
Amorces reverse 2 (25 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l	0.5 $\mu$ M
Amorces sens 3 (25 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l	0.5 $\mu$ M
Amorces reverse 3 (25 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l	0.5 $\mu$ M
GoTaq Flexi DNA polymerase 5u/ $\mu$ l	0.125 $\mu$ l	0.625 unité

Pour le calcul des concentrations des différents composant de la PCR multiplex ; nous avons procédé de la même manière que la PCR simplex.

La réalisation du mélange réactionnel est aussi faite de la même manière que la PCR simplexe (Figure 4).

**Tableau I:** Amorces utilisées pour la recherche des gènes de virulence

Cible	Séquences des amorces (5'→ 3')	Taille de l'amplifié (pb)	Concentrations (µM)	Références
<b>PCR SIMPLEX</b>				
<i>fimH</i>	<i>fimH</i> -UP: ATGAGTATTCAACATTTCCG <i>fimH</i> -LOW: CAATGCTTAATCAGTGAGG	858	0,5	Yates <i>et al.</i> (2004)
<i>sfaS</i>	<i>sfaS</i> -MF: ACCGCGATATCGTTGGT <i>sfaS</i> -MR: CGCTTTGCGATGTGCAG	550	0,5	Messai <i>et al.</i> (2008)
<b>PCR MULTIPLEX</b>				
<i>fimH</i>	<i>fimH</i> -F: CCTTCGAATGCTGTAACCGC <i>fimH</i> -R: ACGCCCTTGAGCGGAAGTATC	248	0,5	Murinda <i>et al.</i> (2005)
<i>papA</i>	<i>papA</i> -F: TCAGACGTCGTGGATGTCG <i>papA</i> -R: CGAAGAACCGCACAATCTCG	346	0,5	
<i>kpsMTIII</i>	<i>kpsMTIII</i> -F: GAGGGCTTACTAAGCTTGC <i>kpsMTIII</i> -R: ATACCTACAAAGCCCCACGC	200	0,5	

**Tableau II:** Conditions des réactions PCR des gènes amplifiés

Cible	Dénaturation initiale	Dénaturation	Hybridation	Elongation	Nombre de cycles	Elongation finale
<b>PCR SIMPLEX</b>						
<i>fimH</i>	94°C/5 min	94°C/30 sec	52°C/40 sec	72°C/1 min	30	72°C/7 min
<i>sfaS</i>	94°C/5 min	94°C/30 sec	55°C/40 sec	72°C/1 min	30	72°C/7 min
<b>PCR MULTIPLEX</b>						
<i>sfaS, ksMTII</i>	1 cycle de 94°C/4 min, 10 cycles de 94°C/1 min, 65°C/30 sec (diminution de 1°C/cycle), 70°C/2 min, 24 cycles de 94°C/1 min, 55°C/30 sec, 70°C/2 min, et 1 cycle final de 70°C/5 min					

## VI. Électrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse sur gel d'agarose permet la séparation de fragments d'ADN de différentes tailles (200-15'000 pb) (Reece ,2004). Le gel d'agarose est un réseau complexe de polymère, composé d'agarose et d'un tampon aqueux. La taille des pores est déterminée par la composition de ce dernier et par la concentration et le type d'agarose utilisé. Plus les pores du gel sont grands, plus la taille des molécules que le gel peut séparer est grande. Les fragments d'ADN sont séparé par migration sur gel d'agarose à l'aide un champ électrique constant. L'ADN qui est chargé négativement migre à travers le gel en direction de l'électrode positive. D'une manière générale, les petits fragments ADN migrent plus vite que les grands.

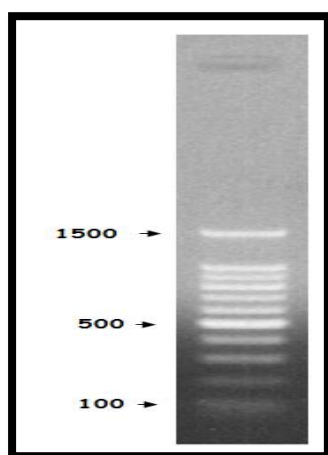
Les produits d'amplification ont été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose à différentes concentrations (1 à 2%) selon leur taille.

Les produits PCR des gènes *fimH* et *sfa* ont été migrés sur un gel d'agarose de 1%.

Les produits PCR des gènes *fimH*, *papA* et *kpsMTII* ont été migrés sur un gel d'agarose de 2%.

