

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

**FACULTE : SCIENCES
BIOLOGIQUES**

DEPARTEMENT : SNV

N° :



DOMAINE : SNV

FILIERE : BIOLOGIE

OPTION : BIOTECHNOLGIES VEGETALES

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

**Par: - BETTACHE Nour Elhouda
- BOUAFIA Fatima Zahra**

Intitulé

**Recherche de gènes de résistance aux
antibiotiques chez *Escherichia coli* par une
approche PCR-électrophorèse**

Soutenu le 24/06/2019 devant le jury composé de :

BENDIF Hamdi	MCA,	Université de M'Sila	Président
YAHIAOUI Merzouk	MCB,	Université de M'Sila	Promoteur
HARIR Mohamed	MCB,	Université de M'Sila	Examineur

Année universitaire : 2018 /2019

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 participés de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire.

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

Comme nous avons aussi l'obligation impérative d'adresser nos remerciements les plus forts aux membres du jury :

- Président: Dr Bendif Hamdi.*
- Examinateur: Dr Harir Mohamed.*

Qui ont eu l'amabilité d'accepter la constitution-composition du jury et la présidence de notre soutenance, membres respectables pour leur dévouement à bien vouloir lire, étudier et analyser notre modeste ouvrage. Nous écouterons attentivement et recevrons toutes leurs remarques éventuelles toujours enrichissantes.

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. Mes frères : Walide, Ibrahim, Youcef, Azzeldin, Alarbi et sa petite famille, ma sœur Fatiha et sa petite famille. Mes oncles, mes tantes et leurs familles.

Mes amies : Bouadjila Latifa, Taleb Zineb et Nasri Ibtissame

Sans oublier de dédier ce travail à ma très chère amie Bouafia fatima zahra 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.

Nour elhouda

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. Mes chers frères : Abd Errezak, Ibrahim; Zine eddine ;Mohamed .Mes chers sœurs : Bessma ;Gania ;Aya.Ma grand mère et Mon grand père.

Mes amies : Bouadjila Latifa, taleb zineb et Brabri Zineb.

Sans oublier de le dédier à ma très chère amie Bettache Nour el houda 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.

Fatima zahra

INTRODUCTION

E.coli sont naturellement sensibles aux antibiotiques actifs sur les bacilles à Gram négatif. C'est une bactérie intestinale (Gram négatif) des mammifères, très commune chez l'être humain. En effet, elle compose environ 80% de notre flore intestinale aérobie. Certaines souches d'*E.coli* peuvent être pathogènes, entraînant alors des gastroentérites, infections urinaires ou méningites.

Les souches d'*E.coli* acquises ces gènes au cours de l'évolution de leur génomes. En effet, les gènes de résistance aux antibiotiques correspondent à des séquences d'ADN bactérien, codant pour une protéine impliquée dans un processus menant à inactiver l'antibiotique ou bien protéger la bactérie contre l'action létale de ces antibiotiques. On parle alors de la résistance bactérienne aux antibiotiques.

En pratique; dans les laboratoires de recherche spécialisés dans l'étude des mécanismes de résistance des bactéries aux antibiotiques, 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 résistantes aux antibiotiques, et ce en suivant l'approche PCR-électrophorèse, en ciblant par des amorces spécifiques les gènes *TEM* et *CTX-M* par PCR simple et les trois gènes constituant les intégrons de classe 1 par PCR multiplex.

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'un travail de recherche, mené au laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire, Equipe de Génétique, Université des Sciences et de la Technologie HOUARI Boumedien d'Alger, portant sur la virulence et la résistance aux antibiotiques de souches cliniques d'*Escherichia* à l'origine d'infections urinaires communautaires.

I. *Escherichia coli*

Escherichia coli a été décrit pour la première fois en 1885 après avoir été isolée dans des selles de nourrissons par l'allemand Theodor Escherich. Son nom actuel lui est ensuite donné en 1919 par Castellani et Chambers (**Grimont, 1987**).

Le genre *Escherichia* appartient à la famille des *Enterobacteriaceae* (tableau I). Ce sont des bacilles à Gram négative, aéroanaérobies facultatifs qui peuvent fermenter les nitrates et qui ne produisent pas d'oxydase (**Le minor et al., 1990**).

I.1. Classification

Tableau I : Classification d'*Escherichia coli* selon le Bergey's manual 2012

Règne	<i>Bacteria</i>
Embranchement	<i>Proteobacteria</i>
Classe	<i>Gamma Proteobacteria</i>
Ordre	<i>Enterobacteriales</i>
Famille	<i>Enterobacteriaceae</i>
Genre	<i>Escherichia</i>
Espèce	<i>Escherichia coli</i>

I.2. Caractères cultureux

E.coli pousse sur milieu ordinaire à une température optimale de 37°C. Incubées 24 heures sur gélose agar à 37°C, les colonies sont convexes, lisses et incolores. Elles ont en général un diamètre compris entre 1 et 3 mm avec une structure granulaire et une marge intacte. La surface est brillante et la consistance gluante (**Le minor et al., 1990**).

I.3. Génome d'*E.coli*

E.coli possède un chromosome circulaire unique, longue de 4,6 Mb. Parmi ses 4 000 gènes dépourvus d'introns, environ 35% n'ont pas de fonction connue. Le cycle sexué est possible en raison de l'action d'un plasmide extragénomique appelé F, qui détermine un type de « masculinité ». D'autres plasmides portent des gènes dont les fonctions fournissent à la cellule ce qu'il lui faut pour vivre dans des environnements spécifiques, tels que des gènes de résistance à certaines substances chimiques. Ces plasmides ont été transformés en vecteurs de

gènes, à la base des transferts des gènes, au cœur du génie génétique moderne (**Griffiths et al., 2013**).

I.4. Plasmides

Les plasmides sont définis comme étant des structures d'ADN double brin, circulaire et autonome du chromosome bactérien par rapport à leur contrôle et leur réplication. Leur taille varie de quelques kilobases à quelques centaines de kilobases. Ils peuvent être transférés horizontalement par conjugaison ou mobilisation, entre bactéries de même espèce ou non. Ce sont les éléments du génome les plus mobiles (**Kern-Bernaibout, 2006**).

II. Réplication de l'ADN

La réplication de l'ADN est un mécanisme très important qui permet la duplication du patrimoine génétique pour obtenir deux exemplaires identiques, chacun transmis à une des deux cellules filles lors de la division cellulaire. La réplication a donc lieu avant la division cellulaire : se fait lorsque l'ADN est à l'état de chromatine, pendant la phase S de l'interphase. Chez les eucaryotes, l'ADN est répliqué par cinq ADN polymérase α , β , γ , δ , ϵ . Alors que chez les procaryotes, comme E.coli, deux enzymes sont essentielles, les ADN polymérases I et III (**Winter et al., 1999**).

II.1. Les étapes de réplication de l'ADN chez les procaryotes

II.1.1. Initiation

L'initiation de la réplication a lieu à l'origine de réplication. Il n'y a qu'une seule origine de réplication dans les chromosomes bactériens alors qu'il en existe plusieurs chez les eucaryotes. Lors de cette étape il y a implication de :

- Une hélicase : elle sépare les deux brins de la double hélice d'ADN dans les deux sens en rompant les liaisons hydrogène entre les bases. Deux fourches de réplication sont ainsi créées.
- Les protéines SSB : sont des protéines se liant à l'ADN simple brin (monocaténaire) formé et évitent la reformation de double hélice. Ce sont les protéines SSB chez les bactéries.
- Les topoisomérases (gyrases) : elles agissent derrière l'action de l'hélicase, qui induit des surenroulements positifs (en avançant) pour les supprimer et introduire des surenroulements négatifs de part et d'autre des deux fourches de réplifications.

-Les primases : ce sont des ARN polymérases ADN-dépendante capables de synthétiser de courtes séquences d'ARN (de 5 à 15 ribonucléotides) complémentaire à l'ADN matrice et nécessaires pour l'élongation des nouveaux brins d'ADN par l'ADN polymérase. La synthèse de l'amorce d'ARN se fait dans le sens $5' \rightarrow 3'$ (création d'un groupement OH libre). Chez *E.coli*, la primase et l'hélicase forment un seul complexe appelé la « primosome » (**Winter et al., 1999**).

II.1.2. Elongation

Ce processus fait intervenir une enzyme de polymérisation nucléotidique (formation de la liaison phosphodiester) qui est l'ADN polymérase incapable d'initier la synthèse sans une extrémité $3'OH$ libre.

L'ADN polymérase a besoin des composés suivants pour synthétiser une chaîne d'ADN :

-Les quatre désoxyribonucléotides (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) et du Mg^{2+} .

-Une amorce d'ARN

-L'ADN matrice (les deux brins parentaux).

Le brin avancé ou précoce : il s'allonge continuellement à partir d'une seule amorce d'ARN dans le sens $5' \rightarrow 3'$, qui coïncide avec le sens de déplacement de la fourche (copie du brin parental orienté le sens $3' \rightarrow 5'$) « Synthèse continue ».

