

République Algérienne Démocratique et Populaire

**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université 08 Mai 1945 – Guelma –**

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers

Option : Biologie Cellulaire et Moléculaire

Département de Biologie



Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

En vue de l'obtention du diplôme de Master Académique

Etat des lieux de l'utilisation des techniques de biologie moléculaire dans le domaine médical (CHU de Constantine et d'Annaba)

Présenté par :

Boudeffa Rayan

Merabet Amira

Devant le jury composé de :

Président : Benouareth Djamel Eddine

Professeur

Examinatrice : Merabet Rym

Maitre Assistante A

Encadrant : Seridi Braik Asma

Maitre de Conférence B

Juillet 2021

Remerciements

Nous remercions tout d'abord Allah tout puissant de nous avoir donné la force, la volonté et le courage pour réaliser ce mémoire.

*Nous souhaitons adresser nos remerciements les plus sincères à notre encadrant et enseignante Madame **Asma BRAIK SERIDI** maitre de conférence à l'université de Guelma, votre modestie, vos qualités scientifiques et pédagogiques, votre rigueur et votre dynamisme font de vous un maître tant apprécié. Cher encadreur, permettez-nous de vous renouveler l'expression de notre vive reconnaissance et de notre profond respect.*

*Nous adressons aussi nos remerciements aux membres de jury, Monsieur **BENOURETH Djamel Eddine**, Professeur à l'université de Guelma comme présidente du jury et Madame **MERABET Rym**, Maitre assistante à l'université de Guelma comme examinatrice de notre travail. Nous vous remercions d'avoir nous tenons à exprimer nos remerciements et notre profonde gratitude d'avoir bien accepté de présider ce jury.*

*Nous remercions chaleureusement **Docteur GOURI Adel**, Médecin spécialiste en Biochimie clinique Service de Biochimie, CHU IBNROCHD, Annaba ; **Docteur SIFI Karima**, Médecin au Service de Biochimie, Unité de génétique, CHU IBNBADIS, Constantine ainsi que **Docteur BENLABED Kaddour**, Médecin spécialiste en Microbiologie Service de Microbiologie-Virologie, CHU IBNBADIS, Constantine. Notre séjour au sein de vos laboratoires respectifs nous a permis de découvrir ce domaine fascinant de recherche et de diagnostic de diverses maladies. Nous vous remercions pour votre professionnalisme exemplaire et votre disponibilité singulière. Vous trouverez dans ce mémoire notre parfaite gratitude.*

Notre plus grand merci s'adresse à tous nos enseignants du département de biologie de l'université de Guelma, pour leur don naturel à transmettre leurs connaissances et la simplicité avec laquelle ils le font. Nous vous exprimons notre gratitude.

Nous formulant également nos remerciements à toute personne qui nous a aidé, de près ou de loin, au succès de ce travail.

Dédicace

Avant toute dédicace je tiens à remercier « Allah » le tout puissant qui m'a donné le courage pour mener ce travail à terme.

*Je dédie ce modeste travail à
Ma joie et Ma raison de vivre, ma chère mère, symbole du sacrifice et du dévouement, qui
m'a accompagnée durant tout ce parcours laborieux.*

*A mon père, à qui je dois du respect, qu'il trouve ici l'expression de ma profonde
reconnaissance pour tout l'effort et soutien incessant qui m'a toujours apporté.*

*Puisse Dieu leur accorder santé, bonheur, prospérité et longue vie afin que je puisse un
jour combler de joie leurs vieux jours.
A mes chères soeurs: Ichraq et Ghada sourour*

A tous mes amis : Ines , Ramzi, Rahim et Nadir

*A tous ceux qui m'ont soutenu de près ou de loin
Et toute ma famille.*

Dédicace

Louange à Dieu tout puissant, qui m'a permis de voir ce jour tant attendu

Je dédie ce modeste travail à

Ma très chère mère

Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point te remercier comme il se doit. Ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles.

Mon très cher père

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour l'estime et le respect que j'ai toujours eu pour toi.

Puisse Dieu les protéger pour moi et leur accorde santé et longue vie.

Ma chère grande mère

Mes chers frères et ma chère sœur

Djaber, Khalil, Yasmine

Toutes mes cousines

Toute ma famille

Tous ceux que j'aime et ceux qui m'aiment.

Résumé

Plusieurs pays utilisent les techniques de Biologie moléculaire en clinique en raison de leur spécificité et de leur rapidité. L'objectif de cette étude est de faire un état des lieux de l'utilisation des techniques de biologie moléculaire dans le domaine médical dans deux CHU de l'Est de l'Algérie CHU Annaba et CHU Constantine. Notre méthodologie est basée sur des visites aux laboratoires de génétique, de biochimie et de bactériologie-virologie au niveau des CHU Dr IBNBADIS de Constantine (CHUC) et CHU IBN ROCHD d'Annaba (CHUA) suivi d'une distribution de questionnaire portant sur le type de maladies diagnostiquées ou dépistées et sur les techniques de biologie moléculaire utilisées. Les réponses récoltées montrent qu'au niveau des deux CHU, des maladies infectieuses (Hépatite B et C, SIDA, COVID-19) sont diagnostiquées en utilisant la technique de PCR à système fermé. D'autres maladies génétiques (maladies neuromusculaires, mucoviscidose, néoplasies endocriniennes multiple (NEM) de type 2 et cancer du sein) sont diagnostiquées par les techniques de PCR simple et multiplex, séquençage, DGGE, SSCP et SSP. Les maladies métaboliques héréditaires (Hémochromatose primitive, gène HFE) et les maladies cardiovasculaires (Polymorphisme du gène MTHFR et Polymorphisme du gène PAI-1) sont diagnostiquées par PCR classique, PCR en temps réel, RT-PCR Gene scannings. Le dépistage est limité au cancer médullaire de la thyroïde (CMT) et au cancer du sein par la technique de PCR en temps réel multiplexe. L'activité de recherche s'intéresse au cancer colorectal métastatique en cherchant des mutations somatiques dans les gènes KRAS, NRAS et BRAF. Pour le polymorphisme la PCR-RFLP et en temps réel sont utilisés. En Algérie, ces technologies intégrées dans le domaine médical sont loin d'être suffisantes et nécessitent plus de développement pour améliorer le diagnostic, le dépistage et la recherche médicale en Algérie.

Mots clés : Biologie moléculaire, PCR, Séquençage, Médecine, Maladies génétiques, Maladies métaboliques héréditaires.

Abstract

Several countries use molecular biology techniques in the clinic because of their specificity and rapidity. The objective of this study is to take stock of the use of molecular biology techniques in the medical field in eastern Algeria CHU Constantine and CHU Annaba. Our methodology is a questionnaire based on research done to genetics, biochemistry and bacteriology-virology laboratories at the Dr IBNBADIS University Hospital of Constantine (CHUC) and IBN ROCHD University Hospital of Annaba (CHUA) followed by a distribution of questionnaire on the types of diseases diagnosed or detected and the molecular biology techniques used. The responses collected show that at the two university hospitals, infectious diseases (Hepatitis B and C, AIDS, COVID-19) are diagnosed using the closed system PCR technique. Other genetic diseases (neuromuscular diseases, cystic fibrosis, multiple endocrine neoplasia (MEN) type 2, and breast cancer) are diagnosed by simple and multiplex PCR techniques, sequencing, DGGE, SSCP and SSP. Hereditary metabolic diseases (Primary hemochromatosis, HFE gene) and cardiovascular diseases (Polymorphism of the MTHFR gene and Polymorphism of the PAI-1 gene) are diagnosed by conventional PCR, real-time PCR, RT-PCR Gene scannings. Screening is limited to cancer. Thyroid medullary (CMT) and breast cancer by the multiplex real-time PCR technique. The research activity is interested in metastatic colorectal cancer by looking for somatic mutations in the KRAS, NRAS and BRAF genes. PCR-RFLP and real-time polymorphism are used. In Algeria, these technologies integrated into the medical field are far from sufficient and require further development to improve diagnosis, screening and medical research in Algeria.

Keywords: Molecular biology, PCR, Sequencing, Medicine, Genetic diseases, Hereditary metabolic diseases.

ملخص

تستخدم العديد من البلدان تقنيات البيولوجيا الجزيئية في العيادة بسبب خصوصيتها وسرعتها. الهدف من هذه الدراسة هو حصر استخدام تقنيات البيولوجيا الجزيئية في المجال الطبي في شرق الجزائر. من CHU و CHU قسنطينة. تعتمد منهجيتنا على زيارات إلى مختبرات علم الوراثة والكيمياء الحيوية وعلم الجراثيم والفيروسات في مستشفى الدكتور ابن باديس الجامعي في قسنطينة (CHUC) ومستشفى جامعة ابن روتشد في عنابة (CHUA) متبوعاً بتوزيع استبيان حول أنواع الأمراض التي تم تشخيصها أو اكتشافها وتقنيات البيولوجيا الجزيئية المستخدمة. تظهر الردود التي تم جمعها أنه في المستشفيات الجامعيين ، يتم تشخيص الأمراض المعدية (التهاب الكبد B و C ، الإيدز ، COVID-19) باستخدام تقنية النظام المغلق PCR. يتم تشخيص الأمراض الوراثية الأخرى (الأمراض العصبية والعضلية ، والتليف الكيسي ، والأورام الصماء المتعددة (MEN) من النوع 2 ، وسرطان الثدي) عن طريق تقنيات PCR بسيطة ومتعددة ، التسلسل ، SSCP ، DGGE و SSP. يتم تشخيص أمراض التمثيل الغذائي الوراثي (داء ترسب الأصبغة الدموية الأولية ، وجين HFE) وأمراض القلب والأوعية الدموية (تعدد الأشكال لجين MTHFR وتعدد الأشكال لجين PAI-1 عن طريق فحص PCR التقليدي ، و PCR في الوقت الحقيقي ، و RT-PCR. يقتصر الفحص على السرطان. نخاع الغدة الدرقية (CMT) وسرطان الثدي من خلال تقنية تفاعل البوليميراز المتسلسل في الوقت الحقيقي المتعدد. يهتم نشاط البحث بسرطان القولون والمستقيم النقلي من خلال البحث عن الطفرات الجسدية في جينات KRAS و NRAS و BRAF. يتم استخدام PCR-RFLP وتعدد الأشكال في الوقت الحقيقي. في الجزائر ، هذه التقنيات المدمجة في المجال الطبي بعيدة عن أن تكون كافية وتتطلب مزيداً من التطوير لتحسين التشخيص والفحص والبحث الطبي في الجزائر.

الكلمات المفتاحية:

البيولوجيا الجزيئية ، تفاعل البوليميراز المتسلسل ، التسلسل ، الطب ، الأمراض الوراثية ، الأمراض الأيضية الوراثية.

Liste des abréviations

ABCD1 :	<i>ATP binding cassette subfamily D(ALD) member.</i>
ACTH :	Hormone Adrénocorticotrope.
ADNc :	ADN complémentaire.
ALD :	Adrénoleucodystrophie.
APC :	Adenomatous polyposis coli.
ARNs :	<i>Small RNA.</i>
ASI :	Amyotrophie spinale infantile.
BAC :	Chromosomes artificiels bactériens.
BMD :	Dystrophie musculaire de Becker.
CF :	<i>Cystic fibrosis.</i>
CFTR :	<i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator.</i>
CGH :	<i>Comparative genomic hybridization.</i>
CHUA :	Centre hospitalier universitaire d'Annaba.
CHUC :	Centre hospitalier universitaire de Constantine.
CMT :	Cancer médullaire de la thyroïde.
CNV :	<i>Copy number variant.</i>
COVID19 :	<i>Coronavirus disease 2019.</i>
CPK :	Créatine phosphokinase.
CT :	Calcitonine.
DGGE :	<i>Denaturing gel gradient electrophoresis.</i>
DMD :	Dystrophie musculaire de Duchenne.
DNTP :	Désoxyribonucléoside triphosphate quelconque.
EP :	Embolie pulmonaire.
FISH :	Hybridation <i>in situ</i> en fluorescence.
HPV :	Papillomavirus.
HTA :	Hypertension artérielle.
IDM :	Infarctus de myocarde.
IncARNs :	Longs ARNs non codants.
ISP :	Insuffisance surrénale Primaire.
KRAS :	Kirsten rat sarcoma
LDH :	Lactate déshydrogénase.
MAPA :	Monitoring ambulatoire de la pression artérielle.
MCV :	Maladies cardiovasculaires.
MiARNs	<i>Micro small ARN.</i>
MLPA :	<i>Multiplex ligation-dependent probe amplification.</i>
MTHFR :	Méthylène tétrahydrofolate réductase.
NEM :	Néoplasies endocriniennes multiple.
NGS :	<i>Next generation sequencing.</i>
NPC :	Cancer du nasopharynx.
NRAS:	Neuroblasma rat viral
PA-1 :	Inhibiteur des activateurs du plasminogène de type 1.
PAC :	Chromosomes artificiels du bactériophage P1.
PCR :	<i>Polymerase Chain Reaction.</i>
PCRq :	Réaction de polymérisation en chaîne quantitative.
SSCP :	<i>Single strand conformation polymorphism.</i>
RFLP :	Polymorphisme de longueur des fragments de restriction.
RT-PCR :	<i>Reverse Transcriptase.</i>
SIDA :	Syndrome d'immunodéficience acquise.

SPW : Syndrome de Prader-Willi.
SSP : *Sequence specific primer.*
TEM-PCR : *Target Enriched Multiplex Polymerase Chain Reaction.*
VHB : Virus de l'hépatite B.
VHC : Virus de l'hépatite C.
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine.
YAC : Chromosomes artificiels de levure.

Sommaire

Liste des figures

Introduction

Introduction

La médecine moderne s'est vue ces dernières années confrontée à de nombreux dilemmes cliniques et thérapeutiques dont la compréhension et la résolution nécessitent d'une manière quasi-ubiquitaire les outils de la biologie moléculaire. En plus, les maladies, génétiques ou spontanées trouvent l'explication de leur causalité dans les processus métaboliques (Negura et al, 2006). Ces outils ont trouvé de nombreuses applications dans différents secteurs (médecine, génétique humaine, environnement...).

L'emploi de certaines techniques de biologie moléculaire est en train de transformer profondément la pathologie, car l'utilisation de ces méthodes génère des informations pouvant permettre de compléter les données de l'étude morphologique (Vielh, Carlos Schmitt, 2012). Le succès croissant d'utilisation des techniques de biologie moléculaire dans le domaine médical réside dans le fait qu'ils fournissent des informations complémentaires et souvent uniques permettant d'optimiser les stratégies classique en améliorant l'efficacité des techniques utilisées et la diminution de la durée des résultats recherchés.