La migration électrophorétique a été effectuée sous une tension de 5 v/cm dans un tampon TBE 0,5x (45 mM Tris Base, 45 mM acide borique, 1mM EDTA), en présence de marqueurs de taille 100 bp DNA Ladder et 1 kb DNA Ladder (Promega) (**Figure 5**).

5 µl de produit PCR + 2 µl de tampon de charge (glycérol: 3 ml, bleu de bromophénol: 25 mg, eau distillée: qsp 10 ml) sont déposés dans chaque puits du gel d'agarose.



**Figure 5:** Marquer de taille utilisée pour déterminer la taille des différents fragments d'amplification.

Préparation du gel à 5% - Peser 5g d'agarose dans un Erlen de 500 ml. - Ajouter 100 ml de tampon TAE 1X (1 fois concentré). - Faire fondre ce mélange au four à micro-ondes, en arrêtant le four de temps en temps pour agiter. Le mélange doit être parfaitement transparent, sans particules d'agarose. - Ajuster le volume à 100 ml. - Ajouter 7 µl de la solution de bromure d'éthidium à 10 mg/ml. - Homogénéiser. - Couler dans l'appareil (CONSERT type : E8067) sans faire de bulles. - Placer le peigne. - Laisser refroidir.

## **VII. Visualisation des fragments d'ADN**

L'ajout de bromure d'éthidium au gel d'agarose permet d'apparaître les fragments d'ADN sur le gel. En effet, le bromure d'éthidium est capable de s'intercaler entre les paires de bases empilées de l'ADN et permet, lors de l'illumination sous lumière UV du gel d'agarose, l'apparition de l'ADN sur le gel comme une bande de fluorescence orange.

Dans ce travail, la visualisation des fragments d'ADN s'est faite sous irradiation UV (254 nm) en présence de bromure d'éthidium (BET) incorporé dans le gel à une concentration de 0,5 µg/ml (**Sambrook *et al.*, 1989**).

# Résultats et Discussion

## **RESULTATS ET DISCUSSION**

Cette étude a été réalisée sur 20 souches non redondantes d'*Escherichia coli* (une par patient) isolées à partir des urines de patients externes (non hospitalisés), au laboratoire central de l'hôpital Sidi Belloua de Tizi Ouzou.

L'objectif de ce présent travail était, de rechercher les gènes codant pour la virulence, chez 20 souches d'*E. coli*, et ce, par une approche PCR-électrophorèse.

- **Extraction de l'ADN**

Plusieurs techniques d'extraction d'ADN sont possibles. Certaines permettent une extraction rapide et directe de l'ADN à partir des cellules. D'autres indirectes nécessitent de recourir à un protocole en plusieurs étapes. Le choix de ces méthodes dépend de la nature de l'ADN ciblé et de l'objectif de la manipulation (identification interspécifique ou intraspécifique d'une culture pure, résolution de mélange microbien) (Vincent, 2006).

Dans notre travail, nous avons procédé à une extraction de l'ADN génomique total par le protocole décrit par Feria et al. (2002), qui consiste en l'obtention d'une suspension bactérienne à partir d'une culture de 24 heures sur gélose Mueller-Hinton, et ce, après la lyse cellulaire et libération de l'ADN par chauffage.

Cette technique d'extraction demeure la plus utilisée dans les laboratoires de génétique microbienne partout dans le monde. En effet, cette technique offre plusieurs avantages en pratique ; i) l'ADN est obtenu dans moins de 15 minutes, ii) le coût est vraiment minime, iii) simplicité de réalisation, iv) fait intervenir moins d'appareillage, v) aucun réactif n'est utilisé pour la libération ou purification de l'ADN, l'ADN obtenu peut être utilisé comme matrice pour toutes les réactions PCR, l'ADN peut être conservé pour une longue durée (Gupta BP et al., 1992).

- **Amplification de gènes par PCR simplex et multiplex**

Le principe de la PCR repose sur l'amplification *in vitro* d'un fragment d'ADN, en s'inspirant du mode normal de synthèse d'ADN *in vitro*. Une série de réactions permettant la réplication d'un ADN double brin sont effectuées à des températures différentes (dénaturation, hybridation, élongation), ces réactions correspondent à un cycle qui est répété autant de fois nécessaire. Dans la PCR simplex, un seul couple d'amorces est utilisé pour

amplifier l'ADN cible alors que dans la PCR multiplex, plusieurs couples d'amorces sont utilisés pour amplifier différents ADN cibles (Cassol S et al., 1994 ; Petersen et al., 1994).