Le brin retardé : puisque la polymérase agit comme un dimère d'enzyme, les deux brins matrices sont répliqués simultanément. La synthèse du brin retardé est plus compliquée puisque la polymérisation doit suivre le sens de déplacement de la fourche, et que l'ADN polymérase n'attache les désoxyribonucléotides que dans le sens $5' \rightarrow 3'$. Le brin parental, matrice du brin retardé, formerait une boucle autour de l'ADN polymérase III. Il se produirait ainsi une inversion de sens de brin retardé si bien que l'addition de nucléotides (en $3'$) dans le sens $5' \rightarrow 3'$ pourrait se faire simultanément sur les deux brins. Ceci a été résolu en synthétisant le brin retardé de façon discontinue sous forme de petits fragments greffés sur autant d'« amorces ». Les fragments ARN-ADN ainsi formés, sur le brin retardé sont appelés fragments d'Okasaki. « Synthèse discontinue »

Les amorces d'ARN sur les deux brins néosynthétisés sont ensuite éliminées, hydrolysées et remplacées par de l'ADN. C'est l'enzyme polymérase I qui élimine les amorces d'ARN par son activité exonucléase 5' → 3' et qui resynthétise à la place de l'ADN.

Finalement, les fragments d'ADN, libérés de leur amorce d'ARN vont être soudé par une ligase (**Winter et al., 1999**).

II.1.3. Terminaison

Les mécanismes impliqués dans la terminaison n'est pas été encore élucidé. Un site de terminaison TER où se fixe une protéine Tu5 qui met à la réplication a été déterminée chez *E.coli* (**Winter et al., 1999**).

III. Réaction de polymérisation en chaine (PCR)

La technique de réaction de polymérisation en chaine ou PCR est basée sur le même principe de réplication (**Maftah et julien, 2002**).

Cette méthode de Biologie Moléculaire a été mise au point en 1985 par Kary Mullis, qui obtient pour ces travaux le prix Nobel de Chimie en 1993, Aujourd'hui, ce procédé révolutionnaire couplé à l'utilisation d'une ADN polymérase thermorésistante permet d'obtenir, sans amplification considérable d'un fragment donné d'ADN (**Maftah et julien, 2002**).

La technique de PCR a été développée fabriquer n'importe quelle séquence d'ADN en un nombre très élevé de copies à l'aide d'une simple réaction enzymatique. L'ADN peut être amplifié de façon spécifique, ce qui l'analyse des gènes (**Etrod et Stausfield, 2003**).

III.1. Principe

Le principe de la méthode d'amplification génique *in vitro*, nommé également PCR, est relativement simple mais d'une utilisation considérable en génétique moléculaire, elle consiste à réaliser *in vitro* la réplication d'un cycle de synthèse d'un fragment d'ADN (polymérisation) à partir d'un ADN donnée (**Martin et al., 2012**).

Elle permet d'amplifier de manière sélective une séquence d'ADN choisie, même si cette dernière est présent dans un mélange complexe d'autres molécules d'ADN et sans avoir à la purifier au préalable (**Martin et al., 2012**).

III.2. Constituants d'une réaction PCR

L'ADN matrice : il contient la séquence d'ADN qu'on cherche à amplifier.

Des amorces oligonucléotidiques : ce sont de petites molécules d'ADN simple brin (20 bases) obtenus par synthèse chimique. Les séquences des primers sont choisies de façon à ce qu'ils se fixent par appariement des bases complémentaires à des brins d'ADN opposés de chaque côté de la séquence qu'on désire amplifier.

Une ADN polymérase : toutes les ADN polymérases qui sont utilisées en PCR sont thermostables, 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 molécules d'ADN. L'enzyme se fixe à l'ADN simple brin et synthétise un nouveau brin complémentaire du brin d'origine. Les ADN polymérases ont besoin d'une courte région d'ADN double brin pour initier la synthèse (**Winter et al., 1999**).

En PCR, ce sont les primers qui créent des petites régions d'ADN double brin, en se fixant de chaque côté de la séquence à amplifier. De cette façon, les primers obligent l'ADN polymérase à ne copier que la séquence cible (**Winter et al., 1999**).

Des désoxyribonucléotides triphosphate (dNTP) : ces molécules correspondent aux quatre bases de l'ADN (adénine, guanine, thymine, cytosine) et ce sont les substrats de l'ADN polymérase. Tout PCR nécessite la présence des quatre dNTP (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) qui sont utilisés par l'ADN polymérase comme des briques pour construire le nouveau brin d'ADN (**Winter et al., 1999**).

Cofacteur : un cofacteur est une substance dont la présence est nécessaire en plus d'une enzyme pour qu'une réaction se déroule. Le magnésium (Mg) est le cofacteur le plus couramment utilisé (**David et Urlotte, 2002**).

Tampon : le tampon utilisé pour la réaction PCR sert à maintenir stable le pH du milieu réactionnel au niveau optimal pour la Taq polymérase. Il contient souvent des cations bivalents Mg^{2+} servant de cofacteur (**David et Urlotte, 2002**).

III.3. Comment fonctionne la PCR

D'après **Winter et al. (1999)**, ont conclu 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 cours 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 risquent de se former entre les brins néosynthétisés et que les composants de la réaction commencent à diminuer, ce qui ralentit la vitesse de synthèse de l'ADN.

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 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 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 de 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'agents "déstabilisants" (par exemple la formamide) (**Begard et al., 1998**).

III.4. Étapes de PCR

III.4.1. Etape de dénaturation

Dans cette étape les deux brins d'ADN que l'on veut amplifier sont dénaturés par la chaleur à plus de 99°C, cette température permet la déstabilisation de la double hélice et la séparation des deux brins de la molécule d'ADN qui peuvent être copiés par l'ADN polymérase (figure 1) (**Winter et al., 1999**).

III.4.2. Etape d'hybridation

Dans cette étape, une paire d'amorces spécifiques et complémentaires des extrémités 3' des brins matrices est ajoutée. La température est abaissée vers 40 à 60°C, ce qui permet de refroidir le milieu réactionnel et permet la fixation des primers à l'ADN simple brin sans la reformation d'une double hélice entre les brins matrice. La température d'hybridation est déterminée par le nombre de base dans les amorces et la séquence (**Winter et al., 1999**).

Critères d'optimisation des amorces pour la PCR :

L'optimisation des amorces doit tenir compte des paramètres suivants :

- Taille des amorces : elle influe sur température d'hybridation et sur spécificité : en générale, 18 à 30 nucléotides.
- Spécificité : les amorces doivent correspondre à des séquences uniques dans l'ADN matrice.
- Possibilité de formation de duplex : nécessité d'absence de zones de complémentarité inter-amorces (< 3 base).
- Contenu en G+C : il doit être compris entre 40 et 60 %.
- La T_m des hybrides amorces-ADN : elles doivent être proches et comprises entre 52 et 65 °C.

La détermination de T_m des hybrides amorces-ADN est très importante car elle influe sur le choix de la température d'hybridatio (figures) (**Coutouly et al., 2012**).

III.4.3. Etape d'élongation

Dans cette étape, une ADN polymérase particulière, la Taq polymérase va synthétiser un nouveau brin d'ADN à une température de 72°C. L'ADN polymérase est guidée par les amorces, en utilisant l'ADN simple brin comme modèle pour copier la séquence cible d'ADN. L'amplification de gène par PCR couvre environ 20 à 40 cycles de chauffage (**Winter et al., 1999**).

Selon Susan Elrod et Willim Stansfield (2003), ont rapporté qu'après 20 cycles, une molécule d'ADN peut être amplifiée à environ 1million de copies (appelées les amplicons) et après 30 cycle, la molécule peut être amplifiée à environ 1milliard de copies. L'amplification est donc exponentielle. Le séquençage de nucléotide peut être fait facilement à partir ces grandes quantités d'ADN (**Winter et al., 1999**).

Cette réaction PCR permet à partir d'un échantillon présent en très faible quantité au départ d'amplifier de façon considérable cette région d'intérêt. Ainsi en débutant la PCR par une copie, après 40cycles,on obtiendra en théorie en fin de réaction 2^{40} copies de cette séquence (soit 10^{12} copies) (**Winter et al., 1999**).