L'exemple type de maladie mettant en œuvre les techniques de biologie moléculaire est la COVID-19. La vitesse par laquelle cette maladie a été transmise et le nombre de cas infectés par le virus SARS-Cov-2 ont poussé, en plus des pays développés, tous les pays du monde à déployer les moyens techniques nécessaires pour le diagnostic de cette maladie. En effet, grâce à la technique RT-PCR, les chercheurs ont pu identifier les différents changements génétiques du virus (Afzal, 2020).

L'Algérie s'est intéressée aux techniques de biologie moléculaire depuis quelques années mais après être touchée par cette pandémie mondiale, ça encourage mieux leur utilisation pour d'autres maladies à des fins de diagnostic, de dépistage ou de recherche.

Dans ce contexte, ce mémoire propose d'établir un état des lieux de l'utilisation actuelle des différentes techniques de biologie moléculaire ayant été appliquées avec succès à de différentes problématiques de santé au niveau des CHU de l'Est algérien (CHU de Annaba et CHU de Constantine). Ces établissements ont intégré ces méthodes au diagnostic pour différentes pathologies génétiques, pathologies neuromusculaires, pathologies infectieuses virales, maladies cardiovasculaires et maladies métaboliques héréditaires.

Le présent travail est divisé en deux parties. La première, se résume en une recherche bibliographique portant sur des généralités au sujet de l'utilisation des outils de biologie moléculaire en clinique. La deuxième partie, décrit la méthodologie suivie pour établir un portrait de l'utilisation des techniques de biologie moléculaires dans les CHU de l'Est Algérien (Annaba et Constantine) ainsi que les résultats et conclusions obtenus.

Revue bibliographique

Chapitre I

Techniques de biologie moléculaire utilisées en médecine

1 Définition de biologie moléculaire

La biologie moléculaire est une science consacrée à l'étude des molécules supportant le message héréditaire (acides nucléiques ADN et ARN). Elle analyse, dans les molécules, la structure du génome et ses altérations (mutations) ainsi que les mécanismes de l'expression, normale et pathologique des gènes (**Ranjard et al, 2017**).

2 Outils de biologie moléculaire

2.1. Enzymes de restriction

Ce sont des endonucléases d'origine bactérienne, capables de couper l'ADN double brin après avoir reconnu des séquences spécifiques. Le site de reconnaissance est appelé : site de restriction. Elles permettent de cliver une molécule d'ADN en plusieurs fragments (**Laudenbach et al., 1999**).

Les enzymes de restriction de type 2 sont les plus utilisées en biologie moléculaire. Elles coupent dans la séquence selon deux modes :

- Coupures franches qui sont obtenus des extrémités franches par coupure au même endroit sur les deux brins.
- Coupures décalés sur les deux brins, elles sont générées des extrémités monocaténares (simple brin) ayant des séquences complémentaires appelés extrémités cohésives ou bouts collants (**Tagu et Moussard, 2005**).

Les utilisations des enzymes de restriction sont très nombreuses en biologie moléculaire. Elles permettent, par exemple, de fractionner l'ADN en multiples fragments susceptibles d'être séparés par les techniques d'électrophorèse. Les enzymes de restriction peuvent être utilisées pour préparer un fragment d'ADN d'un gène donné (insert) à être inséré dans un vecteur comme un plasmide. Les enzymes de restriction sont couramment utilisées pour rechercher des mutations dans le génome. Elles sont également utilisées pour rechercher dans l'ADN des cellules eucaryotes les méthylations de base (figure 1) (**Jfmadre, 2016**).

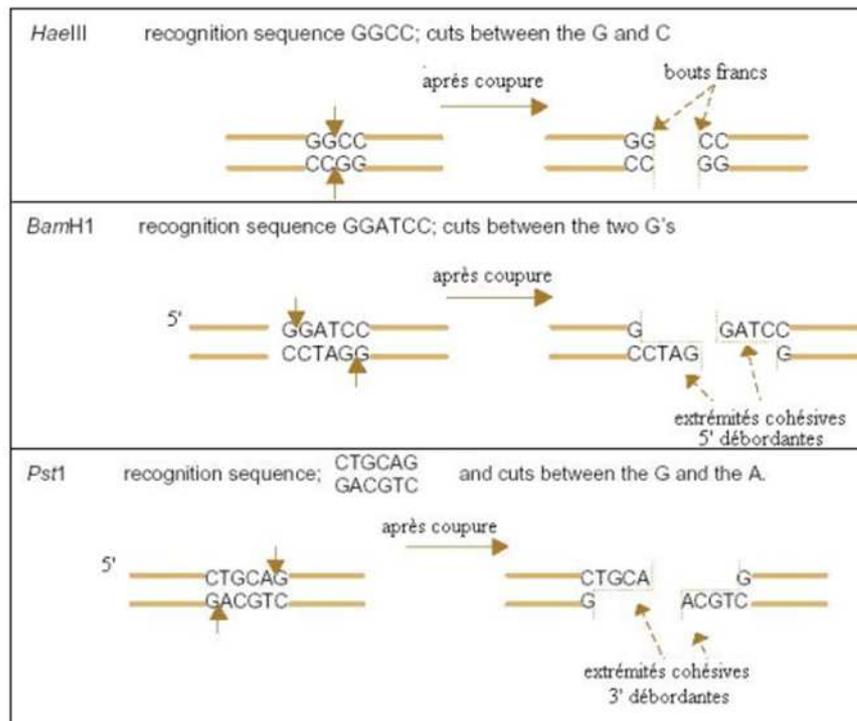


Figure : Action des enzymes de restriction sur les deux brins d'ADN (Jfmadre, 2016).

2.2. Nucléases ARNases et DNases

DNases

Leur fonction consiste à couper l'ADN au niveau d'un phosphate, libérant deux fragments, l'un se terminant par un 3'OH et l'autre par un 5' phosphate.

DNase I : enzyme bactérienne jouant un rôle annexe dans la réplication d'ADN et un rôle majeur dans sa réparation, elle possède un fragment de Klenow (une version modifiée) qui conserve l'activité ADN polymérique et exonucléasique (Kaplan et Delpech, 2007).

Nucléase S1 : elle dégrade l'ADN simple brin. Il est utilisé pour réduire la taille d'un fragment d'ADN en l'attaquant par ses extrémités (Nichols, 2011).

RNases

Ces nucléases coupent l'ARN. L'ARNase la plus utilisée pour la majorité des méthodes est l'ARNase H qui digère l'ARN dans un complexe ARN-ADN. Elle est utile pour éliminer l'ARN après avoir fabriqué un premier brin de ADNc à l'aide de la reverse transcriptase (Ecochard et al, 2011).

2.3 Polymérases

Les polymérases sont capables de lier entre eux une succession de nucléotides et de synthétiser ainsi un acide nucléique.

- Les ADN polymérases synthétisent le brin complémentaire d'une matrice (ADN monobrin) à partir d'une amorce (ARN ou ADN).
- La transcriptase inverse est une ADN polymérase ARN dépendante. Elle est employée pour produire des banques d'ADN dits complémentaire (ADNc) à partir des ARN extraits des cellules ou de tissus.
- La taq polymérase est une ADN polymérase extraite de bactéries stable à des températures très élevés.
- Les ARN polymérases sont capables de transcrire un des brins d'un ADN double brin (**Laudenbach, Mantz et Desmots, 1999**).

2.4 Ligases

La ligase catalyse la formation d'une liaison phosphodiester entre un 5'-phosphate d'un segment d'ADN et un 3'OH du segment précédent sur le même brin. Les ligases sont des enzymes qui jouent un rôle essentiel en biologie moléculaire et en génie génétique comme l'un des outils majeurs de production d'ADN recombinant (**Shuman, 2009**).

2.5 Vecteurs

Les vecteurs sont un des types de plasmides issus de construction génétique effectuée au laboratoire. Ils contiennent une région contenant des sites d'enzymes de restriction permettant d'insérer la séquence nucléotidique d'intérêt dans une bactérie, ou même des séquences comme celles qui confèrent, la résistance à un antibiotique. Le vecteur peut se répliquer dans le système récepteur et il doit le faire sans perturber le fonctionnement de l'hôte (**Swynghedauw et Jean- Sébastien, 2008**).

2.5.1 Les plasmides

Les plasmides sont de petits fragments d'ADN circulaire double brin trouvés dans certaines bactéries en dehors du chromosome. Un plasmide porte un ensemble de gènes permettant sa propre répllication et fréquemment des gènes de résistance aux antibiotiques qui apporte un avantage aux bactéries qui les contiennent (figure 2) (**Étienne et Clauser, 2004**).

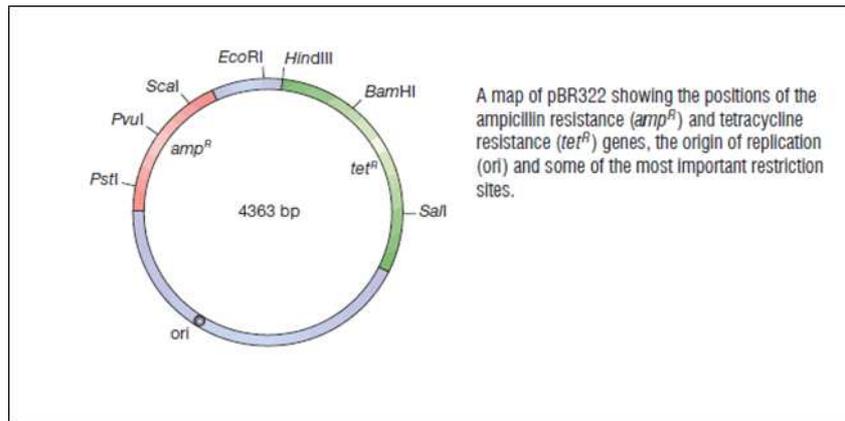


Figure : pBR322 un exemple de plasmide vecteur (Brown, 2010).

2.5.2 Phages

Ce sont des virus qui n'infectent que les bactéries. Le phage le plus utilisé en biologie moléculaire est le phage λ qui est un des modèles de laboratoire au même titre que la souris et la drosophile (Hainque et al., 2008). C'est un bactériophage infectant la bactérie *E.coli*. C'est un virus à ADN double brin, linéaire avec à ses deux extrémités simple brin complémentaires (extrémité cohésives ou cos). Il est sujet à deux cycles lytique qui conduisent à la réplication rapide du virus et à la mort de la cellule hôte, et le cycle lysogénique où il s'insère de manière dormante dans le génome de la bactérie et se réplique en même temps avec le génome de la cellule hôte (Biacchesi, 2017).

2.5.3 Chromosomes

Plusieurs chromosomes peuvent être utilisés comme vecteur. Les chromosomes artificiels contiennent les plus gros morceaux d'ADN. Il s'agit notamment des chromosomes artificiels de levure (YAC), des chromosomes artificiels bactériens (BAC) et des chromosomes artificiels du bactériophage P1 (PAC). Ils sont utilisés pour contenir des longueurs d'ADN de 150 kb à 2000 kb. Les YACS contiennent la plus grande quantité d'ADN, jusqu'à environ 2000 kb (Schalkwyk, 2006).

1.1 Sondes nucléiques

Les sondes sont des fragments d'ADN ou d'ARN dont la séquence est connue et utilisés pour la détection spécifique de séquences cibles. Ce sont des outils qui servent à identifier des fragments d'ADN ou d'ARN présents parmi des milliers d'autres en confectionnant des hybrides spécifiques et quantifiables. Le concept de sonde repose sur le principe selon lequel une séquence de nucléotides donnée s'apparie spécifiquement à la séquence complémentaire. Cet appariement se fait au moyen de liaisons hydrogène qui

peuvent être rompues par des moyens physiques (figure 3) (Swynghedauw et Silvestre, 2008).

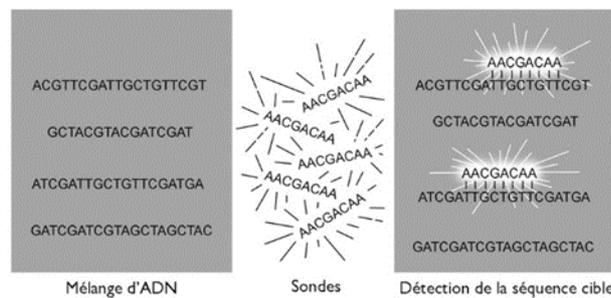


Figure : Sondes nucléiques (Bordeur et al, 2006).

3 Techniques de biologie moléculaire

Les méthodes d'extraction des acides nucléiques sont essentielles à la biologie moléculaire et sont couramment utilisés dans de nombreuses applications des sciences médicales et biologiques (exemples étude de cancer, science des médicaments, diagnostic des maladies, diabétologie, infectiologie, neuropathologie, épidémiologie, hépatologie, cardiologie,..) (Perron, 2007).

Les étapes majeures de l'extraction de l'ADN ou ARN sont :

- **Lyse cellulaire :** par un détergent qui permet la lyse des cellules en dissolvant les membranes cellulaires et en débarrassant l'ADN d'une partie de protéines liées, il est ainsi libéré.
- **Isolement de l'ADN ou l'ARN :** sur colonne de silice ou par centrifugation différentielle.
- **Purification :** élution de la colonne après élimination des protéines et autres contaminants.
- **Contrôle qualité (optionnel) :** dosage par spectrophotométrie ou visualisation du profil électrophorétique sur gel d'agarose (Douablin, 2017).

3.1 Amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La PCR (*Polymerase Chain Reaction*) est, depuis sa mise au point en 1985 par Saiki et ses collaborateurs, la technique de base de la biologie moléculaire : elle permet à la fois de cibler le ou les fragments que l'on veut étudier. Elle est utilisée dans tous les types d'application. La technique de PCR permet d'obtenir des copies multiples d'ADN à partir de quelques molécules d'ADN dites matrice à l'aide de la Taq polymérase. Cette

technologie a donné lieu à de très nombreuses techniques de biologie moléculaire fournissant aussi bien des informations qualitatives que quantitatives lorsque l'ADN est en quantité trop faible pour être analysé ou utilisé dans des réactions d'hybridation avec des sondes nucléotidiques **(Delpech, 2021)**.

Le principe de la PCR est basé sur le choix des amorces oligonucléotidiques synthétiques capables de s'hybrider aux bornes de la séquence à amplifier et réaliser la réplication qui assureront la multiplication de la séquence encadré par les amorces **(Kaplan et Delpech, 2007)**.

La PCR est une réaction cyclique et chaque cycle comprend les 3 étapes suivantes (figure 4) :

- dénaturation de l'ADN par chauffage à 95°C
- hybridation des amorces oligonucléotidiques
- synthèse du brin complémentaire par la Taq polymérase (figure 4) **(Uhel et Zafrani, 2019)**.