Dans notre travail, la PCR simplex a été réalisée en ciblant les gènes codant les adhésines chez *E. coli* : le gène *fimH* et le gène *sfaS*. Alors que dans la PCR multiplex, nous avons ciblé 3 gènes codants la virulence: le gène *fimH*, le gène *papA* et le gène *kpsMTII* (Murinda et al., 2005).

### **Choix des amorces**

Dans ce travail, le choix des amorces utilisées pour amplifier les gènes *fimH* et *sfaS* s'est basé essentiellement sur le choix de l'enzyme Taq polymérase que nous avons utilisé. Dans notre travail, l'enzyme Taq polymérase utilisée nous a été fournie par Proméga, provenaient d'une bactérie thermophile (résistante à des températures très élevées), *Thermus aquaticus*. Elle permet d'amplifier des fragments d'ADN allant jusqu'à 1500 pb. Ce qui nous a permis de choisir des amorces spécifiques des deux gènes recherchés permettant d'amplifier des fragments de ces gènes ayant des tailles assez importantes.

### **Les concentrations finales des différents composants**

Les concentrations finales des différents composants des réactions PCR simplex ont été calculées en tenant compte des concentrations des solutions commercialisées par Proméga. Pour les différents réactifs employés dans les deux réactions PCR simplex que nous avons réalisés dans un volume final de 12.5 µl, les concentrations finales obtenues après calculs ont été : les amorces nucléotidiques (sens et anti-sens ou reverse) (0.5 µM chacune), la Taq polymérase thermostable (0.312 unités), chacun des quatre désoxyribonucléotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (200 µM), MgCl<sub>2</sub> (1.5 mM) et le tampon d'enzyme (1X).

Un volume de 2.5 µl de l'ADN matrice a été rajouté à chaque réaction PCR simplex réalisée. En effet, cette quantité d'ADN est suffisante pour amplifier la cible sans épuiser l'enzyme. En pratique, l'utilisation de grande quantité d'ADN dans des réactions PCR contribue à des mauvais rendements des ces réaction PCR, causés par l'épuisement de la Taq polymérase avant d'achever tout les cycles de la réaction PCR. Autrement, l'utilisation de faible quantité d'ADN matrice pour l'amplification d'une cible aboutit à des résultats

interprétable, puisque l'enzyme ne trouve pas un nombre idéal de copies de la cible à amplifier, ce qui génère un rendement très faible de la réaction PCR en terme de quantité d'ADN.

### **Programme des PCR**

Les PCR simplexe réalisées comportent 30 cycles, avec une répétition de trois étapes successives: la dénaturation de l'ADN pendant 30 s à 94 °C, l'hybridation des amorces à la matrice (52 °C pour *fimH* et 55 °C pour *sfaS*) et la synthèse de l'ADN qui correspond à l'allongement de l'ADN à partir des 2 amorces durant 7 min à 72 °C, avec une étape de dénaturation initiale de 5 min à 94 °C et une étape d'élongation finale de 7 min à 72 °C.

En effet, Avant de commencer les cycles de PCR, une étape de chauffage (90°C à 95 °C) est réalisée. Cette étape permet de : déshybrider les ADN double brin, de casser les structures secondaires, d'homogénéiser le milieu réactionnel par agitation thermique, d'activer les polymérase de type « Hot start », de dénaturer d'autres enzymes qui pourraient être dans la solution (Transcriptase Inverse...). La phase d'hybridation ou d'appariement des amorces.

L'étape d'hybridation permet aux amorces sens et anti-sens de se lier aux ADN matrice grâce à une température qui leur est thermodynamiquement favorable (généralement à 47-64 °C). Peu de brins d'ADN matrice peuvent s'hybrider avec leur brin complémentaire, ce qui empêcherait la fixation des amorces, car ces dernières sont bien plus courtes et en concentration bien plus importante. Expérimentalement, il est constaté que la PCR fonctionne même avec une phase d'hybridation avec une température supérieure de quelques degrés au T<sub>m</sub> théorique des amorces, probablement parce qu'elles interagissent déjà avec les polymérase, qui stabiliseraient leur hybridation à l'ADN matrice.

L'étape d'élongation permet aux polymérase de synthétiser le brin complémentaire de leur ADN matrice à une température qui leur est optimale (de 68 °C à 72 °C). Ce brin est fabriqué à partir des dNTPs libres présents dans le milieu réactionnel. La durée de cette étape dépend normalement de la longueur de l'amplicon (Allain et al., 1986; Cassol et al., 1991).