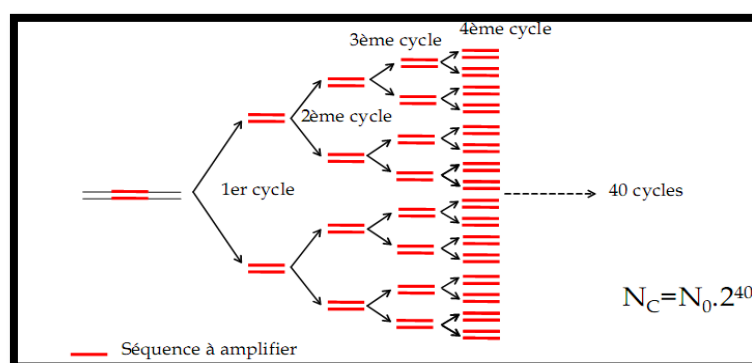


Figure 1 : La PCR, une amplification exponentielle (Corinne.S, 2012)

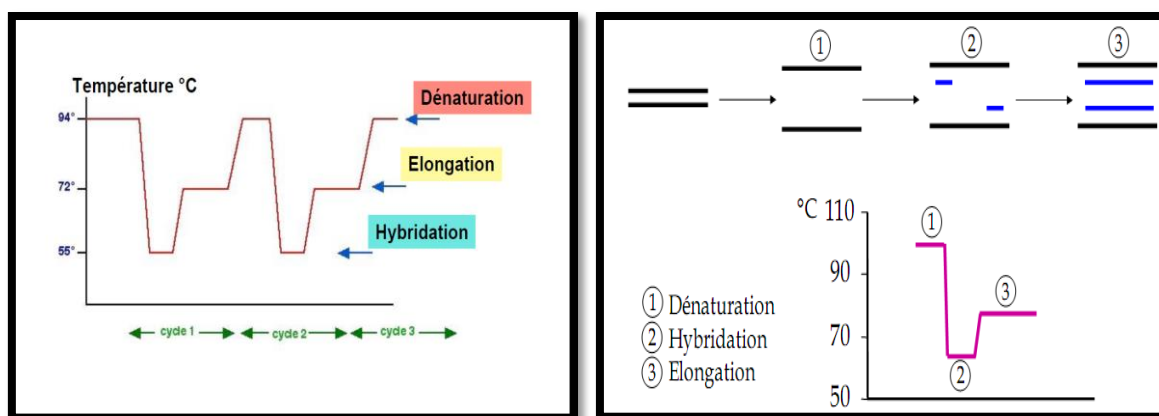


Figure 2: étapes de PCR (Corinne.S, 2012)

III.5. Types de PCR

III.5.1. 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. La PCR multiplexe peut se faire en point final (les produits de PCR étant habituellement différenciés par leur taille ou la présence d'un site de restriction) ou en temps réel (chaque produit étant mesuré par une sonde spécifique couplée à un fluorophore dont le spectre d'émission est différent des autres). Ses applications qualitatives sont nombreuses (détection de souche virale, de mutations, ...) mais son aspect quantitatif ne fait pas l'unanimité, malgré de fortes pressions industrielles pour ce marché particulièrement lucratif (David et Urlotte, 2002).

III.5.2. PCR simplexe

Ces technologies sont souvent sélectionnés 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 pas. Les PCR simplex (utilisant un seul couple d'amorces) et leur tests diagnostiques moléculaire distinctes à une seule cible, témoins internes le plus souvent intégrés, la sensibilité est plus que la PCR multiplexe (Tagu et al., 2018).

III.5.3. 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 une 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 10⁴ à 10⁵ bases (**Coutouly et al., 2012**).

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**).

III.5.4. PCR en temps réel

C'est une technique destinée à pouvoir quantifier la quantité d'un type d'ARN initialement présent dans un échantillon (**Tellaa, 2013**).

La réaction en chaîne par polymérase en temps réel est une technologie ayant de nombreuses applications, basée sur une réaction enzymologique, la PCR et sur la mesure en continue de son produit. A chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN total ou d'amplicon est mesurée grâce à un marqueur fluorescent (**Tellaa, 2013**).

L'obtention de la cinétique complète de la réaction de polymérisation permet d'obtenir une quantification absolue ou relative de la quantité initiale d'ADN cible, ce qui était très difficile à obtenir sans biais en PCR en point final (figure 3) (**Tellaa, 2013**).

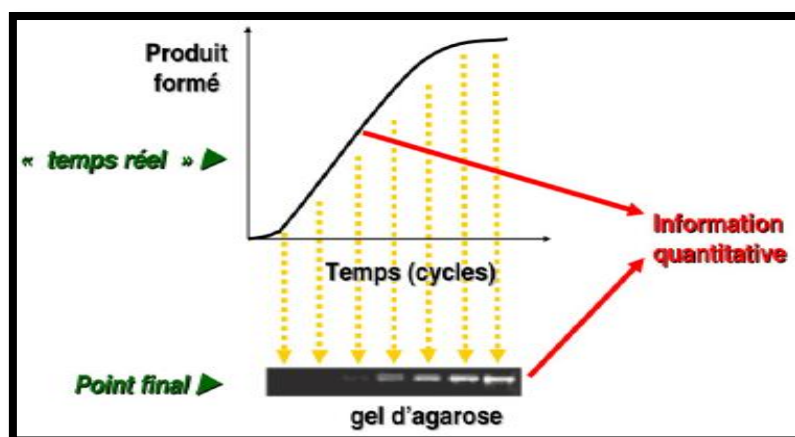


Figure 3: PCR en temps réel versus PCR en point final (Corinne.S, 2012)

III.5.5. 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 (ou ADNc), 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 banques d'ADNc, le tri d'ARNm (*Differential Display* RT-PCR) ainsi que la construction de sondes d'ADN (figure 4) (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).

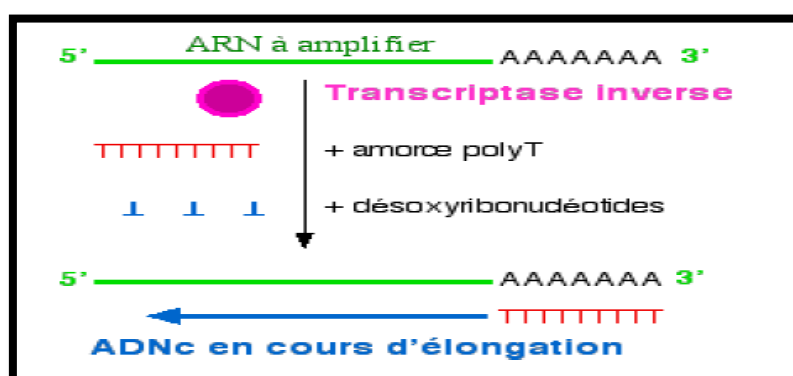


Figure 4: RT-PCR (Corinne.S, 2012)

III.5.6. 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).

III.5.7. PCR nichée (ou nested PCR)

Pour obtenir une plus grande sensibilité lors de la PCR, il est possible d'effectuer deux PCR successives. La « nested PCR » une meilleure spécificité: le produit issu de la première PCR est de nouveau amplifié au cours d'une deuxième PCR. Dans cette technique, deux couples d'amorces différents sont successivement utilisés:

- un couple d'amorces externes : Ce couple d'amorces permet tout d'abord d'obtenir un premier fragment d'ADN amplifié, selon une PCR classique. Les fragments d'ADN obtenus servent alors de matrice pour une seconde PCR (Tellaa, 2013).
- un couple d'amorces internes : Ce couple d'amorces borne une région située à l'intérieur (ou nichée) du fragment nucléotidique obtenu avec le 1er couple d'amorces, et donnera des fragments de taille inférieure à ceux obtenus avec la 1ère (Tellaa, 2013).

Dans la nested-PCR, on commence par amplifier le fragment entre deux amorces, comme dans la méthode classique, pendant 30 à 40 cycles. On transfère alors un échantillon de l'amplifié dans un tube pour une seconde PCR, avec des amorces internes aux premières. Après une nouvelle série de 30 à 40 cycles, l'élément amplifié est donc raccourci. Du fait d'un nombre de cycles d'amplification plus important, la sensibilité de cette méthode est augmentée. De plus, quatre amorces doivent reconnaître le fragment et non deux, ce qui diminue les risques d'hybridation parasite et donc augmente la spécificité (figure 5) (Tellaa, 2013).



Figure 5: Nested-PCR (Corinne.S, 2012)

III.6. Détection

La détection des produits de PCR varie selon le mode de PCR (**Adama Sounkalo DIARRA, 2014**).

Dans la PCR classique, la détection est faite en end-point (à la fin des réactions de PCR) soit en couplant un test ELISA, soit en réalisant une migration électrophorétique sur gel d'agarose (**Adama Sounkalo DIARRA, 2014**).

Dans la migration électrophorétique, un agent intercalant comme le bromure d'éthidium (BET) ou le Syber®Green est associé pour la visibilité des bandes. Un marqueur de poids moléculaire est utilisé comme échelle aidant dans l'identification de nos bas d'intérêt. Une bande contrôle de la taille de notre bande d'intérêt doit être utilisée. Dans certains cas, des témoins faibles sont utilisés (figure 6) (**Adama Sounkalo DIARRA, 2014**).

Dans la PCR en temps réel, la détection est fait en même temps que les PCR par utilisation des sondes fluorescentes. Ce sont des oligonucléotides couplés à leurs extrémités à des fluorophores. Les sondes les plus connus sont : les sondes Taqman, les sondes FRET, les sondes scorpions, les balises moléculaires (**Adama Sounkalo DIARRA, 2014**).