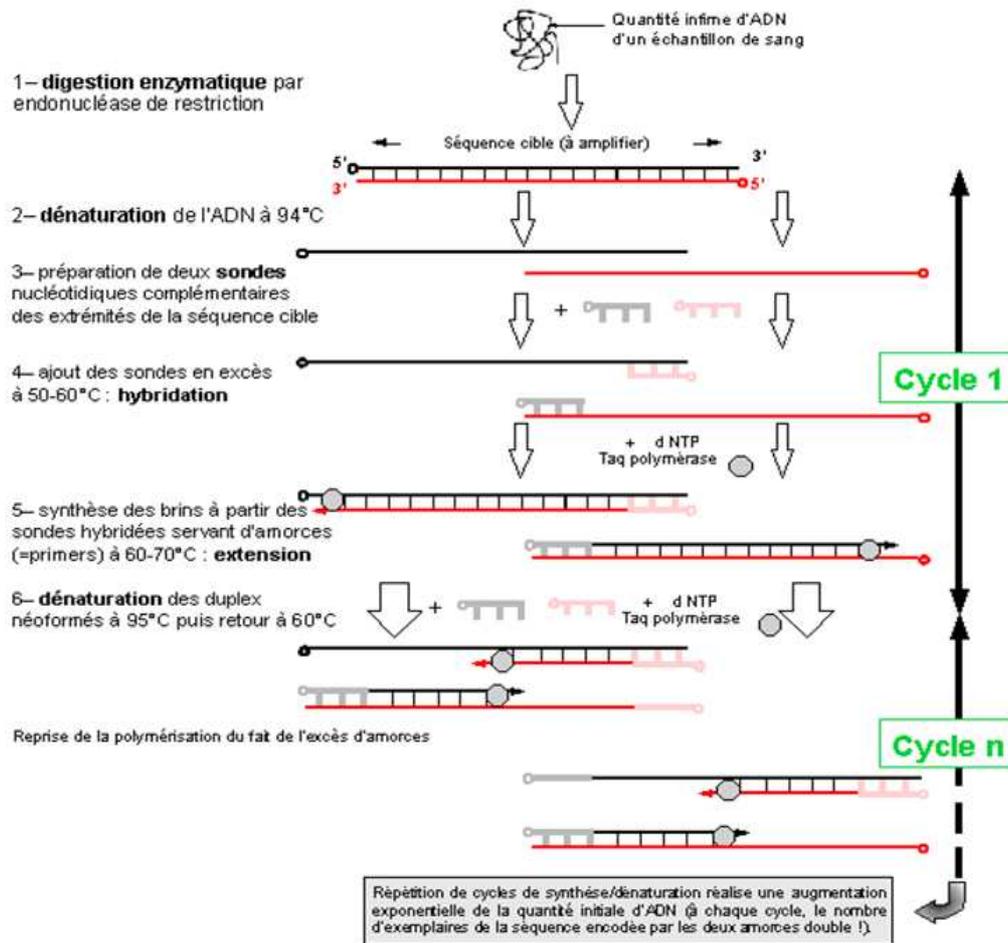


Figure : Technique de PCR classique (Gill et Ghaemi, 2008).

Par sa simplicité et sa rapidité, la PCR a rapidement trouvé de nombreuses applications cliniques tels que : le diagnostic précoce des infections bactériennes, virales ou fongiques : détection de *Mycobacterium tuberculosis* dans les prélèvements respiratoires, diagnostic et suivi thérapeutique des infections virales (VIH, hépatites, CMV...) ; diagnostic des endocardites infectieuses à hémocultures négatives. La PCR sur tissu valvulaire (en particulier la PCR dite « universelle » du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S) permet d'obtenir une documentation microbiologique dans plus de 60 % des cas (Liesman et al, 2017), la détection de plusieurs séquences en une seule réaction (PCR multiplex) constitue la dernière avancée majeure de la technique. Le panel FilmArray méningite/encéphalite permet par exemple de rechercher en moins d'une heure 14 pathogènes responsables de méningoencéphalites sur un volume de 200 µl (soit quatre gouttes) de liquide céphalorachidien (Leber et al, 2016).

3.2 Séquençage

Le séquençage de l'ADN constitue une méthode dont le but est de déterminer la succession linéaire des bases A, C, G et T prenant part à la structure de l'ADN. La lecture de cette séquence permet d'étudier l'information biologique contenue par celle-ci. Étant donné l'unicité et la spécificité de la structure de l'ADN chez chaque individu, la séquence de l'ADN permet de nombreuses applications dans le domaine de la médecine, comme, par exemple, le diagnostic, les études génétiques, l'étude de paternité, la criminologie, la compréhension de mécanismes physiopathologiques, la synthèse de médicaments, les enquêtes épidémiologiques (Lamoril et al, 2008).

Le principe du séquençage consiste à synthétiser un fragment de l'ADN que l'on souhaite séquencer à partir d'une sonde-amorce dont une extrémité est marquée et à interrompre de façon aléatoire cette synthèse au moyen de ddTTP, ddATP, ddCTP et ddGTP marqués. De simples électrophorèses permettront de lire la séquence comme indiqué. La méthode est automatisée, elle permet des recouvrements et des alignements de séquence. Les résultats en sont généralement rendus sous forme de courbes de couleur différentes, chaque courbe correspondant à une base (figure 5) (Swynghedauw et Silvestre, 2008).

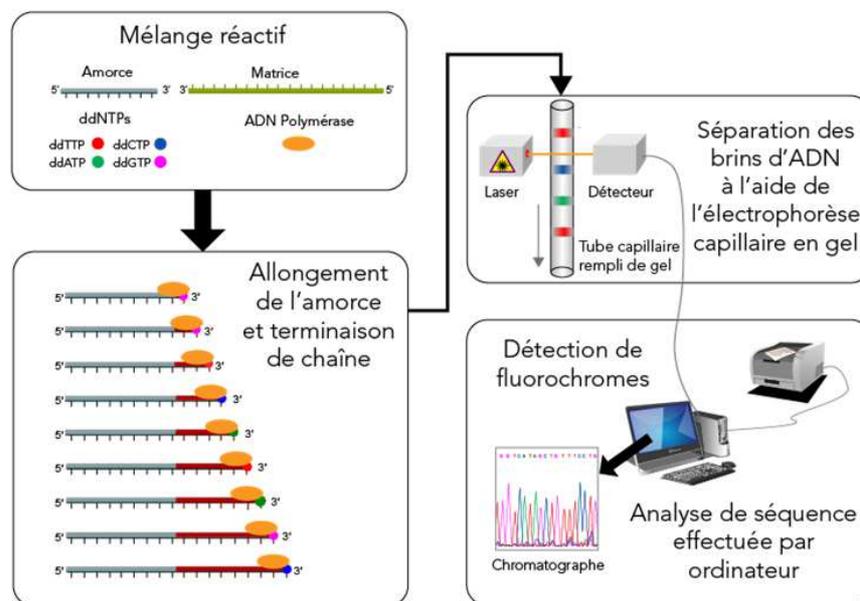


Figure : Technique de séquençage (Furelaud, 2004).

L'application de séquençage est impliquée par le NGS (*next-generation sequencing*) qui est utile au diagnostic des maladies d'origine génétique. Selon la pathologie ciblée, il

est possible de séquencer un groupe de gènes précédemment identifiés (maladies épileptiques héréditaires par exemple), l'exome (l'ensemble des exons) ou bien le génome entier (Adams, 2018). Le reséquençage des génomes humains permet d'étudier l'impact des polymorphismes génétiques sur la santé à l'échelle des populations ou sur la réponse immunitaire à l'échelle cellulaire (*projet Human Functional Genomics*) (Li et al, 2016). Le NGS constitue enfin la pierre angulaire de la métagénomique appliquée à la clinique (séquençage des micro-organismes présents dans un échantillon biologique dans un but diagnostique) ou l'étude des microbiotes (écosystème des micro-organismes qui colonisent différents compartiments de l'organisme) et est en passe de révolutionner la microbiologie (Ruppé et al., 2018 ; Pendleton et al, 2017).

3.3 Hybridation moléculaire

L'hybridation moléculaire permet de repérer ou de rechercher une molécule d'ADN ou d'ARN spécifique dans une population hétérogène. Le principe est de marquer par un traceur radioactif ou chimique la séquence d'ADN connue et purifiée que l'on veut repérer dans une population. Ce fragment monocaténaire marqué constitue la sonde. Les molécules cibles rendues monocaténaires (population hétérogène d'acides nucléiques dénaturés) sont au préalable fixées sur une membrane d'hybridation en nylon ou en nitrocellulose (Tagu, et Moussard, 2003).

3.3.1 Différentes techniques d'hybridation

3.3.1.1 Southern blotting

La première étape de l'analyse par transfert de *Southern* implique une digestion enzymatique de l'ADN à analyser en utilisant une ou plusieurs endonucléases de restriction qui reconnaissent et coupent des séquences d'ADN courtes spécifiques. Il en résulte un nombre discret de fragments d'ADN de différentes tailles. Au cours de la deuxième étape du procédé, les fragments d'ADN obtenus par digestion de restriction sont séparés par électrophorèse dans un gel d'agarose. Après séparation, les fragments d'ADN sont dénaturés et transférés sur un support solide tel qu'une nitrocellulose ou une membrane en nylon, par capillarité ou électrophorèse. Les fragments d'ADN sont ensuite étroitement liés et fixés à la membrane, typiquement par irradiation UV ou chaleur, puis hybridés avec une ou plusieurs sondes (Maréchal, 2007).

Les sondes utilisées dans les analyses *Southern blot* peuvent être radioactives ou marquées par une enzyme. Après la préhybridation, les sondes sont ensuite appliquées sur

la membrane. La sonde sélectionnée est généralement un fragment d'ADN (ou d'ARN) avec une séquence nucléotidique spécifique complémentaire de la séquence à détecter. L'hybridation est suivie de plusieurs lavages, qui sont effectués avec des tampons d'astringence différente. La séquence cible doit alors apparaître sous forme de taches sombres sur la membrane de nitrocellulose ou de nylon (non radioactive, non chimioluminescente) ou sur le film radiographique (sonde radioactive ou chimioluminescente), et doit correspondre à la taille moléculaire attendue du fragment d'ADN (figure 6) (Elliott et Jacobson, 2007).-

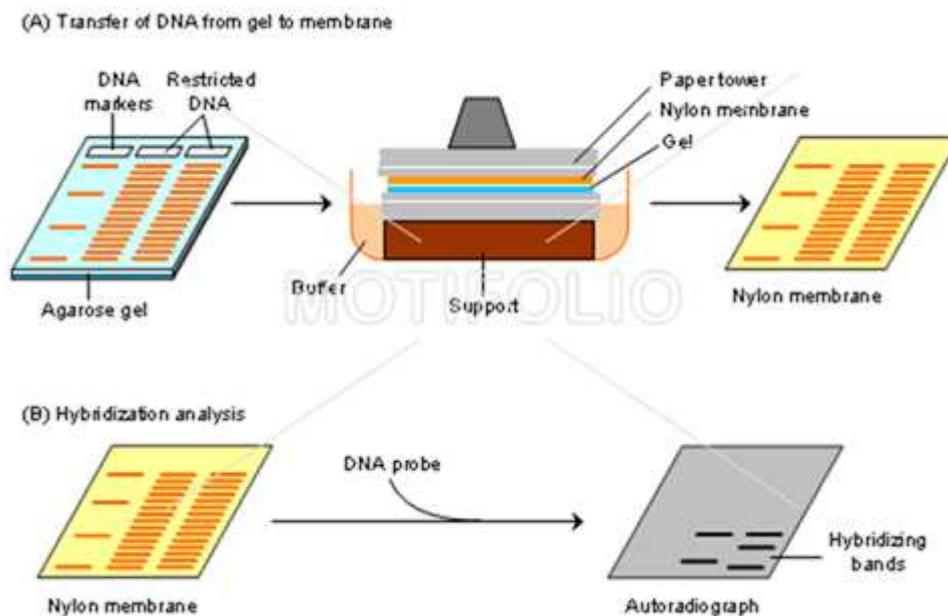


Figure : Technique de *southern blot* (Akbar, 2017).

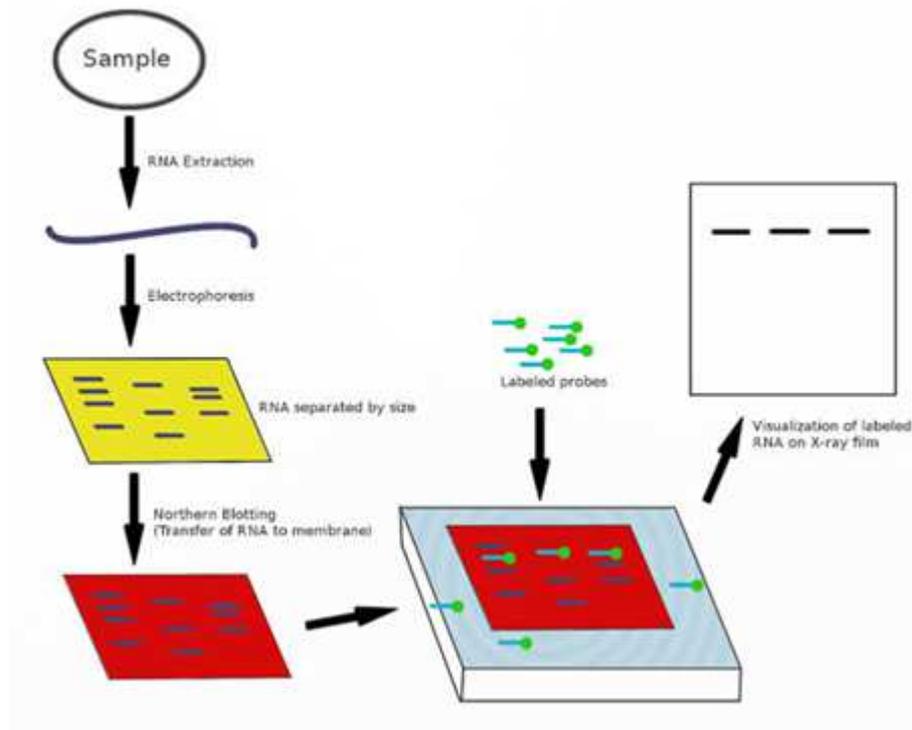
Afin d'illustrer cette technologie par un diagnostic, nous prendrons l'exemple pratique de la drépanocytose. Il s'agit d'une maladie héréditaire entraînant la formation d'une hémoglobine anormale, l'hémoglobine S, responsable de la falciformation des hématies lorsque l'oxygénation diminue. Sur le plan moléculaire, une mutation ponctuelle sur le 6^e codon du gène de la β -globine est responsable de cette anomalie. Une molécule d'adénine est remplacée par une molécule de thymine conduisant au niveau protéique. Principe : la mutation est directement utilisée pour le diagnostic. Plusieurs enzymes de restriction reconnaissent de façon spécifique l'ensemble des codons 5-6-7, et ne peuvent plus exercer leur effet si le codon 6 est muté. (Cheriyedath, 2019).