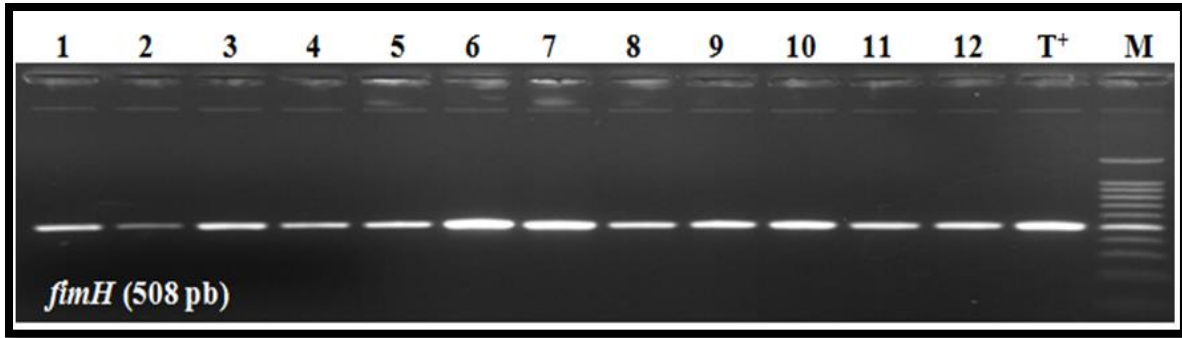
### **Interprétation des résultats d'amplification par PCR**

Nos résultats de la recherche des gènes *fimH* et *sfaS* par PCR simplexe et ceux recherchés par PCR multiplex, ont montré leur présence parmi nos souches. Ceci est confirmé par l'apparition d'une seule bande fluorescente dans le gel d'agarose, indiquant la présence de l'ADN à la taille attendue (**Figure 6 et 7**). L'ajout de bromure d'éthidium au gel d'agarose permet d'apparaître des fragments d'ADN sur le gel. En effet, le bromure d'éthidium est

capable de s'intercaler entre les paires de bases empilées de l'ADN et permet, lors de l'illumination sous lumière UV du gel d'agarose, l'apparition de l'ADN sur le gel comme une bande fluorescente (**Reece et al., 2004**).

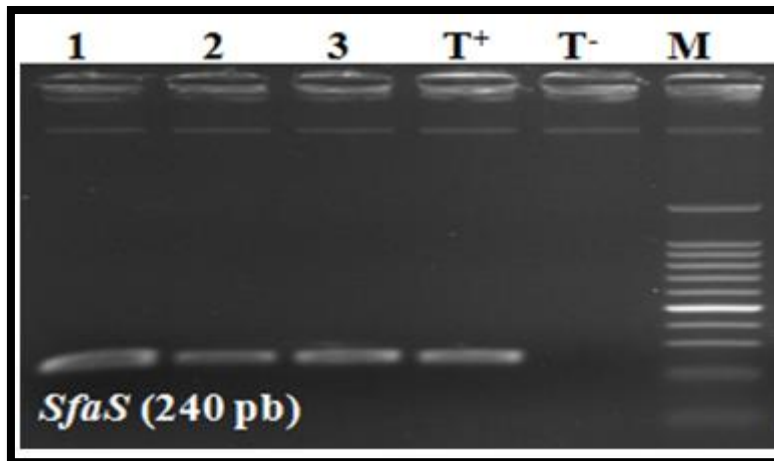
Nos résultats ont été validés par l'utilisations de deux souches de références ; une souche virulente et positives pour ces gènes recherchés ; et une souche non virulente et dépourvue des gènes recherchés (**Figure 6**).

Pour palier au problème d'apparition de bandes aspécifiques, il est évident de revoir les conditions d'amplification. Il faut donc augmenter la température d'hybridation des amorces qui dépend directement de la température de fusion ( $T_m$ ). En pratique, la  $T_m$  correspond à la température où 50 % de l'ADN est sous forme simple brin et 50 % de l'ADN sous forme double brin. Cette  $T_m$  dépend de plusieurs facteurs: - la composition en bases. Les appariements AT (deux liaisons hydrogènes) sont moins stables que les appariements GC (trois liaisons hydrogène) en milieu salin (NaCl). - la composition en sels du milieu. Une diminution de la concentration en sels du milieu diminue la force ionique et par conséquent diminue le  $T_m$  et inversement. Par convention, on parle de solution stringente quand la concentration en sels est faible ( $T_m$  diminue alors). - la quantité de misappariements (ou mismatches). On considère qu'il y a une diminution du  $T_m$  de 1°C pour 1 % de mismatch dans l'ADN. - la longueur du fragment. Cet effet est minime quand la taille des fragments hybridés est supérieure à 500 pb. - la présence d'agents "déstabilisants" (par exemple le formamide et l'urée) (**Begar d M., Lamoril J. et al, 1998**).