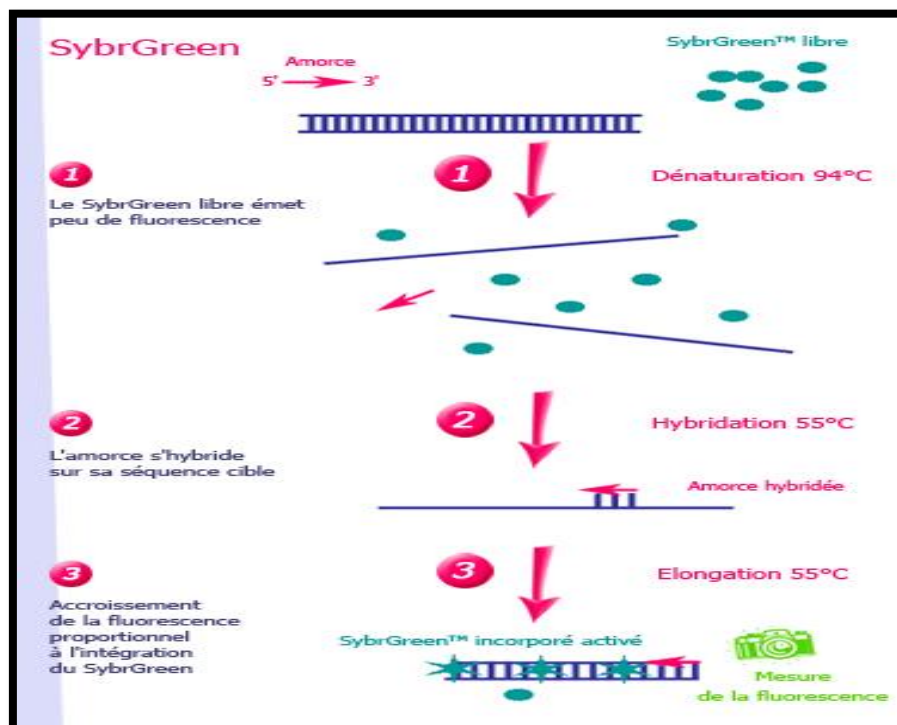


Figure 6: méthode de détection (**Corinne.S, 2012**)

III.7. Applications du PCR

La PCR est très utilisée en génétique moléculaire pour étudier les gènes, elle a des applications très nombreuses dans plusieurs domaines de la biologie et de la médecine. La PCR est très utilisée aux domaines suivants:

III.7.1. Les maladies héréditaires

Qui sont causés par des mutations des gènes transmises des parents aux enfants. On citera, par exemple, l'hémophilie ou la fibrose kystique. Dans ce cas on utilise la PCR pour amplifier les séquences des gènes qui peuvent être sondées pour voir si elles portent des mutations associées à ces maladies (**Winter et al., 1999**).

La recherche contre le cancer: l'utilisation de PCR dans ce cas intervient dans les études concernant le rôle des gènes dans le cancer. Par exemple, on a pu identifier en suivant des stratégies reposant sur la PCR, des mutations des oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeur. Ceci a permis d'améliorer notre compréhension des mécanismes de développement du cancer (**Winter et al., 1999**).

III.7.2. Les sciences médico-légales

Dans ce cas, la PCR peut être utilisée pour identifier des individus à partir d'échantillons de leur ADN. L'analyse des séquences variables est également utilisée pour associer des donneurs d'organe avec des receveurs et en anthropologie pour étudier les origines des (races) humaines (**Winter et al., 1999**).

III.7.3. Les biotechnologies

En biotechnologie la PCR joue un rôle important dans la production de protéines recombinantes comme l'insuline ou l'hormone de croissance, qui ont une utilisation très importante pour la fabrication des vaccins et des médicaments (**Winter et al., 1999**).

IV. Electrophorèse

Est une méthode de séparation des molécules chargés électriquement (ADN, ARN, Protéine) sous l'action d'un champ électrique, la séparation des particules se fait en fonction de leurs formes, leurs charges électriques ou leurs poids moléculaires sur les supports pleins ou semi-solides comme le papier ou l'agarose (**Elord et Stansfield, 2003**).

Cette technique a été employée la première fois en 1994 pour différencier l'hémoglobine en forme de faucile de l'hémoglobine normal. L'analyse de la séquence protéique à plus tard indiqué que la différence dans des mobilités électrophorétiques de ces protéines était due à une différence d'un seul acide aminé dans les chaînes bêta (**Elord et Stansfield, 2003**).

Actuellement l'électrophorèse est utilisée dans des diverses applications d'analyse d'ADN et de protéine. Le séquençage d'ADN est le plus souvent réalisé sur un gel de polyacrylamide. Des gels d'agarose sont eux utilisés pour isoler et estimer la taille des fragments d'ADN (**Elord et Stansfield, 2003**).

IV.1. Principe

Les méthodes connues sous le nom d'électrophorèse, sont basées sur le déplacement des molécules chargées sous l'effet d'un champ électrique. Dont les molécules chargées négativement (anions) migrent vers l'électrode positive ou anode. Alors que les molécules chargées positivement (cations), ils se dirigent vers l'électrode négative ou cathode. Le champ électrique est obtenu par un générateur de courant continu, dont les bornes sont reliées à la cathode et à l'anode. Le support du champ électrique est constitué par un tampon de PH et d'une concentration convenables, dont les ions conduisent le courant. Les phénomènes de séparation se produisent dans un support poreux approprié, il peut s'agir de papier filtre (électrophorèse sur papier), d'un dérivé de la cellulose(acétate de cellulose), d'un gel extrait d'algue (agarose) ou d'un gel de polymère organique (polyacrylamide) dont le calibre des micro-canalicules internes des mailles du réseau de polymère, gouverne la vitesse de migration des molécules à travers ce réseau (figure) (**Chrambach,1985**).

On peut visualiser le résultat obtenu en ajoutant (dans le gel ou après la migration selon les cas) du bromure d'éthidium, molécule ayant beaucoup d'affinité pour l'ADN et fluorescent en orange sous une lumière incidente en UV .il suffit alors de déposer le gel d'électrophorèse sur un transillumination UV pour visualiser la séparation des fragments. quant le mélange est constitué d'un très grand nombre de fragments différents, la transillumination aux UV ne permettra de voir qu'une trainée continue, mais si le mélange ne contient qu'un nombre limité de types de fragments, il sera alors possible de les dénombrer et

d'en mesurer la taille en rapportant leur distance de migration aux distances de fragments étalons ayant migré dans un puits parallèle (**Jean-Louis SERRE, 2002**).

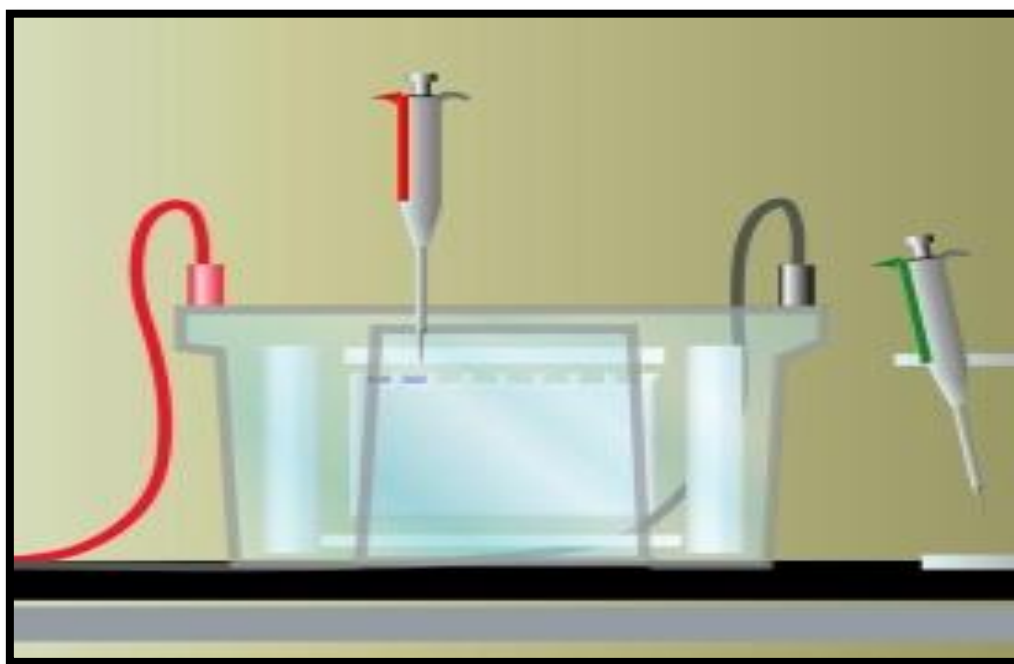


Figure 7: principe d'électrophorèse (**Huynh Vu Phi, s.d.**).