En plus, Le transfert de Southern a de nombreuses applications de recherche et cliniques. Par exemple, la technique est utilisée en clinique diagnostic moléculaire de la

dystrophie myotonique. Le désordre est causée par l'expansion anormale d'une région du trinuécléotide CTG se répète dans le gène DMPK. Les individus non affectés ont 5 à 35 copies de la répétition CTG, tandis que les individus affectés peuvent avoir plusieurs milliers d'exemplaires. Un nombre normal ou légèrement agrandi de répétitions est détecté par PCR. Le nombre de répétitions dans un allèle avec une grande expansion est déterminé par la taille des bandes sur un Southern blot (**Barden, 2013**).

3.3.1.2 Northern blotting

Les northern blots sont également basés sur l'hybridation d'acide nucléique. La différence est que l'ARN est la cible d'un transfert Northern. La dénaturation est inutile, mais tout le reste de la technique est similaire au *Southern blot* (**Étienne et Clauser, 2004**). La sonde pour un transfert de Northern est soit un fragment d'un gène, soit un oligonucléotide unique. Les Northern blots commencent par séparer l'ARNm par taille en utilisant l'électrophorèse. L'ARNm est transféré sur une membrane en nylon et incubé avec une sonde marquée monocaténaire. Comme précédemment, la sonde peut être marquée avec de la biotine, de la digoxigénine ou de la radioactivité. La membrane est traitée et exposée à un film ou à un substrat chromogène. Ici, l'échantillon cible n'est pas séparé par taille. La cible d'ARNm est simplement attachée à la membrane de nylon sous la forme d'un petit point (figure 7) (**Clark. Nanette et Pazdernik, 2009**).



Technique de *Northern blot* (Shan, 2013). **Figure :**

3.3.1.3 Hybridation *in situ* en fluorescence (FISH)

L'hybridation *in situ* en fluorescence est une méthode d'analyse du génome très éclectique puisqu'elle peut s'appliquer aussi bien aux noyaux interphasiques qu'aux préparations chromosomiques. En outre, elle permet de cibler des chromosomes entiers, des régions chromosomiques spécifiques (centromères). On parle d'hybridation *in situ* quand l'expérience d'hybridation est faite directement sur des préparations cytogénétiques ou cytologiques sans que l'architecture du chromosome ou de la cellule ne soit modifiée (Nachimuthu, Ponnusamy, 2011).

Le principe de FISH est fondé sur la propriété de réassociation spécifique des acides nucléiques. Une sonde dénaturée (ADN simple brin marqué) en solution peut s'hybrider spécifiquement avec sa séquence cible (préparation chromosomique dénaturée) grâce à la complémentarité des bases nucléotidiques. La sonde s'apparie par des liaisons hydrogène établies selon les critères de Watson et Crick. Les hybrides infidèles et les molécules de sonde non hybridées sont éliminés par lavages, puis les hybrides spécifiques sont révélés, en général par immunodétection et enfin l'observation s'effectue grâce à un microscope à épifluorescence (Delobel, 2014). Cette méthode permet de visualiser simultanément plusieurs sondes différentes marquées par des fluorochromes différents. Les résultats sont obtenus en quelques heures, au lieu de plusieurs semaines pour l'hybridation *in situ*

radioactive. Il est possible de visualiser par FISH des cibles uniques de l'ordre de quelques kilobases en utilisant des petites sondes. Par rapport au marquage radioactif, en plus de la sécurité, de la stabilité du marquage dans le temps et de la commodité de détection, la FISH offre une résolution spatiale incomparable. Celle-ci est telle que l'on peut aisément distinguer le marquage d'un gène sur deux chromatides sœurs (figure 8) (Kaplan et Delpech, 2007).

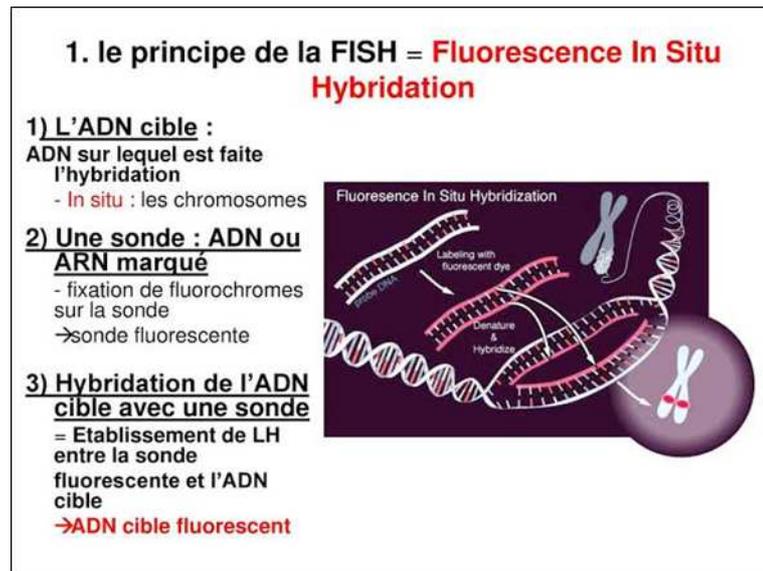


Figure : Technique d'hybridation *in situ* en fluorescence (*FISH*) (Raymond, 2018).

Pour l'application de *FISH* dans la clinique on a : la phylogénie qui est l'étude des remaniements chromosomiques ; établissement d'un arbre phylogénétique selon les homologies de séquences. L'arbre phylogénétique de séquences est donc une proposition parmi d'autres arbres phylogénétiques dont les informations peuvent être complémentaires ou très différentes, Etude de l'évolution des caryotypes avec le "chromosome painting" en plus CTs (chromosome territories) par la détection de la position spécifique des chromosomes en interphase dans le noyau. Diagnostics cytogénétiques mise en évidence de maladies génétiques (trisomies, tumeurs...) (Zanardil et al, 2010).

3.4 Clonage

La possibilité de cloner un gène c'est-à-dire d'isoler et d'amplifier des millions de fois la séquence d'ADN responsable du caractère étudié est à la base de la génétique moléculaire, elle est notamment une méthode essentielle à la progression de connaissance sur le génome humain .Cloner une séquence d'ADN consiste à l'intégrer dans un vecteur, de façon à pouvoir l'amplifier et la conserver à des fins expérimentales (figure 9) (Bême, 2014).

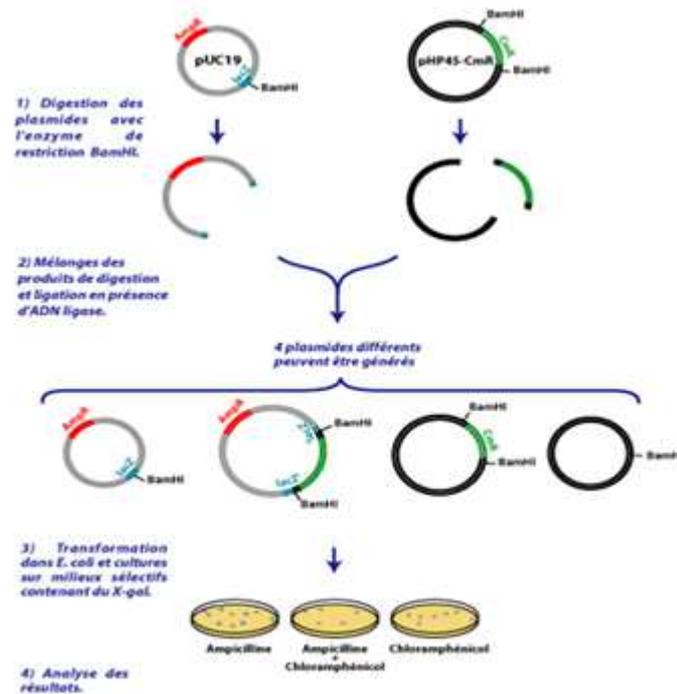


Figure : Technique de clonage moléculaire de gène CmR dans le plasmide pUC19 (Perez, 2005).

Le vecteur est lui-même une séquence d'ADN, dont la fonction est d'incorporer la séquence que l'on souhaite cloner, puis d'autoriser sa multiplication dans une cellule hôte. (Laudenbach et al., 1999). Un clonage est la sélection d'un clone parmi un ensemble de clones bactériens recombinants qui porte le nom de banque. Il en existe en deux grandes catégories principales : les banques génomiques et les banques d'ADNc (Kaplan et Delpech 2007).

L'application de clonage en clinique permet de reconstituer un embryon qui, une fois transplanté dans une femelle receveuse, pourra se développer à terme. L'importance de la question éthique soulevée par la perspective d'application de cette technique à l'homme a rapidement conduit à distinguer le clonage reproductif aboutissant à la naissance d'un jeune, du clonage non reproductif dit « clonage thérapeutique » se limitant à la production de cellules embryonnaires. Le recours au clonage reproductif humain fait maintenant l'objet d'une désapprobation quasi unanime dans le monde. Une nouvelle phase commence désormais pour essayer de comprendre la nature des mécanismes moléculaires et cellulaires mis en œuvre. Vu leur complexité, un long chemin reste à parcourir avant que le clonage thérapeutique puisse éventuellement devenir une réalité (Longeaux, 2010).

3.5 Mutagenèse dirigée

La mutagenèse dirigée a pour objet de muter une séquence d'ADN à un endroit précis. Un exemple de mutagenèse dirigée simple consiste à éliminer un site de restriction donnant des extrémités cohésives dans un plasmide. Le plasmide est ouvert au site de coupure où est ajoutée une polymérase (dépourvue d'activité 5'3' exonucléase) et des dNTP. Une ligation des extrémités devenues franches est ensuite effectuée. Dans cette méthode, généralement 2 ou 4 nucléotides sont ajoutés ou retirés. Le cadre de lecture est donc modifié et doit être pris en compte si l'expérimentation a pour but de produire une protéine (Ecochard et al., 2011).

Des mutations sont introduites dans un site bien déterminé de l'ADNc cloné correspondant. La protéine est exprimée, puis les propriétés des formes sauvage et mutée de la protéine sont comparées. Ces approches ont permis une véritable dissection moléculaire de la fonction d'un grand nombre de protéines (enzymes, récepteurs, facteurs de transcription, etc.) (Figure 10) (Étienne et Clauser, 2004).

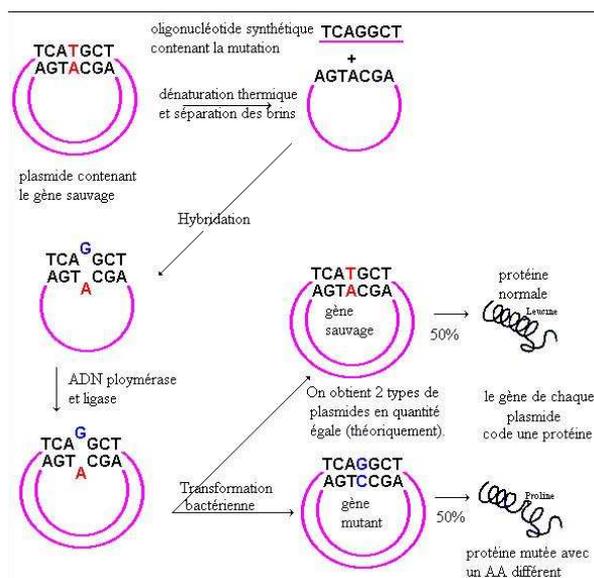


Figure : Mutagenèse dirigée en un site précis (Foucher, 2020).

3.6 ADN micro-arrays

Une puce à ADN, aujourd'hui appelée « *DNA microarray* », est constituée de fragments d'ADN immobilisés sur un support solide selon une disposition ordonnée. Son fonctionnement repose sur le même principe que des technologies telles que le *Southern blot* ou le *northern blot*. (Nicolas, 2004).

La puce à ADN utilise le principe qui consiste à cohybrider une même quantité d'ADN d'un patient et d'un témoin contrôle, marqués chacun par un fluorochrome de couleur différente, sur un réseau de séquences d'ADN (puce à ADN) représentant l'entier du génome. La lecture des signaux fluorescents est réalisée grâce à un scanner laser automatisé (figure 11) (Ferrarini et al., 2010).

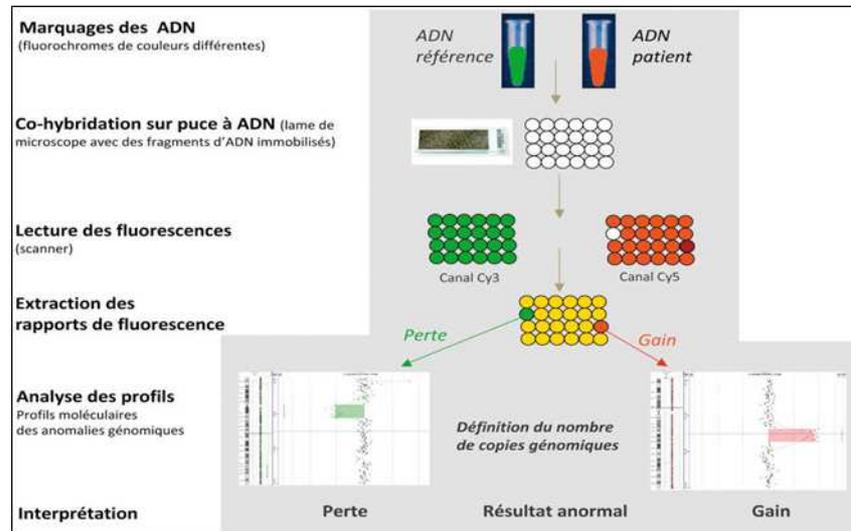


Figure : Technique des puces d'ADN (*micro-arrays*) (Ferrarini et al., 2010).

Pour l'application les données générées par biopuces sont particulièrement adaptées à la découverte de nouveaux processus physiopathologiques ou à la recherche de biomarqueurs. Par exemple, en comparant les profils transcriptomiques leucocytaires sanguins de patients atteints de pneumonie à ceux de patients admis en réanimation avec une présentation clinique semblable mais sans infection, il a été possible de découvrir une signature de 78 gènes spécifiques du diagnostic de pneumonie et d'identifier le ratio d'expression génique (Scicluna et al., 2015). Une approche similaire a permis de mettre au point le test moléculaire SeptiCyte LAB qui mesure simultanément le niveau d'expression des gènes, permettant de distinguer les patients admis en réanimation pour un sepsis des patients admis pour un syndrome de réponse inflammatoire systémique d'origine non infectieuse. Des études ciblant le transcriptome leucocytaire au cours du sepsis ont également permis d'identifier des sous-groupes (endotypes) de patients présentant, malgré des caractéristiques cliniques similaires, des profils d'expression génomiques particuliers (Mchugh et al., 2015).