**Figure 6: Détection du gène *fmH* par PCR simplex**

De 1 à 12 : souches *fmH*<sup>+</sup>, T<sup>+</sup> Témoin positif, M : marqueur de taille.



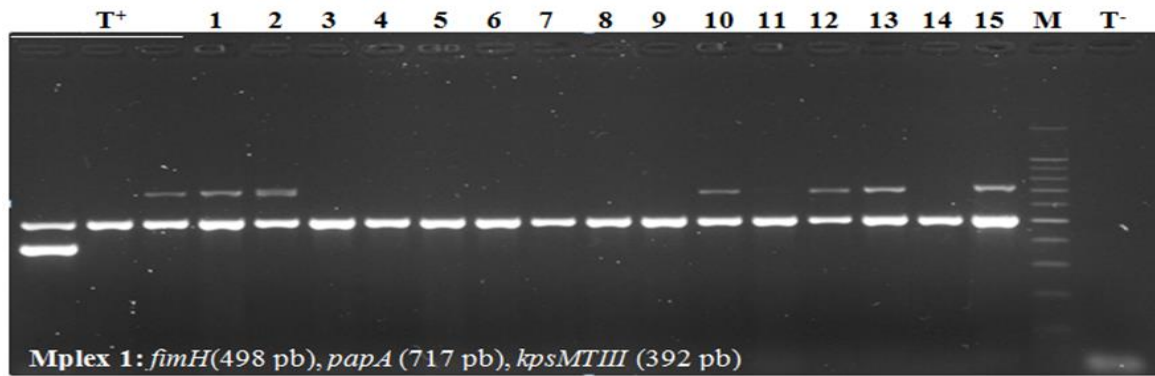
**Figure 7: Détection du gène *sfaS* ar PCR simplex**

De 1 à 3 : souches positives pour le gène *sfaS* (550pb)  
 , T<sup>+</sup>: Témoin positif, T<sup>-</sup>: témoin négatif, M: marqueur de taille.

La présence des trois gènes recherchés par PCR multiplex confirme la virulence des souches testées. En plus de leur fond génétique, les souches UPEC possèdent un arsenal de facteurs de virulence impliqués dans l'adhésion aux épithéliums humains, la traversée de la barrière urinaire vers la circulation sanguine, la capture du fer et la protection contre le système immunitaire.

Sur le gel d'agarose, nous avons constaté chez les souches négatives la présence de bandes à la taille attendue, mais d'intensité très faible. En effet, la présence de telles bandes indique la survenue d'une contamination par un ADN étranger, lors des étapes de la réalisation de la PCR. Ces bandes aspécifiques correspondent en réalité à l'amplification de l'ADN contaminant. Pour cela des précautions strictes doivent être prises pour éviter de faux positifs résultats de PCR en raison de l'amplification d'ADN contaminant (**Kwok, 1989**). Au début de nos expériences, nous avons été confrontés à ce problème ; nous avons éliminé l'ADN contaminant par irradiation de tous les équipements utilisés dans les étapes de pré-amplification avec la lumière UV en conformité avec les précautions recommandées par **Ou et al. (1991)**.

L'amplification PCR est allée bien à un nécessaire et à une partie intégrante de recherche clinique et diagnostique. Cette technique et ses plusieurs variantes avancées agissent en tant que les puissants outils qui activent une multitude d'applications spécialisées qui ont été par le passé considérées impossibles par le monde scientifique (**Uttayamakul et al., 2005**).



**Figure 8: Détection des gènes *fimH*, *papA* et *kpsMTIII* par PCR multiplex**

T+: Témoin positif, T-: témoin négatif, M : marqueur de taille.