IV.2. Les différents supports utilisés

En électrophorèse de zones, les protéines se déplacent dans un support hydraté solide (ce qui limite la diffusion) et réticulé (effet de tamisage moléculaire). Le grand pouvoir de résolution de cette technique est précisément dû à ce que les protéines sont séparées en fonction de leurs deux caractéristiques physicochimiques les plus importantes :

Charge électrique nette et encombrement moléculaire.

Depuis les débuts de l'électrophorèse, divers types de supports ont été utilisés : papier, acétate de cellulose, gel d'agar, gel d'amidon, gel de polyacrylamide, gel de polyacrylamide-agarose, etc. Selon le type de protéine étudié et le type de problème à résoudre, on s'oriente vers le type de support que l'on juge le plus favorable après des essais souvent empiriques. Les supports qui sont actuellement les plus utilisés pour l'étude des protéines sont les gels de polyacrylamide (PAGE) continus ou discontinus, c'est-à-dire avec gel de concentration et gel de séparation. Les bandes d'acétate de cellulose, les gels d'agar. L'électrophorèse en gel d'amidon est de moins en moins utilisée mais peut fournir une très bonne résolution avec certaines protéines ou enzymes. Les gels d'agarose sont également utilisés pour l'électrophorèse des acides nucléiques (**Autran et Morel, s.d.**).

IV.3. Types d'électrophorèse

IV.3.1. L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE)

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) est une méthode de routine employée dans le domaine de l'analyse protéomique pour la séparation des protéines car elle demeure une technique robuste et reproductible (Garfin, 2003). Elle a connu son essor suite au développement de la PAGE bidimensionnelle (O'Farrell, 1975). La 2D-PAGE repose sur la combinaison de deux électrophorèses sur gel successives, présentant l'avantage d'être des séparations selon deux paramètres indépendants et d'avoir une haute résolution. Ainsi, selon la première dimension, les protéines sont séparées selon leur point isoélectrique par focalisation isoélectrique. Selon la seconde dimension, elles sont séparées selon leur masse par PAGE au sodium dodécyl sulfate (SDS-PAGE) (Sylviane, 2009).

IV.3.2. Électrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse en gel d'agarose est une technique de base au laboratoire de biologie moléculaire. Elle est utilisée :

-soit à des fins analytiques : pour séparer et identifier des fragments d'ADN, pour déterminer leur taille, pour en estimer la quantité

-soit à des fins préparatives, pour purifier un fragment d'ADN de taille connue.

La taille des fragments qu'il est possible de séparer est comprise entre 0,2 et 50 Kb.

Les fragments d'ADN sont facilement détectés sur le gel grâce à un colorant fluorescent, le bromure d'éthidium (BEI). On peut ainsi visualiser en lumière UV des quantités très faibles d'ADN (de l'ordre de 5-10 ng). L'électrophorèse en gel d'agarose est donc une technique très sensible ; elle est de plus rapide et simple à mettre en œuvre (figure 9) (Aude, 2007).

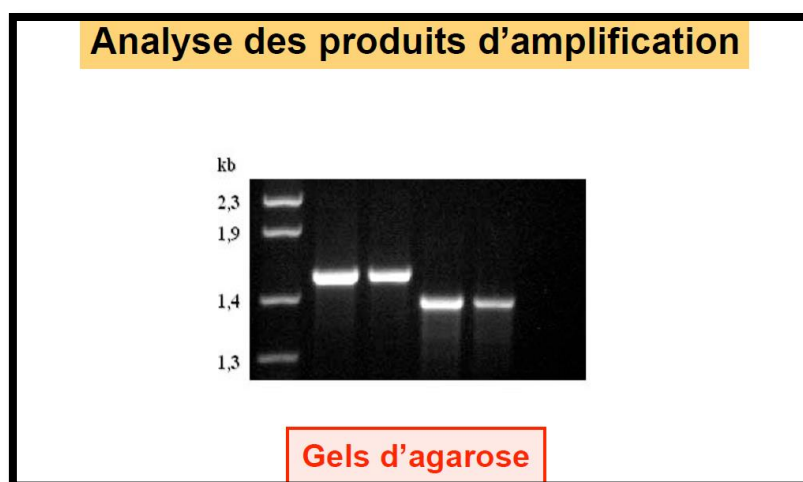


Figure 8 : électrophorèse sur gel d'agarose (Corinne.S, 2012)

IV.3.2.1. Le principe de l'électrophorèse d'ADN en gel d'agarose

l'électrophorèse sur gel est le moyen le plus efficace pour séparer des fragments d'ADN de différentes tailles (**Lee et al., 2012**).

En milieu légèrement basique, l'ADN se comporte comme une chaîne polyanionique (groupements phosphates ionisés). Placés dans un gel d'agarose et soumis à un champ électrique, des fragments d'ADN de taille différente migrent plus ou moins rapidement suivant leur masse moléculaire. La charge relative des fragments étant la même, c'est essentiellement l'effet de tamisage exercé par le gel qui influe sur la migration. La vitesse de déplacement diminue donc avec la taille des fragments, celle-ci étant exprimée en nombre de paires de bases (Pb) ou en Kb (1 Kb = 1000 Pb) (**Aude, 2007**).

IV.4. Électrophorèse des acides nucléiques

Les techniques en gel d'agarose et en gel de polyacrylamide ont été extensivement utilisées ces dernières années pour analyser la taille, la structure et la fonction des molécules d'ARN et d'ADN. En particulier, les récents développements des techniques d'ADN recombinants, de cartes de restriction, de séquence des nucléotides, utilisent toutes l'électrophorèse comme un outil analytique de sensibilité particulièrement élevée. Les enzymes de restriction, qui coupent les molécules d'ADN en des points spécifiques sont ainsi utilisées pour engendrer des fragments parfaitement définis d'ADN, dont la taille est ensuite déterminée par électrophorèse. Ces techniques sont extrêmement sensibles puisqu'elles permettent de détecter moins de 10 ng par bande après coloration par 1 µg/ml de bromure d'éthidium (**Autran et Morel, s.d.**).

MATERIEL ET METHODES

I. Souches étudiées

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.

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 femelles (n=15) et mâles (n=5). Les informations concernant les patients chez qui les souches ont été isolées sont indiquées dans le **tableau II**

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, y compris les bêtalactamines.

Tableau II: informations concernant les patients chez qui les souches ont été prélevées

Référence Laboratoire	Référence Hôpital	Age	Sexe	Signes cliniques
E1	675	A	F	BM
E2	1	30	F	GROSSESE
E3	51	67	M	BM
E4	666	A	M	BM
E5	644	30	F	BM
E6	30	42	F	SUSPICION I4
E7	645	30	F	GROSSESE
E8	39	4	F	BM
E9	656	40	M	BM
E10	870	20	F	/
E11	188	A	F	/
E12	59	28	F	/
E13	862	80	M	/
E14	602	32	F	/
E15	13	A	F	/
E16	204	13	F	/
E17	58	86	M	/
E18	442	24	F	GROSSESE
E19	574	A	F	GROSSESE
E20	580	A	F	GROSSESE

II. Objectif du travail

L'objectif de ce présent travail est de rechercher les gènes codant pour la résistance aux antibiotiques de la famille bêtalactamines, chez 20 souches d'*E. coli* résistantes aux bêtalactamines, et les gènes des intégrons de classe 1, et ce, par une approche PCR-électrophorèse.

III. Culture des souches bactériennes

Un total de 20 souches d'*E. coli* résistantes aux antibiotiques de type bêtalactamines 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* résistante aux bêtalactamines et positives pour les gènes *TEM*, *CTX-M* et les intégrons de classe 1. La présence de ces gènes chez cette souche a été confirmé 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 (*E. coli* K12), phénotypiquement sensible aux antibiotique, et dont le génome est dépourvu des gènes *TEM*, *CTX-M* et des intégrons de classe 1.

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 surnagent 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 (MgCl₂, 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 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' à 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 la résistance aux antibiotiques de la famille bêtalactamines chez *E. coli*.

Deux gènes codant pour la résistance aux bêtalactamines chez *E. coli* ont été recherchés. Il s'agit des gènes *TEM* et le gène *CTX-M*.

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

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

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),
- MgCl₂ (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 composant des réactions PCR, et ce, selon les recommandations d'amplification des deux gènes *TEM* et *CTX-M* :

- **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/ μ l. Donc 0.3125 unités correspondre à **0.0625 μ l** de Taq.

- **dNTP**

On cherche la concentration des DNTP dans le Mix :

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

- **MgCl₂**

On cherche la concentration des MgCl₂ 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 μ l est de 6.25 μ l.
- La concentration finale de MgCl₂ dans une réaction PCR de 12.5 μ l est de 1.5mM.
- La solution mère de Mgcl₂ est concentrée à 25mM.
- Donc le volume de MgCl₂ à prendre de la solution mère pour atteindre cette concentration finale est **0.75 μ l**.