1 Intérêt de la biologie moléculaire dans la médecine

1.2 Diagnostic des maladies

La biologie moléculaire a fortement contribué à réviser les données épidémiologiques en proposant de mettre en évidence l'identification d'un nouveau gène par exemple des virus difficiles (tels que le COVID19, la recherche des ARN des virus VIH, VHC et VHB, des maladies rares héréditaires...), impossibles à identifier par les méthodes classiques de culture virale ou de recherche des antigènes viraux dans les prélèvements biologiques (**Borde et al., 2009**).

Un autre exemple de diagnostic concerne la drépanocytose, qui utilise l'électrophorèse de l'hémoglobine à partir d'un prélèvement du sang comme technique de diagnostic et qui reste toujours efficace. Actuellement, les techniques de biologie moléculaire permettent de réaliser simplement ce diagnostic par PCR de l'exon 1 du gène de l'hémoglobine puis caractérisation de la mutation par digestion par une enzyme de restriction ou séquençage (**Clauser et Conchon, 2004**).

D'autre part, la biologie moléculaire a permis l'identification des individus par le génotype à partir des traces d'ADN (empreintes, cheveux...), ou par comparaison avec l'ADN de ses proches, l'opération consiste à amplifier l'ADN puis à en découper les zones contenant certaines séquences bien particulières d'ADN répétitif (**Lecomte, 2015**).

En plus, dans l'Archéogénétique, les techniques de biologie moléculaire ont permis l'étude du passé humain par l'analyse d'ADN ancien récupéré à partir des restes archéologiques (**Forster et Renfrew, 2006**).

1.3 Dépistage de maladies

~~1.3.1~~ Trisomie 21

C'est l'anomalie chromosomique viable la plus fréquente chez l'homme, sa prévalence est estimée entre 1,4 et 2 pour 1000 grossesses (**Chelli et al., 2008**). Elle représente la principale cause génétique de retard mental et elle est à l'origine d'un handicap social important (**Sherman et al., 2007**). Le diagnostic anténatal de la trisomie 21 par la technique FISH est possible. Cette technique permet un diagnostic rapide, en moins de 48h, de la trisomie 21 sur une faible quantité de liquide amniotique d'environ 4 ml. Elle offre aux couples l'avantage de prendre, dans des délais raisonnables, la décision qui leur convient concernant la poursuite ou non de la grossesse. Elle permet souvent, avec un résultat

normal, de rassurer rapidement les femmes enceintes trop angoissées (**Lamzouri et al., 2012**).

~~1.3.2~~—Le cancer colorectal

Le développement des techniques de biologie moléculaire, leur possible automatisation pour le traitement de grandes séries d'échantillons, et l'identification de nombreuses altérations moléculaires spécifiques des cellules tumorales coliques ont été à l'origine de la conception de tests fondés sur la détection d'altérations génétiques spécifiques de tumeurs dans les selles des sujets. Ces altérations génétiques, utilisées comme marqueur, témoignent de la présence de cellules tumorales dans la lumière colique. Leur utilisation est néanmoins encore limitée par la nécessité de développer des techniques de biologie moléculaire suffisamment sensibles afin de permettre la mise en évidence d'un génome muté parmi de nombreux génomes normaux. Le marqueur moléculaire idéal serait une altération fréquente, précoce et spécifique qui permettrait de dépister un grand nombre de sujets et de diagnostiquer les stades précancéreux. Des mutations des gènes KRAS, TP53 et APC (adenomatous polyposis coli) ont été caractérisées, montrant la faisabilité de telles études. Cependant, des mutations de KRAS sont retrouvées dans le cadre de maladies non tumorales et leur utilisation comme marqueur diminue la spécificité du test (**Blons, 2002**).

~~1.3.3~~—Papillomavirus (HPV)

Ce sont des virus à ADN double brin, sont à l'origine de nombreuses pathologies cutanéomuqueuses, bénignes ou malignes, allant des plus communes telles que les verrues vulgaires à des néoplasies touchant les voies aérodigestives supérieures et la sphère anogénitale. Le diagnostic de l'infection à HPV repose essentiellement sur la détection du génome viral par biologie moléculaire compte tenu du caractère difficilement cultivable en routine de ces virus. La tendance actuelle de la part des sociétés scientifiques est d'améliorer la sensibilité du dépistage avec de nouvelles méthodes et de proposer de nouveaux algorithmes de décision diagnostique et thérapeutique. Il existe deux grands types de techniques utilisables sur les prélèvements cervico-utérins : des techniques d'hybridation en phase liquide et des techniques d'amplification génique ou Polymerase Chain Reaction (PCR). Des techniques de génotypage ont également été développées : elles reposent sur une technique d'amplification suivie d'une hybridation avec des sondes spécifiques de type. En complément du dépistage et du génotypage, des techniques

permettent la détection quantitative de l'ADN viral d'un type donné d'HPV et ainsi de suivre l'évolution de la charge virale au cours du temps (**Eide et Debaque, 2012**).

1.4 Domaine de recherche à visée thérapeutique

La technologie en biologie moléculaire a évolué ces dernières années vers des techniques qui fournissent, d'une part, une information de plus en plus globale sur exome ou génome et non plus ciblée sur une fraction de gène et d'autre part, elle fournit une meilleure résolution de : pharmacologie, identification des maladies monogéniques, cancers, maladies infectieuses et cardiovasculaires et étude de polymorphismes par exemple la mutation d'une seule base (*single nucleotide polymorphism*) (**Bourde-Vac her et al., 2016**).

La thérapie génique est l'exemple d'un domaine de recherche ayant abouti à une approche thérapeutique destinées aux maladies monogéniques délivrant aux cellules un gène sain capable de suppléer le gène malade, ce qui a constitué la première stratégie de thérapie génique (**Wilson- JM, et al., 2008**).

Il existe encore d'autres stratégies de thérapie génique telles que la modification de l'ARN pour obtenir une protéine fonctionnelle. Cela nécessite l'injection de petits oligonucléotides anti-sens qui se fixent sur l'ARN messager transcrit à partir du gène muté et en modifient l'épissage, une étape importante avant sa traduction en protéine (exemple de maladie de Duchenne causée par des mutations dans le gène de la dystrophine) (**tremblay, 2015**). Comme autre stratégie, citons l'utilisation de virus oncolytiques génétiquement modifiés qui infectent spécifiquement les cellules tumorales qu'ils détruisent (exemple de cancer, le mélanome (**Szelechowski et Saïb, 2005**)). Une dernière stratégie est utilisée pour certaines pathologies complexes où il n'y a pas un gène unique à réparer ou à remplacer. La produire des cellules thérapeutiques par thérapie génique peut donner naissance à des cellules qui possèdent de nouvelles propriétés thérapeutiques (exemple de des lymphocytes CAR T) (**Catros, 2019**).

Par ailleurs, la nouvelle technologie où la biologie moléculaire participe fortement à son développement est le laboratoire sur puce. C'est un dispositif intégré rassemblant, sur un substrat miniaturisé, une ou plusieurs fonctions de laboratoire, ces puces sont développées pour l'étude des molécules et des macromolécules biologiques. Les applications visées en recherche et développement sont le diagnostic clinique et la recherche pharmaceutique (**Hejazian et al., 2015**).

Chapitre II

La médecine avant et après avènement de la biologie moléculaire

Avant de parler de ce que la biologie moléculaire a apporté au diagnostic des maladies, une classification des différentes maladies s'impose, on peut distinguer les maladies génétiques, les maladies métaboliques, infectieuses et les maladies cardiovasculaires.

1 Maladies génétiques

Les maladies génétiques sont des pathologies dues à des anomalies des gènes ou des chromosomes. Certaines anomalies génétiques peuvent être transmises à la descendance ; ces maladies génétiques sont alors des maladies familiales. Ce sont des maladies rares qui peuvent se manifester à la naissance, ou parfois plus tardivement au cours de la vie. On estime qu'il existe 8 000 à 10 000 maladies génétiques (**Vasseur, 2011**).

1.5 Mucoviscidose

~~1.5.1~~ Définition

Cette maladie nommée également fibrose kystique est héréditaire récessive à transmission autosomique caractérisée par une viscosité anormale du mucus que sécrètent les glandes intestinales, pancréatiques et bronchiques (**Morin, 2002**). Elle est l'une des maladies génétiques les plus fréquentes à issue fatale chez la population de race blanche. Sa fréquence varie selon l'origine géographique et ethnique des patients, elle serait en Europe de l'ordre de 1 sur 3000 à 5000 naissances, plus faible dans les populations noires, asiatiques et arabes (**Costes, 1996**). Son incidence exacte en Algérie est inconnue en raison d'un manque d'études. Le gène CF (*cystic fibrosis*) de cette maladie a été identifié en 1989 par l'équipe de L.C. Tsui par le clonage positionnel non orienté (**Kaplan et Delpech, 2007**).

Cette maladie est liée à une anomalie du gène CF codant pour la protéine CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) porté par le chromosome 7, cette protéine est présente dans la membrane des cellules de différentes muqueuses (respiratoire, digestive). Elle fonctionne comme un canal qui permet l'échange d'ions de chlorures entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. Lorsque son gène est muté, le canal dysfonctionne. (**Férec, 2021**). La mutation la plus fréquente (70 %) est une délétion de trois nucléotides entraînant l'absence d'une acide aminée phénylalanine, normalement situé en position 508 sur la protéine CFTR (d'où la désignation symbolique DF508). Plus de 1000 mutations du gène CF ont maintenant été caractérisées. Les mutations du gène CFTR sont classées en fonction du mécanisme par lequel elles peuvent causer une perte de fonction de CFTR totale ou partielle (**Rault et al., 2008**).

1.5.2— Moyens de diagnostic avant avènement de biologie moléculaire

Le diagnostic de la mucoviscidose se fait par le test de la sueur mesure la quantité de sel (essentiellement le chlore) dans la sueur. C'est un test rapide, indolore. Chez ces sujets atteints, il est positif dès la naissance et durant toute la vie. Enfin, il n'y a pas de rapport direct entre les valeurs du test et la gravité de l'affection (**Bellon et Desmazes-Dufeu, 2006**).

La transpiration est provoquée à l'aide d'un courant électrique de très faible intensité et de substances qui favorisent la transpiration, via une sorte de compresse posée à même la peau. Une sorte de buvard est ensuite appliqué sur la même zone et la sueur est récoltée pendant une demi-heure. L'échantillon est ensuite envoyé en laboratoire pour analyse. Dans plus de 95% des cas, le taux de chlore dans la sueur est très largement supérieur à la moyenne (**Leblanc, 2021**).

1.5.3— Moyens de diagnostic après avènement de biologie moléculaire

Les mutations du gène CFTR peuvent être recherchées par différentes technologies. Les trousse de diagnostic commercialisées permettent la détection des mutations les plus fréquentes (entre 20 et 36 mutations selon la trousse utilisée), couvrant environ 80 % des mutations responsables de mucoviscidose. Le séquençage de Sanger permet le criblage de la totalité de la séquence codante du gène CFTR et offre une meilleure détection de l'ensemble des mutations de ce gène. La technologie demeure, cependant, lourde et onéreuse. Les techniques de séquençage de nouvelle génération (NGS) permettent une analyse plus sensible, rapide et à moindre coût, de la totalité du gène CFTR, en comparaison aux techniques de référence telles que le séquençage de Sanger (**Elmouatassim, 2013**).

1.6 Syndrome de Prader-Willi (SPW)

1.6.1— Définition

C'est une maladie génétique rare, décrite pour la première fois en 1956 par Prader, Labbhart et Willi qui se caractérise par un dysfonctionnement hypothalamohypophysaire associé à une hypotonie majeure pendant la période néonatale et les deux premières années de vie, puis de l'enfance à l'âge adulte.

Les problèmes principaux sont l'apparition d'une hyperphagie avec le risque d'obésité morbide, des difficultés d'apprentissage et des troubles du comportement voire des troubles psychiatriques majeurs (figure 12) (**Artigas-Pallares et al., 2005**).



Figure : Phénotype de syndrome de Prader Willi (Tauber et al., 2006).

1.6.2— Moyens de diagnostic avant avènement de biologie moléculaire

Au moment du diagnostic, différents examens vont être pratiqués, comme par exemple:

- Un examen de la déglutition par radioscopie.
- Une polysomnographie pour rechercher et évaluer les troubles du sommeil. Cet examen enregistre plusieurs paramètres pendant le sommeil, comme la respiration, le rythme cardiaque, l'électroencéphalogramme, etc.
- Des radiographies de la colonne vertébrale pour rechercher une scoliose,
- Des dosages de différentes hormones pour évaluer les troubles de la croissance, et détecter d'éventuels autres troubles hormonaux.
- Un bilan ophtalmologique (Tauber, 2013).

1.6.3— Moyens de diagnostic après avènement de biologie moléculaire

Le diagnostic par méthode de biologie moléculaire se fait sur une prise de sang qui permet de rechercher l'anomalie génétique en cause. Un laboratoire spécialisé est nécessaire pour faire dans un premier temps, un examen permettant l'étude de la méthylation cet examen révèle si les gènes étudiés sont fonctionnels ou silencieux. Dans un deuxième temps, d'autres examens (hybridation *in situ* en fluorescence, marqueurs microsatellites) permettant de préciser le type d'anomalie génétique en cause et de déterminer le risque de transmission à la descendance (Tauber, 2013).

2 Maladies métaboliques

Les maladies métaboliques héréditaires sont des maladies particulières dues à des mutations dans des gènes codant, le plus souvent, pour des enzymes ou, parfois, d'autres protéines du métabolisme cellulaire (Sedel et al., 2005).

Le développement rapide des maladies métaboliques à l'échelle mondiale ne peut être le seul fait de mutations génétiques mais plutôt la conséquence coordonnée des traits génétiques et de changements d'habitudes alimentaires (Burcelin et al., 2010).

1.1 Diabète

~~2.1.1~~ Définition

Le diabète correspond à une élévation anormale de la glycémie. Cette augmentation peut provoquer à plus ou moins long terme des lésions de différents organes, comme les yeux, les reins, les nerfs et les vaisseaux sanguins (Valle, 2020).

~~2.1.2~~ Moyens de diagnostic avant avènement de biologie moléculaire

Tout d'abord, le diagnostic du diabète ne peut être posé qu'après avoir effectué une glycémie à jeun après un minimum de 8h de jeûne, la glycémie devra par ailleurs être vérifiée à 2 prises. Depuis 2009, l'utilisation du dosage de l'hémoglobine glyquée (HbA1c) pour le diagnostic du diabète est recommandée par l'ADA (Association Américaine de Diabète). Elle renseigne sur l'évolution de la glycémie dans les 3 mois précédant le dosage (Abettan et al., 2014).