La PCR a révolutionné la recherche scientifique, depuis qu'elle a été présentée la première fois au monde extérieur pendant les années 1980. Certaines de ses applications spécialisées dans la recherche génétique sont (**Huges D et al., 1996 ; Busch MP et al., 1997**):

- L'amplification rapide des fragments d'ADN minuscules.
- L'étude et le dosage des niveaux de l'expression des gènes.
- Etude de mutations génétiques et de leurs conséquences.
- Des variantes avancées de la PCR peuvent aider dans le dépistage précoce des anomalies génétiques congénitales chez les enfants.
- Elle améliore la méthode traditionnelle de clonage d'ADN en amplifiant les segments d'ADN minuscules pour leur introduction dans un vecteur.
- Elle permet des observations essentielles pour le dépistage de microorganismes (génotypage de bacilles de la tuberculose).
- En virologie, la PCR aide à caractériser les acides nucléiques des virus, et une compréhension du comportement de virus pendant l'infection. Par exemple, détecter l'infection à VIH à une phase précoce même avant que les anticorps ne soient formés. C'est également utile pour examiner des prises de sang rassemblées pour les dons.
- La PCR est un outil crucial dans les investigations légales en utilisant l'empreinte génétique, pour les identifications dans une scène de crime et également employée dans les testes de paternité.
- La PCR est également utilisée dans la surveillance des agents pathogènes microbiens dans les eaux, qui posent un risque sanitaire public important.

*Conclusion*

## CONCLUSION

Au dépit des conditions sanitaires qui régies dans le monde dû à la propagation de la pandémie de COVI-19, en particulier en Algérie, certaines manipulations n'ont pas été accomplies dans la partie pratique de ce travail. Pour ce, nous avons contenté de l'interprétation des résultats obtenus par Docteur YAHIAOUI que nous avons présenté sous forme de figures dans la partie résultats.

Au vu des manipulations que nous avons réalisées, il conviendra pour améliorer davantage les résultats des tests PCR basés sur la recherche de gènes par : i) rechercher des amorces plus adaptées à la détection de ces gènes pour éviter les amplifications aspécifiques ; ii) améliorer le programme d'amplification en augmentant par exemple le temps d'élongation, ce qui permettra l'amplification des segments les plus longs tels que ceux du gène *fimH*, ou bien augmenter la température d'hybridation pour empêcher les amorces de s'hybrider en dehors de la cible; iii) réduire davantage le coût de l'analyse par PCR et augmenter sa sensibilité, il serait donc important d'envisager la réduction du volume du mélange réactionnel.

Nos résultats de la recherche des gènes *fimH* et *sfaS* par PCR simplex et ceux recherchés par PCR multiplex *fimH*, *papA* et *kpsMTII*, ont montré leur présence parmi nos souches. Ce résultat a été confirmé par l'absence de ces gènes chez la souche de référence utilisée, qui est dépourvue de ces gènes et par leur présence chez la souche de référence, utilisée comme témoin positif de PCR.

La PCR pour l'amplification des gènes, a le potentiel pour le diagnostic rapide des infections à *E. coli*. Nos résultats corroborent les perspectives du diagnostic rapide des infections à *E. coli* par la méthode PCR. Bien qu'un certain nombre de méthodes classique ont été élaboré pour l'identification des *E. coli* pathogènes, l'utilisation de la PCR est la seule qui donne des résultats cohérents.

Malgré que La technique d'extraction a été simple pour caractériser génétiquement les produits d'amplification, en perspectives de ce travail, il serait intéressant de pouvoir approfondir notre travail en améliorant encore plus la technique d'extraction allant à la purification de l'ADN pour pouvoir séquencer ces gènes, on travaillant avec des produits moins dangereux comme le cyber green au lieu du BET pour rendre accessible aux personnels manipulateurs.