- **Tampon de la GoTaq polymérase**

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

- **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 simple de 12.5µl.

Concentrations mères	Volumes pour une réaction de 12.5µl	Concentrations finales
H ₂ O	5.94µl (qsp)	/
5X GoTaqFlexi buffer	2.5µl	1X
MgCl ₂ 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 MgCl₂ (1,5 mM), les quatre désoxyribonuléotides (200 µM), l'amorces sens (0,5 µM), l'amorces reverse (0,5 µM), et la GoTaq DNA polymérase fournie par Promega (0,312 unités) aux concentrations calculées à l'effet de l'amplifications des deux gènes *TEM* et *CTX-M*. 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 10µl du mélange réactionnel, auxquels, nous avons rajouté 2.5µl d'ADN matrice. Le volume total dans chaque puits est alors 12.5µl (**Figure 10**).

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

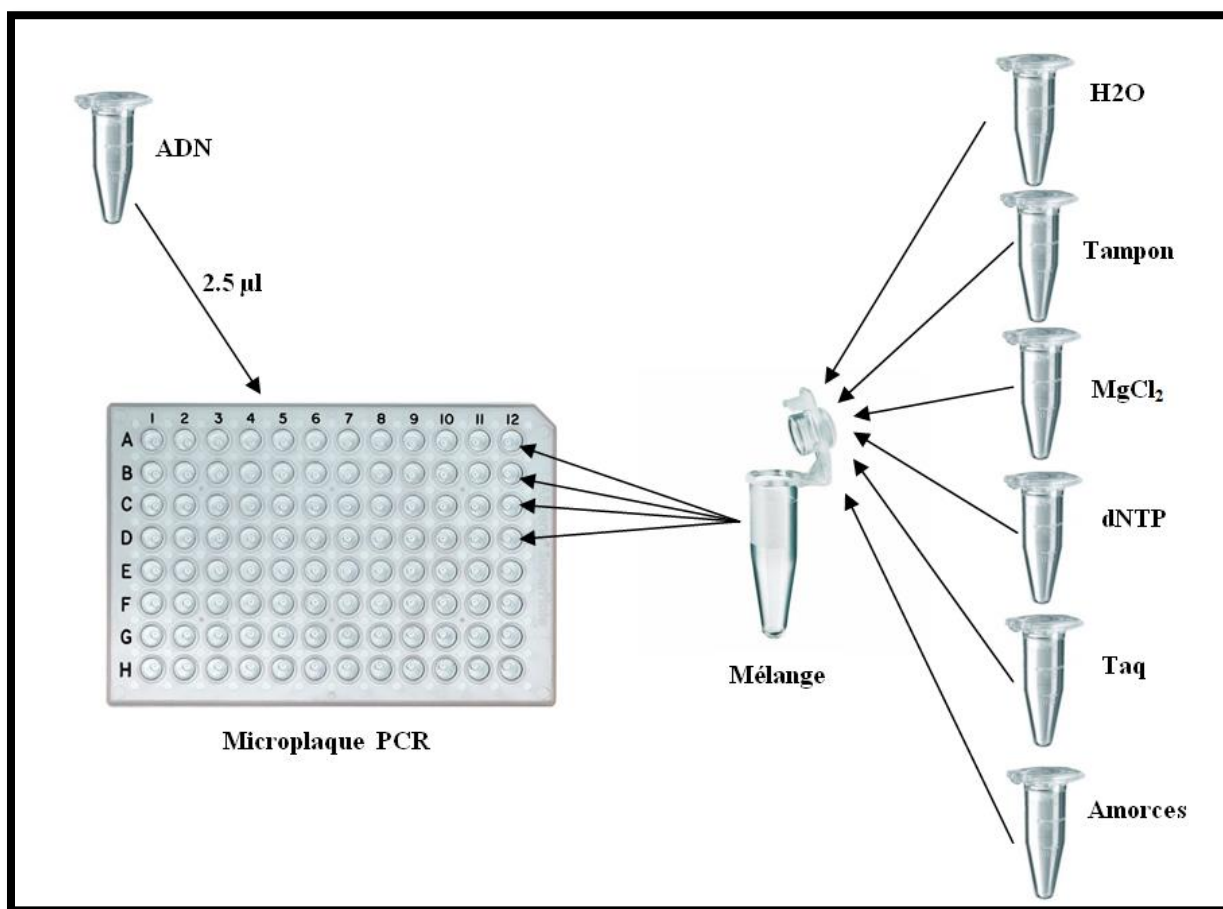


Figure 9: Schéma des étapes de réalisation du mélange réactionnel pour PCR.

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),
- $MgCl_2$ (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 codant pour les intégrons de classe 1.

La présence des intégrons de classe 1 a été recherchée en ciblant le gène *int1* codant l'intégrase spécifique de ces intégrons (région 5'-CS) et des gènes *sul1* (codant une dihydroptéroate synthase conférant la résistance aux sulfamides) et *qacEΔ1* (résistance aux ammoniums quaternaires) constitutifs de la région 3'-CS (**Figure11**) (**Murinda et al., 2005**).

La souche *E. coli* TN19 a été utilisée comme contrôle positif (**Eckert et al., 2006**).

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 VI.

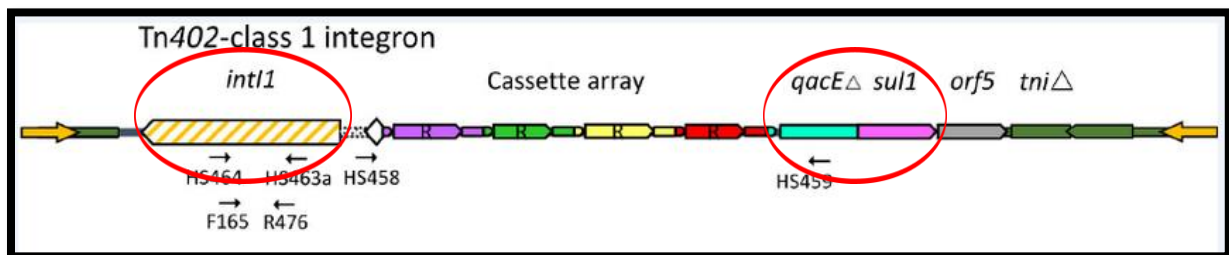


Figure 10: Représentation schématique de la structure des intégrons de classe 1 indiquant les trois gènes recherchés par PCR multiplex.

Tableau IV: Composant d'une réaction PCR multiplex de 25µl.

Concentrations mères	Volume pour une réaction de 25µl	Concentration finales
H ₂ O	12.6µl (qsp)	/
5X GoTaqFlexi buffer	5µl	1X
MgCl ₂ 25mM	0.75µl	1.5 mM
dNTPs 10mM	0.5 µl	200µM
Amorces sens 1 (25µM)	0.5µl	0.5µM
Amorces reverse 1 (25µM)	0.5µl	0.5 µM
Amorces sens 2 (25µM)	0.5µl	0.5µM
Amorces reverse 2 (25µM)	0.5µl	0.5 µM
Amorces sens 3 (25µM)	0.5µl	0.5µM
Amorces reverse 3 (25µM)	0.5µl	0.5 µM
GoTaq Flexi DNA polymerase 5u/µl	0.125 µl	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)**.

Tableau V: Amorces utilisées pour la recherche des gènes de résistance aux antibiotiques et des intégrons

Cible	Séquences des amorces (5'→ 3')	Taille de l'amplifiat (pb)	Concentrations (μM)	Références
PCR SIMPLEX				
<i>bla</i> _{TEM}	TEM-UP: ATGAGTATTCAACATTTCGG TEM-LOW: CAATGCTTAATCAGTGAGG	858	0,5	Yates <i>et al.</i> (2004)
<i>bla</i> _{CTX-M}	CTX-MF: ACCGCGATATCGTTGGT CTX-MR: CGCTTTGCGATGTGCAG	550	0,5	Messai <i>et al.</i> (2008)
PCR MULTIPLEX				
<i>int1</i>	InI1-F: CCTTCGAATGCTGTAACCGC InI1-R: ACGCCCTTGAGCGGAAGTATC	248	0,5	Murinda <i>et al.</i> (2005)
<i>sul1</i>	SULI1-F: TCAGACGTCGTGGATGTCG SULI1-R: CGAAGAACCGCACAAATCTCG	346	0,5	
<i>qacEΔ1</i>	QACEΔ1-F: GAGGGCTTTACTAAGCTTGC QACEΔ1-R: ATACCTACAAAGCCCCACGC	200	0,5	

Tableau VI: Conditions des réactions PCR des gènes de résistance aux antibiotiques et des intégrons

Cible	Dénaturation initiale	Dénaturation	Hybridation	Elongation	Nombre de cycles	Elongation finale
PCR SIMPLEX						
<i>bla</i> _{TEM}	94°C/5 min	94°C/30 sec	52°C/40 sec	72°C/1 min	30	72°C/7 min
<i>bla</i> _{CTX-M}	94°C/5 min	94°C/30 sec	55°C/40 sec	72°C/1 min	30	72°C/7 min
PCR MULTIPLEX						
<i>int1, sul1, qacEΔ1</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 Matériel et méthodes Page 34 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 séparés par migration sur gel d'agarose à l'aide d'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 d'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 *TEM* et *CTX-M* ont été migrés sur un gel d'agarose de 1%.