Un bilan systématique des complications est nécessaire. Il passe par un examen ophtalmologique afin de rechercher une rétinopathie (fond d'œil, acuité visuelle, tension oculaire et angiographie rétinienne), un électrocardiogramme, un examen des pieds, un écho-doppler des vaisseaux des membres inférieurs lorsqu'une diminution ou une absence de pouls pédieux est constatée, ainsi qu'un bilan sanguin à la recherche d'anomalies lipidiques et la recherche d'albumine dans les urines afin de dépister une néphropathie diabétique (Valle, 2020).

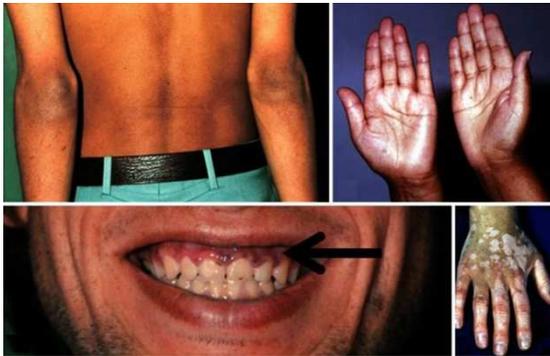
~~2.1.3~~ Moyens de diagnostic après avènement de biologie moléculaire

Une partie majeure de cette activité est de rechercher des formes monogéniques de diabète, après un séquençage de l'exome entier c'est-à-dire de tous les gènes (ou un séquençage d'exome entier amélioré de type CoDE-seq permettant de détecter aussi les anomalies de structure des chromosomes appelés CNV (*copy number variant*) des patients par une plateforme dédiée au séquençage de nouvelle génération, nous recherchons dans

un premier temps des mutations pathogènes (c'est-à-dire susceptibles d'entraîner la maladie) dans les gènes d'ores et déjà connus dans la littérature (**Benlian, 2015**).

2.2 Maladie d'Addison

2.2.1 Définition



La maladie d'Addison est la conséquence d'un déficit de la corticosurrénale généralement d'évolution progressive. Elle se traduit par une hypotension et une hyperpigmentation et peut se compliquer en une insuffisance surrénalienne aiguë avec collapsus cardiovasculaire. Le diagnostic est

clinique et biologique, devant une élévation de l'hormone adrénocorticotrope plasmatique en regard d'un cortisol plasmatique abaissé. Le traitement dépend de la cause mais repose généralement sur de l'hydrocortisone, associé parfois à d'autres hormones (figure 13) (**Grossman, 2020**).

Figure : Maladie d'Addison (Grossman, 2020).

2.2.2 Moyens de diagnostic avant avènement de biologie moléculaire

Le diagnostic de certitude repose sur les dosages des hormones surrénaliennes et de l'ACTH (hormone adrénocorticotrope). Toutefois, il ne faut en aucun cas attendre les résultats pour débiter le traitement lorsque l'on suspecte une insuffisance surrénale.

La sécrétion de cortisol suit un rythme nyctéméral, son maximum étant le matin (6 à 8 heures) et son minimum vers minuit. Le dosage de la cortisolémie à 8 heures du matin est l'examen à réaliser en 1re intention en cas de suspicion d'insuffisance surrénalienne. (**Bême, 2018**).

La réalisation d'un test au Synacthène® immédiat est nécessaire. Il consiste à doser la cortisolémie 60 minutes après une injection (intramusculaire ou intraveineuse) de Synacthène® immédiat. Quand le diagnostic d'insuffisance surrénalienne est posé, le dosage de l'ACTH (à 8 heures) permet d'identifier son origine primitive (ACTH élevée) ou centrale (ACTH normale ou basse). En cas d'ISP (insuffisance surrénale primaire) ; des dosages de rénine et d'aldostérone plasmatiques sont nécessaires pour évaluer le compartiment minéralocorticoïde. Il existe un déficit si l'aldostérone est basse et la rénine élevée (**Jublanc et Bruckert, 2016**).

~~2.2.3~~ Moyens de diagnostic après avènement de biologie moléculaire

Plus de 435 mutations différentes ont été identifiées, 53% étant des mutations faux sens, les autres étant des délétions d'une ou plusieurs paires de bases, mutation STOP, des mutations aux sites d'épissage, des délétions importantes du gène.

Soixante-cinq pour cent des mutations du gène ABCD1 (*ATP binding cassette subfamily D (ALD) member 1*) d'après le registre des mutations conduisent à une absence de détection de la protéine adrénoleucodystrophie (ALD) par la technique Western-Blot dans les fibroblastes ou les lymphocytes-monocytes du sang périphérique. Ce test peut donc être utilisé pour identifier les individus à risque d'être hétérozygotes. Une recherche de mutation du gène ABCD1 doit être en fait systématique chez tous les individus à risque d'être conducteurs pour l'ALD (**Aubourg, 2007**).

3 Maladies infectieuses

L'infection est l'invasion d'un organisme vivant par des micro-organismes pathogènes tels que : les bactéries, virus, champignons, parasites. Lors d'une infection, les micro-organismes pathogènes agissent en se multipliant (virulence) et éventuellement en sécrétant des toxines. Une infection peut être locale ou généralisée, exogène (provoquée par des germes provenant de l'environnement) ou endogène (germe issu de la maladie elle-même) (**Morin, 2002**).

1.1 Tuberculose

~~3.1.1~~ Définition

C'est une maladie infectieuse contagieuse due à une bactérie *Mycobacterium tuberculosis*. La tuberculose se transmet d'une personne à l'autre par voie aérienne. Elle est présente dans toutes les régions du monde (**Morin, 2002**).

3.1.2— Moyens de diagnostic avant avènement de biologie moléculaire

Les techniques conventionnelles de détection des pathogènes sont basées sur : la culture bactérienne et l'identification de la souche à l'aide d'antibiogrammes ; la sérologie qui recherche les anticorps produits par le donneur à la suite du contact avec un agent pathogène et les anticorps. Ces anticorps sont recherchés par des tests immuns enzymatiques et la radiographie de thorax qui permet de visualiser cette infection comme des nodules (figure 14) (Frenkian-Torres et Toledo, 2014).



Figure : Radiographie du thorax d'un patient atteint de tuberculose (Logean, 2015).

3.1.3— Moyens de diagnostic après avènement de biologie moléculaire

Les tests génotypiques reposant sur l'amplification et la détection des acides nucléiques (ADN ou ARN) ainsi que des kits de détection prêts à l'emploi, contenant tous les éléments nécessaires à ces amplifications, voire même à l'extraction des ADN ou ARN permettent de s'affranchir de l'étape de culture et donc d'envisager un raccourcissement des délais de diagnostic de la tuberculose. (Morel et al., 2020).

L'avantage de la biologie moléculaire est de s'affranchir de ces différentes difficultés afin d'obtenir une réponse plus rapide et au plus près de l'infection, Par ailleurs, là où d'autres techniques ne peuvent travailler que sur un nombre limité de type d'échantillons (sang, urines), la biologie moléculaire travaille sur un nombre beaucoup plus important de type d'échantillons (sperme, salive, LCR, etc.) (Frenkian-Torres et Toledo, 2014).

3.2 Infection au VIH

3.2.1—Définition

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est un rétrovirus qui s'attaque aux cellules du système immunitaire et les détruit ou les rend inefficaces. Aux premiers stades de l'infection, le sujet ne présente pas de symptômes. Cependant, l'évolution de l'infection entraîne un affaiblissement du système immunitaire et une vulnérabilité accrue aux infections opportunistes. Le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) est le dernier

stade de l'infection à VIH. Il peut se déclarer au bout de 10 à 15 ans. Les antirétroviraux permettent de ralentir son évolution. Le VIH se transmet à l'occasion de rapports sexuels non protégés, d'une transfusion de sang contaminé ou de l'échange de seringues contaminées. Il se transmet aussi de la mère à l'enfant pendant la grossesse, l'accouchement ou l'allaitement au sein (**Lépine, 2014**).

~~3.2.2~~ — Moyens de diagnostic avant avènement de biologie moléculaire

Le diagnostic virologique classique utilise les deux approches : d'une part, l'isolement des virus en culture cellulaire, qui témoigne avec certitude d'infections en course, d'autre part, l'apparition d'anticorps sériques spécifiques. Les contraintes et les limites du diagnostic virologique classique sont bien connues (**Descamps et Bichat-Claude, 2015**). On lui reproche souvent un nombre élevé d'échecs et la lenteur des résultats. Il est vrai que de nombreux virus ne se multiplient pas en culture cellulaire, que la multiplication de certains autres est difficilement détectable et que des fautes techniques (prélèvements trop tardifs, mauvaises conditions de transport des prélèvements vers le laboratoire, inoculation des cellules non permissives) diminuent encore les chances d'un isolement positif (**Plantier et Simon, 2002**).

~~3.2.3~~ — Moyens de diagnostic après avènement de biologie moléculaire

Les tests utilisés permettent de mesurer le nombre de virus présents dans un échantillon de sang. Le test utilise une technique d'amplification des acides nucléiques, qui permet de déterminer le nombre de copies de VIH présentes dans un millilitre de plasma. Le test d'amplification des acides nucléiques consiste en une amplification du matériel génétique du virus lui-même ou d'une sonde qui s'est liée à ce virus. Une réaction chimique est ensuite utilisée pour mesurer la quantité d'amplification observée pendant le test, qui correspond à la quantité de VIH présente dans l'échantillon.

La technique de mesure de la charge virale la plus couramment utilisée est la réaction de polymérisation en chaîne quantitative (PCRq). Les autres techniques de mesure de la charge virale comprennent l'amplification du signal médiée par transcription (*transcription-mediated amplification*) et les techniques d'amplification du signal par l'ADN branché (**Gullett et Nolte, 2015**).

4 Maladies cardiovasculaires (MCV)

Les MCV constituent un ensemble de troubles affectant le cœur et les vaisseaux sanguins. Les maladies cardio-vasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde, elles provoquent plus de décès que toute autre cause de mortalité (**Juneau, 2011**).

1.1 Hypertension artérielle (HTA)

4.1.1— Définition

La pression sanguine est la force exercée par le sang en circulation sur la paroi des artères, c'est-à-dire les principaux vaisseaux qui permettent la circulation du sang dans l'organisme. On parle d'hypertension lorsque cette pression est trop élevée. La pression sanguine est exprimée par deux chiffres : le premier correspond à la pression au moment où le cœur se contracte (pression systolique) et le second à la pression dans les vaisseaux entre deux contractions cardiaques (pression diastolique) (**Kikoïne et Boulestreau, 2018**).

4.1.2— Moyens de diagnostic avant avènement de biologie moléculaire

Trois méthodes sont recommandées : les mesures en clinique, le monitoring ambulatoire de la pression artérielle (MAPA) ainsi que la mesure de la pression artérielle à domicile. La pression artérielle devrait être mesurée en position assise puis en position debout (à une et trois minutes), particulièrement, chez les patients présentant des symptômes orthostatiques, chez les personnes âgées, chez les diabétiques et chez les patients traités par alpha-bloquant. (**Boulianne et Milot MD, 2016**).

4.1.3— Moyens de diagnostic après avènement de biologie moléculaire

L'analyse de liaison (*Linkage analysis*) étudie la fréquence avec laquelle les allèles d'un marqueur sont transmis avec le locus de la maladie à la prochaine génération dans des familles, sans qu'il n'y ait eu de recombinaison pendant la méiose. L'analyse de liaison permet ainsi d'identifier des régions génomiques liées à la maladie d'intérêt. L'analyse de liaison se fait habituellement sur l'ensemble du génome (*Genome-wide linkage analysis*) et comme ces analyses ne sont pas basées sur des connaissances a priori, elles peuvent identifier des gènes candidats dont on ne suspectait pas l'implication dans l'HTA auparavant. Ceci génère de nouvelles hypothèses sur la pathogenèse de l'HTA. Les régions du génome identifiées par une analyse de liaison peuvent contenir de très nombreux gènes et des études plus approfondies sont nécessaires pour identifier le gène candidat et les mutations en cause, les études de liaison et d'association permettent d'identifier des *loci* possiblement liés à l'hypertension artérielle. Ces dernières années, des projets

internationaux ont permis d'identifier des *loci* dont l'implication dans l'hypertension artérielle (HTA) n'avait pas été suspectée auparavant, ouvrant la porte à l'identification de nouvelles voies impliquées dans la pathogenèse de l'HTA. Au niveau de chaque locus, plusieurs gènes candidats sont possibles et les variantes génétiques fonctionnels n'ont pas encore été identifiés les résultats obtenus à ce jour suggèrent que chaque variant génétique n'explique qu'un très petit effet au niveau de la pression artérielle. Le développement d'un test génétique diagnostique ou pronostique n'est donc pas encore d'actualité (**Burnier et al., 2009**).

4.2 Infarctus de myocarde

4.2.1— Définition

L'infarctus du myocarde correspond à la nécrose d'une partie du myocarde. Il se produit suite à une occlusion de l'artère coronaire qui irrigue le cœur. L'infarctus du myocarde, parfois appelé crise cardiaque, se révèle mortel dans près de 10% des cas (figure 15) (**Lamirand, 2013**).

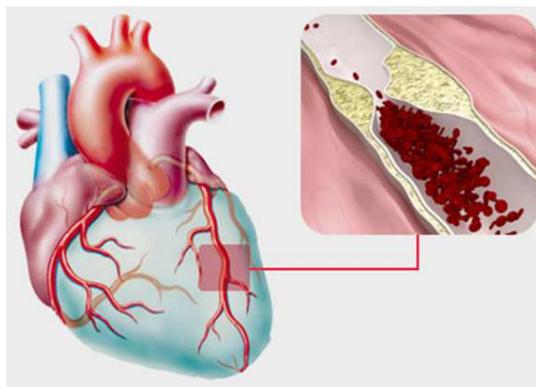


Figure : Schéma d'un infarctus du myocarde (**Pierre, 2015**).

4.2.2—Moyens de diagnostic avant avènement de biologie moléculaire

Le diagnostic se fait à l'aide d'un électrocardiogramme qui permettra de visualiser l'activité électrique du cœur. Il révélera si une attaque cardiaque s'est déclenchée ou si elle est en train de se produire. Une analyse de sang permettra de détecter la présence d'enzymes cardiaques (LDH, CPK) dans le sang qui révèlent les dommages sur une partie du cœur. Une radiographie peut être nécessaire, notamment pour s'assurer que les poumons ne sont pas atteints. Une coronarographie, radiographie qui permet de visualiser les artères coronaires, peut également permettre de détecter une diminution du diamètre de ces artères et la présence d'une plaque d'athérome (**Allard, 2013**). En plus le dosage de la troponine

qui permet de diagnostiquer l'infarctus de myocarde car un taux élevé de troponine peut être un signe d'une lésion du myocarde (**Iglesias, 2018**).