*Références*

*bibliographiques*

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- **Abderrahman M. et Raymond J., (2002).** Biologie moléculaire. Edi. Dunod.p.116.
- **Adama Sounkalo DIARRA, (2014).** Étude comparative de la PCR classique et de la PCR en temps réel dans le diagnostic des méningites dues à *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae* de type b.Thèse de doctorat, Faculté de Pharmacie, Université des Sciences, des Techniques e des Technologies de Bamako. P.27.
- **Allain J, Laurian Y, Paul DA, Senn D, and members of the AIDS-haemophilia . (1986).** French Study Group. Serological markers in early stages of human immunodeficiency virus infection in haemophiliacs. Lancet 2:1233–1236 [PubMed]
- **Alvarez-Munoz MT, Zaragoza-Rodriguez S, Rojas-Montes O, et al.** High correlation of human immunodeficiency virus type-1 viral load measured in dried-blood spot samples and in plasma under different storage conditions. Arch Med Res. 2005;36(4):382–86.doi:10.1016/j.arcmed.2005.03.010.[PubMed][CrossRef] [Google Scholar]
- **Aude B. (2007).** Les méthodes d'électrophorèse : l'essentiel. Faculté de Médecine Jacques Lisfranc, Université Jean Monnet.
- **Autran J. C.et Morel M .H ., (s.d.).**Electrophorèse. pp.220-243.
- **Bogard M.et Lamoril J., (1995).** Biologie Moléculaire en Biologie Clinique. Tome 1 : Méthodes, Collection Option/Bio., Elsevier Editeur Paris, 348p.
- **Busch MP, Satten GA.** Time course of viremia and antibody seroconversion following human immunodeficiency virus exposure. Am J Med. 1997;102:117–124. doi: 10.1016/S0002-9343(97)00077-6.[PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
- **Cassol S, Butcher A, Kinard S, et al.** Rapid screening for early detection of mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1. J Clin Microbiol. 1994;32:2641–2645. [PMC free article][PubMed] [Google Scholar]
- **Cassol S, Salas T, Arella M, Neumann P, Schechter MT, O'Shaughnessy M.** Use of dried blood spot specimens in the detection of human immunodeficiency virus type I by the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1991;29:667–671. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
- **Chahed A., (2007).**Prévalence des *Escherichia coli* producteurs de shigatoxines dans les viandes hachées. Thèse : Méd. Vêt : Liège : Université de Liège.

- **Chrambach. (1985).** The Practice of Quantitative Gel Electrophoresis. In: xestermeier, R., (2004). Electrophoresis in the practice A guide to Methodes and applications of DNA and protein separations 4 éd. Wiley-VCH, Germany.
- **Coutouly G., Klein E., Barbieri E. et Kriat M., (2012).** Travaux dirigés de biochimie, biologie moléculaire et bioinformatique, 4 éditions .Wolters kluwer France. Pp. 217-219.
- **Dandona L, Lakshmi V, Sudha T, Kumar GA, Dandona R.** A population-based study of human immunodeficiency virus in south India reveals major differences from sentinel surveillance based estimates. BMC Med. 2006;4:31. doi: 10.1186/1741-7015-4-31. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
- **David F. et Urlotte T., (2002).** « An Isothermal Amplification Methodes ». Comptes-rendu de l'Académie des Sciences.321 :909-914.
- **Driver GA, Patton JC, Moloji J, et al.** Low risk of contamination with automated and manual excision of dried blood spots for HIV DNA PCR testing in the routine laboratory. J Virol Methods. 2007; 146:397–400. doi: 10.1016/j.jviromet.2007.07.024. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
- **Griffiths.A.J.K ., wessler.S.R., carroll.S.B., doebly.J.(2013).** introduction à l'analyse génétique, 6<sup>e</sup> édition, paris.p173.
- **Grimont P., (1987).** Taxonomie des *Escherichia*. Méd. Mal Infect, 6-10.
- **Gupta BP, Jayasuryan N, Jameel S.** Direct detection of hepatitis B virus from dried blood spots by polymerase chain reaction amplification. J Clin Microbiol. 1992; 30:1913–1916. [PMC free article][PubMed] [Google Scholar]
- **Huges D, Hurd C, Williamson LM.** Genotyping for human platelet antigen-1 directly from dried blood spots on cards. Blood. 1996; 88:3242. [PubMed] [Google Scholar]
- **Huynh Vu Phi, (s.d.).** Appareil à électrophorèse .Rapport de stage, Université de Genève. P.16.
- Instruction manual, Amplicor HIV-1 DNA test, version 1.5. Roche diagnostics, Singapore
- **Jean- Luis SERRE, (2002).** Les Diagnostics Génétiques. Chapitre 1: Techniques et outils principaux de la biologie moléculaire appliquée aux diagnostics génétiques. Paris. P.16.