Les produits PCR des gènes des intégrons de classe 1 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 12**).

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.

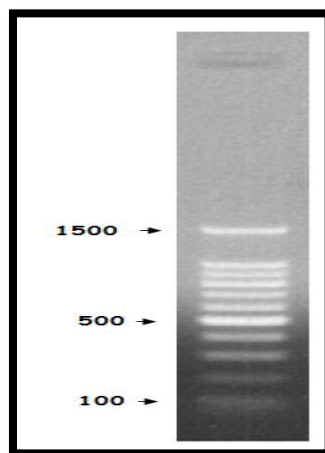


Figure 11: Marqueur de taille utilisée pour déterminer la taille des différents fragments d'amplification.

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 de voir 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.

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**).

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 résistance aux antibiotiques de la famille bêtalactamines, chez 20 souches d'*E. coli* résistantes aux bêtalactamines, 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 pour la résistance aux antibiotiques de la famille bêtalactamines chez *E. coli* : le gène *TEM* et le gène *CTX-M*. Alors que dans la PCR multiplex, nous avons ciblé 3 gènes constituant les intégrons de classe 1 chez *E. coli* : le gène *int1* codant l'intégrase spécifique de ces intégrons (région 5'-CS) et des gènes *sul1* (codant une dihydroptéroate synthase conférant la résistance aux sulfamides) et *qacEΔ1* (résistance aux ammoniums quaternaires) constitutifs de la région 3'-CS (**Murinda et al., 2005**).

En effet chez *E. coli*, la résistance aux antibiotiques est conférée par l'acquisition de gènes exogènes. Ce qui justifie l'absence de ces gènes recherchés chez la souche de références *E. coli* K12 sensible aux antibiotiques (**Figure 13**).

Chez *E. coli* et toutes les autres espèces d'entérobactéries, les gènes *TEM* et *CTX-M* codent pour des protéines dites bêtalactamases. Ces dernières agissent sur les molécules antibiotiques de la famille des bêtalactamines pour les inactiver et donc empêcher leur action létale sur les bactéries. C'est le phénomène de résistance « enzymatique » bactérienne aux bêtalactamines. Les intégrons de classe 1 sont des éléments mobile du génome bactérien. Ils forment le support génétique de plusieurs gènes de résistance aux antibiotiques en plus des trois gènes qui les constituent. Ceci permet la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques au sein de la communauté bactérienne (**Alvarez-Munoz et al., 2005 ; Lakshmi V et al., 2007**).

Choix des amorces

Dans ce travail, choix des amorces utilisées pour amplifier les gènes *TEM* et *CTX-M* 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, provenait 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 (858 pb pour *TEM* et 550pb pour *CTX-M*).

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 réalisé 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), MgCl₂ (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 *TEM* et 55 °C pour *CTX-M*) 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 polymérases 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_m théorique des amorces, probablement parce qu'elles interagissent déjà avec les polymérases, qui stabiliseraient leur hybridation à l'ADN matrice.

L'étape d'élongation permet aux polymérases 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 *TEM* et *CTX-M* par PCR simplex et ceux des intégrons de classe 1 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 (858 pb pour *TEM*, 550 pb pour *CTX-M*, 248 pb pour *int1*, 346 pb pour *sul1* et 200 pb pour *qacEΔ1*) (Figure 13 et 14). 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 souches résistante aux bêtalactamines et positives pour ces gènes recherchés ; et une souches sensible aux bêtalactamines et dépourvue des gènes recherchés (Figure 13).

- La présence du gène *TEM* chez toutes les souches étudiées excepté une (Figure 13).
- En effet, la présence du gène *TEM* chez des souches d'*E. coli* résistantes aux bêtalactamines confirme le mécanisme enzymatique de cette résistance, induite par la production de la protéine TEM qui bloque l'action des bêtalactamines sur *E. coli*.
- L'absence du gène *TEM* chez une souche d'*E. coli* résistante aux bêtalactamines pourrait s'expliquer de plusieurs manières : i) soit le gène *TEM* est absent chez cette souche, donc le phénotype de résistance aux bêtalactamines chez cette souche d'*E. coli* est gouverné par un autre gène autre que *TEM* (comme le gène *SHV*) ; soit le gène *TEM* est présent, mais la qualité du produit de son amplification est mauvaise, ceci est due soit aux erreurs de manipulation ou à la mauvaise qualité de l'ADN extrait de cette souche. Ce qui a empêché les amorces de cibler la région de l'ADN portant ce gène.

Pour palier à ce problème, il est nécessaire de reprendre l'extraction de l'ADN à partir d'une nouvelle culture de cette souche, pour éviter le problème de contaminants. Puis, reprendre la PCR pour confirmer la présence ou l'absence de ce gène chez cette souche.

➤ La présence du gène *CTX-M* chez l'ensemble des souches étudiées (**Figure 14**). Ce gène code pour une bêtalactamase qui inhibe l'action létale des bêtalactamines sur les souches d'*E. coli*. Sa présence parmi nos souches justifie le phénotype de résistance aux bêtalactamines. Chez certaines souches, en plus de la bande attendue du gène *CTX-M*, nous avons observé la présence de bandes supplémentaires à des tailles différentes de celle du gène *CTX-M*. la présence de ces bandes indique que lors de la réaction d'amplification, les amorces se sont hybridées à des régions présentant peu d'homologie de séquence à celle du gène *CTX-M*. ce qui a généré des amplifications aspécifiques.

Pour palier à ce problème, 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**).

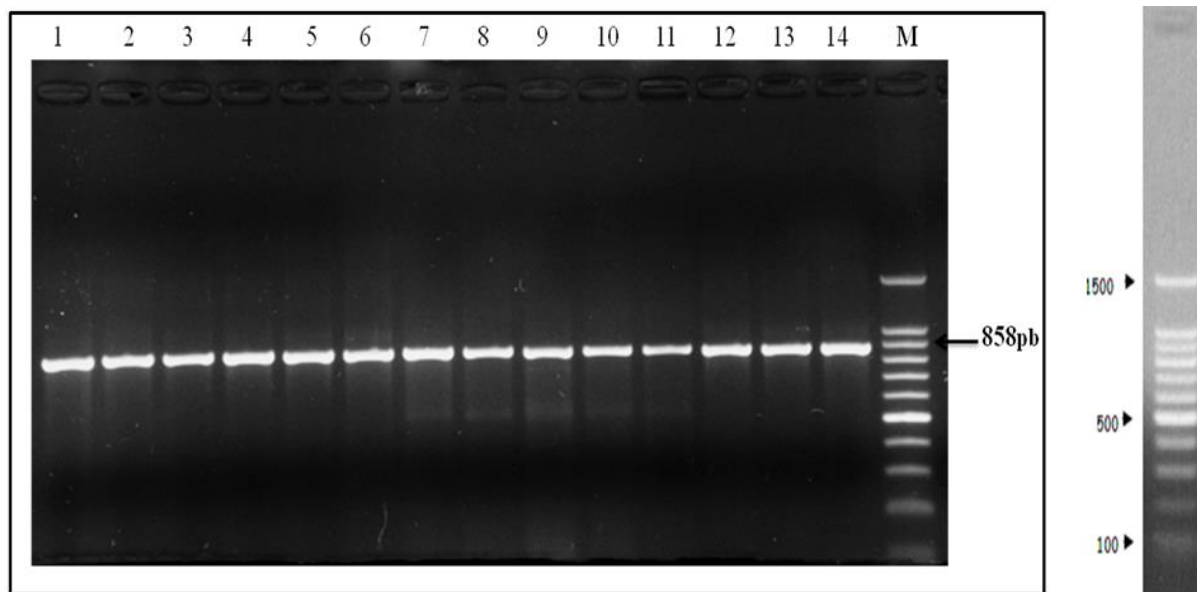


Figure 12: Détection du gène TEM par PCR simplex

De 1 à 13 : souches TEM+, 14 : témoin positif, **M** : marqueur de taille.