4.2.3— Moyens de diagnostic après avènement de biologie moléculaire

Des chercheurs ont trouvé une raison qui pourrait expliquer pourquoi cette complication de l'infarctus est assez fréquente, ils ont découvert des mutations au niveau du locus 9p21 qui favorisent l'arythmie du cœur après une crise cardiaque par la technique de séquençage (**Robbins et Gary, 2011**).

Précédemment, d'autres études avaient suggéré que des mutations situées à cet endroit du génome étaient associées à des troubles cardiovasculaires, sans que le mécanisme soit clairement identifié. Ici, les chercheurs ont travaillé sur un modèle de crise cardiaque *in vitro* où ils ont placé dans ces hydrogels des cellules cardiaques normales ou mutées au locus 9p21, et provoqué une « crise cardiaque dans une boîte », en modifiant la rigidité de l'hydrogel. Le résultat était que les cellules non-mutées continuaient à battre normalement, contrairement aux cellules mutées (**Ray, 2019**).

En plus, les récentes découvertes ont montré l'implication des ARNs non codants, microARNs (*miARNs*) et les longs ARNs non codants (*lncARNs*), dans les processus physiologiques et pathologiques et notamment dans les maladies cardiovasculaires. L'étude du potentiel des miARNs et des lncARNs en tant que biomarqueurs pronostiques et diagnostiques, ils ont évalué le pouvoir diagnostique des miARNs sur une cohorte de patients présentant des douleurs thoraciques. A la fin l'étude a montré l'utilité des ARNs non codants pour améliorer l'identification des patients à risque de développer une IDM et ont permis également de mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques qui pourraient prévenir le remodelage ventriculaire post-IDM (**Zangrando, 2015**).

Partie Pratique

Matériel et Méthodes

1 Description des lieux

4.3 CHU Constantine

Le Centre hospitalier Universitaire de Constantine CHUC a été créé par le décret n°86-298, il s'étend sur une superficie de 13 hectares. Le CHUC est un hôpital pavillonnaire composé de 15 blocs regroupés en trois structures :

- L'unité siège (BENBADIS)
- L'unité de chirurgie dentaire
- L'hôpital de jour de cancérologie « KHRIYB ».

CHUC contient au nombre de 51 services répartis comme suit :

- Service de médecine
- Service des urgences médico-chirurgicales
- Service de chirurgie
- Plateau technique
- Chirurgie dentaire
- Pharmacie centrale et Galénique

Ayant la nomination, depuis décembre 1986, de Centre hospitalo-universitaire DR. BENBADIS de Constantine, cet établissement public à caractère administratif est doté de la personnalité morale et de l'autonomie financière. Il est chargé en relation avec l'établissement d'enseignement de formation en sciences médicales, des missions : de diagnostic, d'exploration, de soins, de prévention, de formation et de recherche

Le CHUC se compose de différents services tels que le service de bactériologie/virologie, le service de biochimie doté d'une unité de génétique.

4.4 CHU Annaba

Le Centre Hospitalier Universitaire d'Annaba a été créé par le décret n°86-300 du 16 décembre 1986, qui lui confère la constitution physique suivante :

- Hôpital Ibn Rochd
- Hôpital Ibn Sina
- Hôpital Dorban
- Clinique pédiatrique

- Clinique ophtalmologique
- Clinique dentaire Saouli Abdelkader
- Clinique dentaire Elysa

Le CHUA est à vocation régionale, il assure une couverture médicale pour une population de 3.304.438 individus, répartie sur les 6 wilayas de l'extrême Est du pays. Le CHU Ibn Rochd comporte beaucoup de services dont les services d'Oncologie, de microbiologie/Virologie et de Biochimie.

5 Méthodologie de travail

Afin d'aboutir à notre but qui est l'établissement d'un état des lieux de l'utilisation des techniques de biologie moléculaire dans le domaine médical, nous avons effectué une recherche des différents services pouvant avoir des techniques de biologie moléculaire. Après, les chefs des services concernés ont été contacté et des visites à leurs laboratoires respectifs ont été programmées.

Nous avons visité les laboratoires suivants : le laboratoire de Bactériologie-Virologie et l'unité de Génétique au niveau du laboratoire de Biochimie au sein du CHUC ainsi que les laboratoires de Bactériologie-Virologie, de Biochimie et d'Anatomopathologie au niveau du laboratoire de Biochimie au sein du CHUA.

Au cours de la visite, un questionnaire (annexe 1) a été donné aux spécialistes. Des réponses aux questions est exposée dans la partie résultats et discussion.

6 Matériel et techniques utilisés pour le diagnostic des maladies

1.1 PCR en temps réel

~~6.1.1~~ Principe

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 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.

6.1.2—Equipement

COBAS Ampliprep fonctionne en combinaison avec l'analyseur COBAS ® TaqMan ® 48 pour automatiser le processus d'extraction des échantillons, l'amplification et la quantification des échantillons d'ARN ou d'ADN (figure 16, figure18).

Les réactifs à code à barres sont emballés dans des cassettes et prêtes à l'emploi à déversement avec des capuchons auto-étanches pour une stabilité accrue (figure 17). Cette cassette fournit une préparation automatisée intégrée d'échantillons pour des diagnostics moléculaires qualitatifs et quantitatifs.

4 tests différents avec 72 échantillons peuvent être chargés sur le système en même temps.



Figure : Instrument COBAS.

- Sample Preparation Reagents
 - Bead Reagent Cassette (CS1)
 - Lysis Reagent Cassette (CS2)
 - Multi Reagent Cassette (CS3)
 - Test specific Cassette (CS4)
- Control Reagents
 - 4 Negative control (- Negative)
 - 4 Positive controls (# High positive)
 - 4 Positive controls (+ Low positive)
- Control Barcode Clips
 - 4 for each control



Figure : Cassettes de réactifs utilisés en PCR en temps réel.



Figure : COBAS TaqMan 48 (ROCHE).

6.1.3 Mode opératoire

- Extraction d'ADN et dénaturation réalisée à une température de 95°C.
- Hybridation avec les sondes marquées
- Polymérisation

Il existe deux principes généraux pour la détection quantitative des amplicons : les agents se liant à l'ADN double brin et les sondes fluorescentes. Pour cette dernière catégorie, il existe quatre technologies principales : hydrolyse de sondes (Taqman assay), hybridation de 2 sondes (HybProbes), balises moléculaires (Molecular Beacons) et amorces scorpion (Scorpion primers). Ces différentes technologies de détection auraient une sensibilité équivalente. Cependant, ces technologies présentent des différences au niveau de la spécificité.

6.1.4 Expression des résultats et interprétation

Les résultats sont exprimés en un nombre et des courbes. Le seuil de référence est une valeur de fluorescence à laquelle les courbes sont comparées. Réglé empiriquement ou par un calcul statistique au-dessus du background (méthode de la dérivée seconde)

Le Ct = nombre de cycles requis pour qu'une réaction de fluorescence atteigne le seuil de référence (T). Il est corrèle fortement avec le nombre de copie de départ (figure 19).

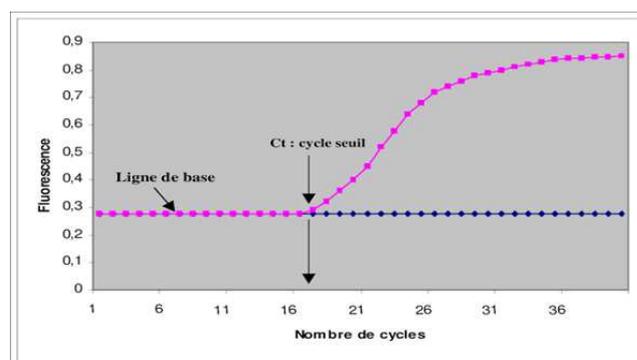


Figure : Modèle graphique du résultat de PCR en temps réel exprimé en fonction du nombre de cycles.

6.2 Variantes de PCR utilisés aux laboratoires

De nouveaux types de PCR sont introduits dans le diagnostic des maladies dans les laboratoires visités

PCR à digestion enzymatique (restriction digest)

C'est une technique utilisant des enzymes de restriction pour couper spécifiquement une molécule d'ADN afin de la manipuler ou de la cloner.

PCR en temps réel ou quantitative

Elle représente une méthode rapide, sensible et spécifique pour la mise en évidence d'agents pathogènes. La PCR multiplex (*multiplex PCR*) dans laquelle on utilise un set de plusieurs couples d'amorces pour amplifier simultanément plusieurs cibles d'ADN en une seule réaction de PCR, plutôt qu'un seul couple d'amorces pour amplifier une cible d'ADN unique

PCR-SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism)

Elle est basée sur l'analyse électrophorétique des produits PCR sous forme de fragment simple brin. Une mutation ponctuelle au sein d'une séquence modifie suffisamment la structure secondaire de l'ADN monobrin pour qu'il en résulte des changements de migration électrophorétique sur gel polyacrylamide

RT PCR (Reverse transcriptase)

C'est une technique qui permet de faire une PCR à partir d'un échantillon d'ARN. L'ARN est tout d'abord rétrotranscrit grâce à une enzyme appelée transcriptase inverse, qui permet la synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc). Ce dernier est ensuite utilisé pour réaliser une PCR et *Gene scanning* qui est une méthode par laquelle des mutations sont insérées à des sites spécifiques sur un segment d'ADN pour déterminer les séquences d'ADN nécessaires à l'activité génique.

Le choix de la variante de PCR est basé sur le type de maladie, Type de mutation, le nombre d'exons étudiés et les amorces utilisés. En plus, les résultats de PCR classique seront sur un profil d'électrophorèse sur gel d'agarose des fragments amplifiés par PCR. Quant aux autres variantes, les résultats seront exprimés sur un logiciel.

6.3 Séquençage

6.3.1 Principe

Le principe de cette méthode consiste à initier la polymérisation de l'ADN à l'aide d'un petit oligonucléotide (amorce) complémentaire à une partie du fragment d'ADN à séquencer. Il en résulte un mélange de fragments d'ADN de tailles croissantes.

6.3.2 Equipement

Séquenceur des gènes qui est un appareil capable d'automatiser l'opération de séquençage de l'ADN. Un séquenceur sert à déterminer l'ordre des bases nucléiques d'un échantillon d'ADN et à le présenter, après traitement, sous forme d'une suite de lettres, appelée read ou lecture, représentant des nucléotides (figure 20).



Figure : Séquenceur 3500 *genetic analyzer* (HITACHI).

6.3.3 Mode opératoire

D'abord, un fragment d'ADN de l'échantillon est [extrait](#) puis chauffé. Ainsi, l'ADN est forcé à se dérouler. Les deux brins de la double hélice se séparent en brins individuels. La prochaine étape consiste à baisser la température et à ajouter une amorce d'ADN. Cette dernière s'attache au brin d'ADN qu'on tente de séquencer. Elle indique le début du séquençement, un peu comme une ligne de départ. Par la suite, la température est légèrement augmentée. Puis, des nucléotides libres et l'ADN polymérase sont ajoutés. Les nucléotides libres contiennent l'une des quatre bases suivantes : cytosine, thymine, adénine ou guanine. En commençant par la séquence d'amorce, l'ADN polymérase construit un brin d'ADN complémentaire (ou inverse). Elle le fait en ajoutant un nucléotide à la fois.

Quatre réactions de séquençage différentes doivent se produire, une pour chacun des quatre types de nucléotides. Pour obtenir ces réactions, il faut ajouter au mélange un fluorochrome de couleur différente à chaque nucléotide. Ainsi, on peut effectuer le séquençage en un seul mélange réactif dans un tube capillaire.

Lorsque l'ADN polymérase atteint un nucléotide de terminaison de chaîne, elle arrête la séquence d'ADN. L'ADN polymérase ajoute les nucléotides modifiés de façon aléatoire. De nombreuses séquences d'ADN de différentes longueurs sont donc produites.

6.3.4—Expression des résultats et interprétation

Pour déterminer la séquence, le tube est irradié par un laser. Lorsque la lumière traverse chaque bande de couleur, un détecteur inscrit un pic sur un graphe. Ces pics correspondent aux bases nucléotidiques. À l'aide des fluorochromes, les scientifiques peuvent automatiser le séquençage de l'ADN. Cela accélère le processus.

6.4 DGGE (denaturing gel gradient electrophoresis)

6.4.1—Principe

Le principe est que la température de fusion d'un produit PCR (ADN double brin), c'est-à-dire la température moyenne de séparation des deux brins est fonction de sa séquence. Une mutation ponctuelle qui change donc la séquence entraîne une modification de la température de fusion. Cette modification est mise en évidence par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence d'un gradient d'agent dénaturant.

6.4.2— Mode opératoire

Pour réaliser la technique de DGGE (Figure 21) ces étapes sont à suivre :

- Extraction de l'ADN de l'échantillon
- PCR de la région cible (exemple gène codant l'ARN 16S) et ajout d'un GC-clamp grâce à des amorces spéciales.
- Dépôt sur gel à gradient dénaturant
- Migration grâce à un champ électrique
- Révélation et analyse du gel

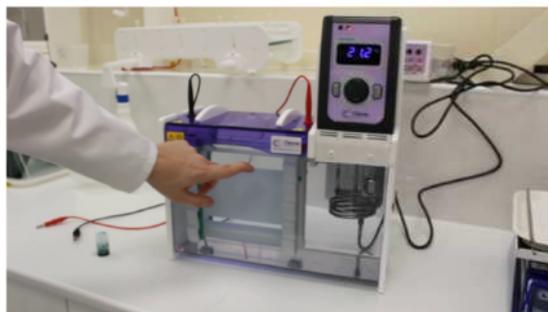


Figure : Système de DGGE.

6.4.3—Expression des résultats et interprétation

Le gel est photographié par une caméra digitale et traité grâce au system Gel Smart 7.3. L'image visualisée sur l'écran d'ordinateur est enregistrée sous format Tif. En négatif (bandes d'ADN noires sur fond clair). Les fichiers des gels sont ensuite traités par un logiciel.

6.5 SSCP (single strand conformation polymorphism)

6.5.1—Principe

La technique de SSCP (*single strand conformation polymorphism* ou polymorphisme de conformation des acides nucléiques simples brins) est basée sur l'analyse électrophorétique des produits PCR sous forme de fragments simple brin. On amplifie par PCR une région que l'on désire étudier et on compare la mobilité de l'ADN dénaturé portant une mutation par rapport à celle d'un fragment de référence comportant une séquence normale. Une mutation ponctuelle au sein d'une séquence modifie suffisamment la structure secondaire de l'ADN monobrin pour qu'il en résulte des changements de migration électrophorétique sur gel de polyacrylamide.