- **Kern-Bernaibout E.M., (2006).***Escherichia coli* potentiellement pathogènes pour l'homme : Synthèse bibliographique sur le portage par les animaux domestiques et la transmission à l'homme par la contamination de l'environnement. Thèse : Méd. Vêt : Toulouse : ENVT.
- **Lakshmi V, Sudha T, Bhanurekha M, Dandona L.** Evaluation of the murex HIV Ag/Ab combination assay when used with dried blood spots. Clin Microbiol Infect. 2007; 13:1134–1136. doi: 10.1111/j.1469-0691.2007.01809.x. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
- **Lamoril J., Bogard M., Ameziane N., Deybach J-C. et Bouizegarène P., (2007).** Biologie moléculaire et microbiologie clinique en 2007 : Molecular biology in clinical microbiology in 2007. Révue générale et analyse prospective : 6-17.
- **Le Minor, L., Popoff, M.Y. et Bockemuhl, J., (1990).** Supplement 1989 to the Kauffmann-White scheme. Res. Microbiol. 141: 1173-1177.
- **Luo W, Yang H, Rathbun K, Pau CP, Ou CY.** Detection of human immunodeficiency virus type 1 DNA in dried blood spots by a duplex real-time PCR assay. J Clin Microbiol. 2005; 43(4):1851–1857. doi: 10.1128/JCM.43.4.1851-1857.2005. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
- **Mallet F, Hebrard C, Brand D, et al.** Enzyme-linked oligosorbent assays for detection of polymerase chain reaction-amplified human immunodeficiency virus type 1. J Clin Microbiol. 1993;31:144–1449.[PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
- **Martin K., Yves B. et Christophe B., (2012).** Génétique et biotechnologie.Chapitre3 (principes généraux de biotechnologie).Edi. Ellipses, France. Pp. 62-64.
- **Montet M.P., (2009)** Contamination des aliments par les *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) en France, et importance de l'acido-résistance des souches. Thèse : Méd. : Paris: École Pratique des Hautes Étude.
- **Pei Yun Lee, John Costumbrado, Chih-Yuan Hsu, Yong Hoon Kim. (2012).** Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA Fagments.Department of Molecular, cell, and Developmental biology, University of California,los Angeles.
- **Petersen LR, Satten GA, Dodd R, Busch M, Kleinman S, Grindon A, Lenes B,** the HIV Seroconversion Study Group Duration of time from onset of human

- immunodeficiency virus type 1 infectiousness to development of detectable antibody. *Transfusion*. 1994; 34:283–289. doi: 10.1046/j.1537-2995.1994.34494233574.x. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
- **Rampaud A. E., (2009).** L'intoxication héréditaire au cuivre dans la race canine Bedlington Terrier : mise au point d'un test de diagnostic moléculaire : 41.
  - **Sauviago S, Barlet V, Guettari N, et al.** Standardized nested polymerase chain reaction-based assay for detection of human immunodeficiency virus type 1 DNA in whole blood lysates. *J Clin Microbiol*. 1993; 31:1066–1074. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
  - **Susan E. et William S.,(2003).** Génétique. Chapitre 12(Génétique moléculaire et biotechnologies).Edi. Science, France. Pp.401-415.
  - **Sylvaine C.(2009).**Spéciation directe de métalloprotéines séparées sur gels d'électrophorèse : analyses xas de la Superoxyde Dismutase et ICP-MS de proteines arseniees.Thèse de doctorant, l'université Bordeaux 1.p.35.
  - **Szalo I.M., Taminiou B. et Mainil J., (2006).** Le lipopolysaccharide d'*Escherichia coli* : structure, biosynthèse et rôles. *Ann. Méd. Vét.*, **150** : 108-124.
  - **Tagu D., Aubert-Possamai J. et Méreau A., (2018).** Principes des techniques de biologie moléculaire et génomique. 3<sup>e</sup> édition revue et augmentée, France. pp. 260-261.
  - **Tellaa R ., (2013).** Apport de la biologie moléculaire dans le diagnostic des infections fongiques invasives. thèse du doctorat en pharmacie, Université Mohammed V -SOUISSI-, Faculté de médecine et de pharmacie Rabat : 18-39.
  - **Uttayamakul S, Likanonsakul S, Sunthornkachit R, et al.** Usage of dried blood spots for molecular diagnosis and monitoring HIV-1 infection. *J Virol Methods*. 2005; 128(1–2):128–134. doi: 10.1016/j.jviromet.2005.04.010. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
  - **Whetsell AJ, Drew JB, Milman G, et al.** Comparison of three nonradioisotopic polymerase chain reaction-based methods for detection of human immunodeficiency virus type 1. *J Clin Microbiol*. 1993; 30:845–853. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
  - **Winter P.C., Hickey G.I et Fletcher H.L., (1999).** Génétique. Chapitre A : Génétique moléculaire, chapitre E : la technologie de l'ADN recombinant. Edi. Berti,Paris-France.pp.50-332.