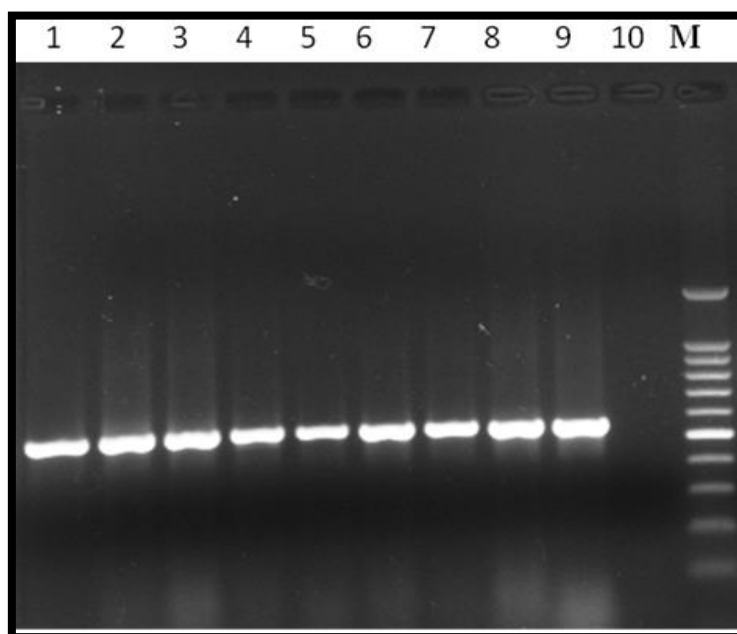


Figure 13: Détection du gène CTX-M par PCR simplex

De 1 à 8 : souches positives pour le gène CTX-M (550pb)
 , 9: Témoin positif, 10: témoin négatif, **M**: marqueur de taille.

➤ La présence des trois gènes qui constituent les intégrons de classe 1 chez 8 souches étudiées (**Figure 15**). La présence de ces éléments mobiles chez des souches d'*E. coli* résistantes aux antibiotiques constitue un véritable problème de santé publique, puisque ces derniers forment le support génétique de gènes de résistance aux antibiotiques et donc facilitent leur mobilisation vers les souches sensibles. 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**).

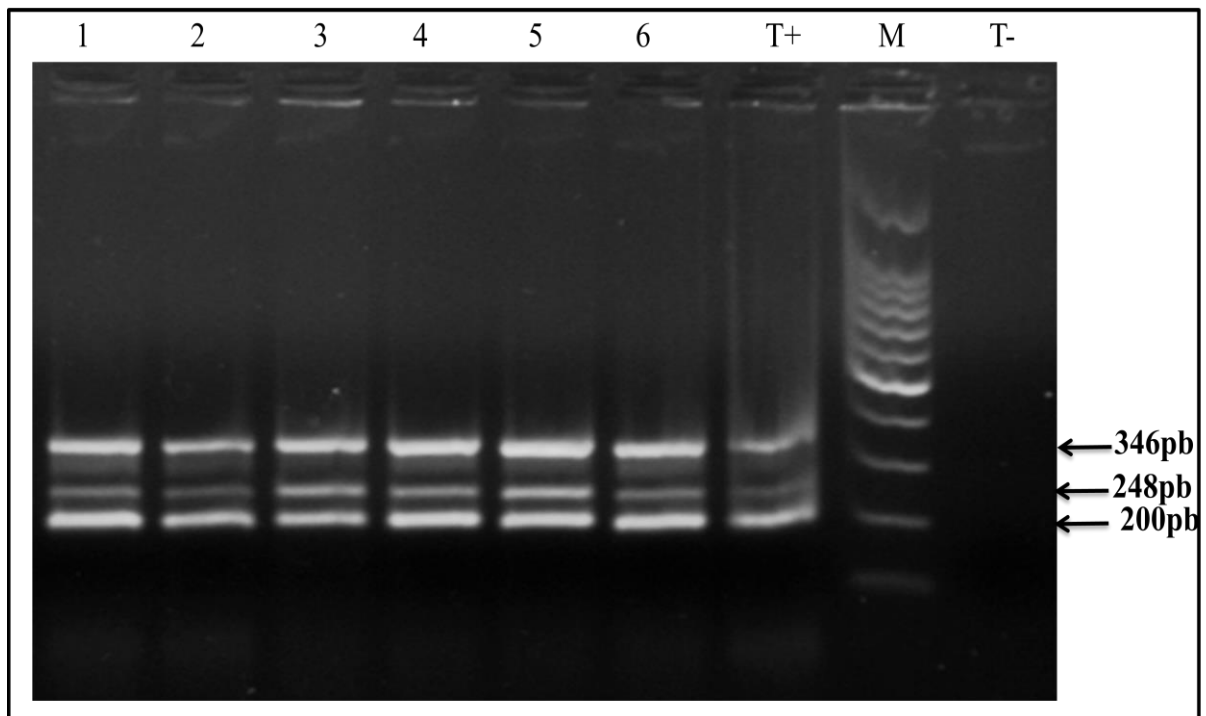


Figure 14: Détection des gènes *intI1*, *sul1* et *qacEΔ1* constitutifs des intégrons de classe 1

De 1 à 6 : souches positives pour les gènes *intI1*, *sul1* et *qacEΔ1*, 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

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 *TEM*, 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.

Au terme de ce travail une concordance a été enregistrée entre les tests phénotypiques, basés sur l'antibiogramme et les tests de biologie moléculaire basés sur la recherche de gènes codant pour cet résistance aux antibiotiques.

Nos résultats de la recherche des gènes *TEM* et *CTX-M* par PCR simplex et ceux des intégrons de classe 1 par PCR multiplex, ont montré leur présence parmi nos souches résistantes aux antibiotiques. Ce résultat a été confirmé par l'absence de ces gènes chez la souche de référence utilisée, qui est sensible aux antibiotiques et par leur présence chez la souche de référence résistante aux antibiotiques, utilisée comme témoin positif de PCR.

La PCR pour l'amplification des gènes de résistance aux antibiotiques, 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 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.

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, Moloi 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 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 Fragments.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., Taminiau B. et Mainil J., (2006).** Le lipopolysaccharide d'*Escherichia coli* : structure, biosynthèse et rôles. *Ann. Méd. Vêt.*, **150** : 108-124.
 - **Tagu D., Aubert-Possamai J.et Méreau A., (2018).** Principes des techniques de biologie moléculaire et génomique. 3^e 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 Flectcher H.L., (1999).** Génétique. Chapitre A : Génétique moléculaire, chapitre E : la technologie de l'ADN recombinant. Edi. Berti,Paris-France.pp.50-332.

Résumé

Notre travail avait pour objectif la recherche des gènes codant pour la résistance aux antibiotiques de la famille bêtalactamines, chez 20 souches d'*E.coli*, et ce, par une approche PCR-électrophorèse.

la recherche des gènes *TEM* et *CTX-M* par PCR simplex et ceux des intégrons de classe 1 par PCR multiplex, ont montré leur présence parmi nos souches résistantes aux antibiotiques.

Ce résultat a été confirmé par l'absence de ces gènes chez la souche de référence utilisée, qui est sensible aux antibiotiques et par leur présence chez la souche de référence résistante aux antibiotiques, utilisée comme témoin positif de PCR.

ملخص

يهدف عملنا للبحث على الجينات لمقاومة المضادات الحيوية لعائلة البييتالاكتامينات ، باستخدام 20 سلالة من *E.coli* ، وهذا ، من خلال نهج الكهربائي PCR. أظهر البحث عن جينات *TEM* و *CTX-M* بواسطة PCR simplex وتلك الخاصة بـ *intégrons* من الفئة 1 بواسطة PCR multiplex ، وجودها بين سلالاتنا المقاومة للمضادات الحيوية. تم تأكيد هذه النتيجة من خلال عدم وجود هذه الجينات في السلالة المرجعية المستخدمة ، والتي تعتبر حساسة للمضادات الحيوية وبوجودها في السلالة المرجعية المقاومة للمضادات الحيوية ، تستخدم كعنصر تحكم إيجابي في PCR.

Liste des figures

Figure 1 : La PCR, une amplification exponentielle

Figure 2 : étapes de PCR

Figure 3 : PCR en temps réel versus PCR en point final

Figure 4 : RT-PCR

Figure 5 : Nested-PCR

Figure 6 : méthode de détection

Figure 7 : principe d'électrophorèse

Figure 8 : électrophorèse sur gel d'agarose

Figure 9 : Schéma des étapes de réalisation du mélange réactionnel pour PCR

Figure10 : Représentation schématique de la structure des intégrons de classe 1 indiquant les trois gènes recherché par PCR multiplex

Figure11 : Marquer da taille utilisée pour la taille des différents fragments d'amplification

Figure12 : Détection du gène TEM par PCR simplex

Figure13: Détection du gène *CTX-M* par PCR simplex

Figure14: Détection des gènes *intI1*, *sul1* et *qacEΔ1* constitutifs des intégrons de classe 1

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification d'*Escherichia coli*

Tableau 2 : informations concernant les patients chez qui les souches ont été prélevées

Tableau 3 : composant d'une réaction PCR simplexe de 12.5 µl

Tableau 4 : composant d'une réaction PCR simplexe de 25 µl

Tableau 5 : Amorces utilisées pour la recherche des gènes de résistance aux antibiotiques et des intégrons

Tableau 6: conditions des réactions PCR des gènes de résistance aux antibiotiques et des intégrons