6.5.2— Equipement

- Thermocycleur
- Gel d'agarose coloré par le Bromure d'éthidium BET
- Transilluminateur UV (Figure 22) (Figure 23).

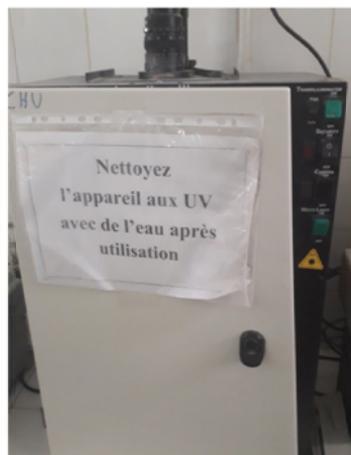


Figure : Table des U.V.



Figure : Casque pour la protection.

6.5.3—Mode Opérateur

- Extraction de l'ADN génomique
- Amplification d'une région par PCR
- Séparation des deux brins d'ADN (qui vont se recroqueviller)
- Révélation et étude de l'électrophorégramme (Figure 24).

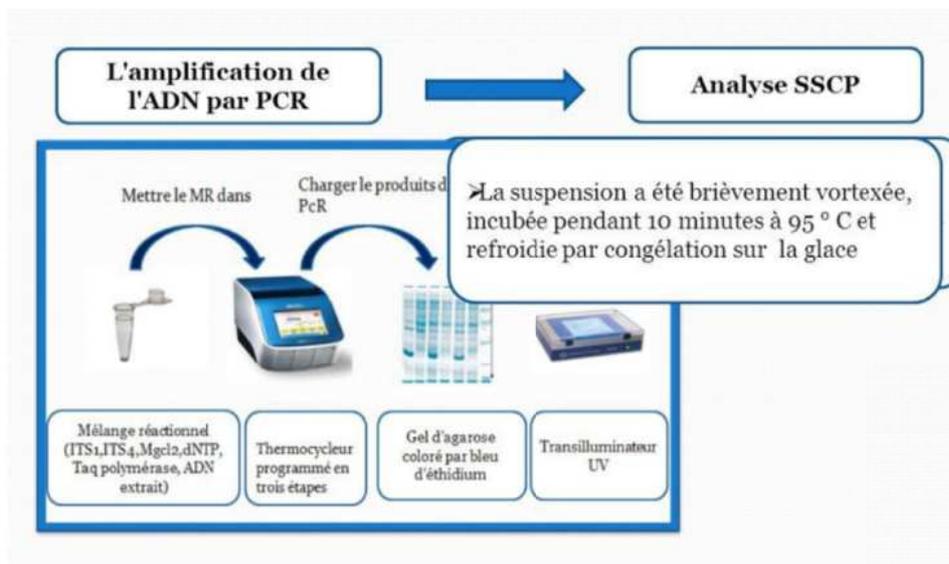


Figure : Technique de PCR-SSCP.

6.5.4— Expression des résultats et interprétation

L'échantillon à analyser est traité en parallèle avec un ADN standard. Tous deux sont amplifiés. Ils sont ensuite dénaturés et chargés sur gel. La présence d'une mutation entraîne un décalage de position sur une seule des deux bandes produites par la dénaturation.

DGGE et SSCP sont des techniques d'analyse électrophorétiques des produits PCR. Elles sont particulièrement utiles pour mettre en évidence des mutations ponctuelles au niveau d'un

gène. Des produits PCR (ou amplimères) particuliers sont formés si des mutations sont présentes sur l'ADN initial. Les produits PCR seront différents en fonction de la présence d'une séquence normale, d'une séquence mutée (homozygote, hétérozygote ou composite).

6.6 SSP (Sequence Specific Primer)

6.6.1 Principe

La technique de PCR-SSP est basée sur le principe que seules sont amplifiées les séquences d'ADN complémentaires des amorces spécifiques utilisées grâce à des polymérases ADN type thermostable sans activité correctrice. Ces couples d'amorces sont spécifiques d'un allèle ou d'un groupe d'allèles selon le degré de résolution du kit utilisé. Dans des conditions très précises de PCR, les couples d'amorces hybridées ou presque totalement hybridées permettent l'amplification (résultat positif), tandis que les paires d'amorces non hybridées ne donnent pas d'amplification (résultat négatif).

6.6.2 Equipement

- Thermocycleur
- Appareil d'électrophorèse sur gel d'agarose.

3.6.3. Mode opératoire

- Extraction d'ADN par chromatographie d'affinité à base de silice
- Amplification (kit spécialisé)
- Révélation par électrophorèse sur gel

6.6.3 Expression des résultats et interprétation

Après la PCR, les fragments d'ADN amplifiés sont séparés en fonction de leur taille par électrophorèse sur gel d'agarose, visualisés par colorisation au bromure d'éthidium sous lumière UV, puis photographiés et interprétés.

L'interprétation des résultats de PCR-SSP est basée sur la présence ou l'absence de produit(s) spécifique(s) de PCR. La taille relative du ou des produits de PCR spécifiques est utile dans l'interprétation des résultats.

6.7 PCR/RFLP (polymorphisme de longueur des fragments de restriction)

6.7.1 Principe

L'association entre les techniques d'amplification et d'observation de polymorphismes sur des fragments digérés par des enzymes de restriction. D'un point de vue technique, la

méthode RFLP est utilisée pour refléter directement des variations dans la séquence primaire de l'ADN. Cette technique a permis d'observer de nombreuses variations à différentes échelles taxonomiques de la population à l'espèce. Elle est facilitée par la possibilité d'obtenir un nombre considérable de copies d'une séquence cible d'ADN grâce à la technique de PCR.

6.7.2—Equipement

- Thermocycleur
- Appareil de gel Polyacrylamide

6.7.3—Mode opératoire

- Extraction d'ADN
- Digestion de l'ADN
- Séparation des fragments d'ADN par électrophorèse
- Transfert des fragments d'ADN dénaturée
- Hybridation de l'ADN avec une sonde marquée
- Révélation

6.7.4—Expression des résultats et interprétation

Les résultats seront des fragments sur l'électrophorèse par migration selon un courant électrique. Quand on a un locus monomorphe le fragment a la même taille du témoin donc pas de polymorphisme et si le locus a une taille différente du témoin, il est par conséquent polymorphe de sites de restriction (figure 25).

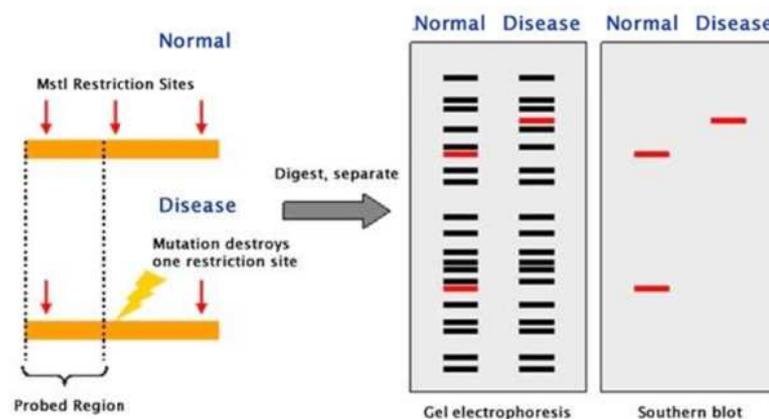


Figure : Technique de PCR-RFLP.

Résultats et Interprétation

1 Maladies diagnostiquées au CHU Dr IBNBADIS de Constantine

6.8 Service de Bactériologie/Virologie

Les maladies diagnostiquées au niveau de ce service sont les maladies virales suivantes : Hépatite B et C, SIDA, COVID-19 (expliquées ci-dessous). La technique utilisée dans le service de Bactériologie/Virologie pour ces quatre maladies infectieuses est la PCR en temps réel à système fermé.

Le test de la COVID-19 se fait au niveau d'un laboratoire de l'université, distant du CHU de près de 16 Km. Le travail dans ce laboratoire est quotidien, en dehors du vendredi et du samedi. Le risque d'infection est important d'où l'impossibilité d'accès à ce laboratoire.

A part le diagnostic de ces maladies, aucune autre maladie n'est dépistée et l'activité de recherche à visée thérapeutique est absente.

~~6.8.1~~—Hépatite B

L'hépatite B (VHB) est une infection virale qui s'attaque au foie et peut entraîner une affection aiguë potentiellement mortelle ou des infections chroniques entraînant pour les personnes exposées un risque important de décès par cirrhose ou cancer du foie. L'infection par un mutant du virus B est souvent marquée par des fluctuations importantes de la multiplication virale et de l'activité de l'hépatite chronique, avec des phases de poussée de la maladie suivies de rémissions transitoires (**Mennecier, 2010**).

~~6.8.2~~—Hépatite C

L'hépatite C (VHC) est une maladie du foie causée par le virus VHC, pouvant entraîner des hépatites aiguës et des hépatites chroniques. La gravité des hépatites C est variable et peut aller d'une forme bénigne, d'une durée limitée à quelques semaines, à une maladie grave qui s'installe à vie. L'hépatite C est une cause majeure de cancer du foie. Le VHC peut par la suite épuiser le système immunitaire, causant des manifestations auto-immunes voire des lymphomes. L'échappement du virus au système immunitaire est également à relier à son taux de mutations élevés, du fait de son ARN polymérase peu fidèle (**Vayssières, 2019**).

~~6.8.3~~—Virus de l'immunodéficience humaine (VIH)

Maladie infectieuse, due à un virus transmis par voie sexuelle ou sanguine et provoquant un affaiblissement du système immunitaire. Le SIDA n'est que l'une des manifestations de l'infection causée par ce virus (**Katlama, 2008**).

6.8.4—COVID-19

La maladie à coronavirus 2019 (COVID-19) est causée par une nouvelle souche infectieuse de coronavirus connue sous le nom de coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS-CoV-2) qui était auparavant appelée 2019-nCoV. La Covid-19 est une maladie infectieuse résultante du développement du SRAS-CoV-2. C'est un syndrome respiratoire aigu avec des manifestations cliniques qui vont de légères à sévères, avec des symptômes multiples non spécifiques (**Amrouche, 2020**).

6.9 Unité de génétique, Service de Biochimie

Les maladies diagnostiquées au niveau de cette unité de génétique au niveau du service de Biochimie sont : la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD), dystrophie de Becker (BMD), Amyotrophie spinale infantile (ASI), embolie Pulmonaire (EP), thromboses de membranes supérieures et inférieures, néoplasies endocriniennes multiple (NEM) de type 2 et le cancer du sein (un aperçu sur chaque maladie est présenté ci-dessous). Pour ces maladies les tests se font par PCR simple et multiplexe, séquençage, DGGE, SSCP et SSP.

Pour le dépistage, l'unité génétique assure le dépistage du cancer médullaire de la thyroïdes (CMT) et le cancer du sein. Pour cette fin, le dépistage se fait en utilisant la PCR en temps réel multiplexe en raison des différents types de mutations.

Concernant l'activité de recherche dans cette unité, elle s'intéresse au cancer colorectal métastatique en cherchant des mutations somatiques dans les gènes KRAS, NRAS et BRAF. Pour le polymorphisme la PCR-RFLP et en temps réel sont utilisés.

6.9.1— Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD)

Une des dystrophies musculaires les plus fréquentes, affectant 250 000 personnes à travers le monde. Elle résulte de mutations dans le gène de la dystrophine, le plus grand gène connu du génome humain (**Guen et al., 2021**).

6.9.2— Dystrophie de Becker (BMD)

BMD est une maladies neuromusculaire liée à une mutation sur le gène de la dystrophine avec un phénotype moins sévère que dans la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) (**Dahimène et al., 2018**).

6.9.3— Amyotrophie Spinale Infantile (ASI)

ASI ou SMA est une maladie neuromusculaire autosomique récessive, due à une atteinte de la corne antérieure de la moelle épinière, entraînant une paralysie musculaire et une amyotrophie. Elle résulte d'une délétion de l'exon 7 du gène SMN, facilement identifiable par biologie Moléculaire (**Faiz et Itry, 2014**).

6.9.4— Embolie Pulmonaire (EP)

L'embolie pulmonaire est une cause fréquente d'hospitalisation en urgence et de décès. Provoquée par la migration et l'immobilisation d'un caillot de sang dans l'une des artères pulmonaires, elle est le plus souvent la complication d'une thrombose veineuse au niveau des jambes ou du bassin, EP regroupe plusieurs anomalies prédisposant à la formation de caillots sanguins. Ce sont des anomalies de l'hémostase, c'est-à-dire des anomalies affectant les mécanismes contribuant à l'arrêt des saignements en cas de brèche dans un vaisseau sanguin (**Rossant-Lumbroso et Rossant, 2019**).

6.9.5— Thromboses de membranes supérieures et inférieures

La thrombose veineuse profonde correspond à la formation d'un caillot sanguin dans une veine profonde d'un membre (habituellement le mollet ou les cuisses) ou le petit bassin. La thrombose veineuse profonde est la principale cause d'embolie pulmonaire. La thrombose veineuse profonde est la conséquence de conditions qui diminuent le retour veineux, entraînent des lésions de l'endothélium ou entraînent une hypercoagulabilité (**Robert-Ebadi, Becker et Righini, 2015**).

6.9.6— Néoplasies endocriniennes multiple (NEM) de type 2

C'est une maladie héréditaire qui peut se manifester par des tumeurs pouvant atteindre 3 glandes endocrines : la thyroïde, la partie centrale des glandes surrénales, et les glandes parathyroïdes. Elle est provoquée par une anomalie du gène RET (**Daly et Landsberg, 2019**).

1.2.7 Le cancer médullaire de la thyroïde (CMT) est un cancer rare qui se développe aux dépens des cellules C parafolliculaires thyroïdiennes responsables de la sécrétion de calcitonine (CT). Le CMT représente 5–10 % des cancers de la thyroïde (**Niccoli-Sire, B. Conte-Devolx, 2007**).

~~4.1.1~~ Cancer du sein

Un cancer du sein résulte d'un dérèglement de certaines cellules qui se multiplient et forment le plus souvent une tumeur. Des mutations sur des gènes critiques de la régulation cellulaire, transmises d'une génération à l'autre ou bien acquises au cours de la vie, peuvent causer un cancer du sein. Les gènes BRCA1 et BRCA2, par exemple, sont des gènes de susceptibilité aux cancers du sein et de l'ovaire. Les femmes qui portent des mutations de ces gènes ont un très haut risque de cancer (Cicolella, 2016).

7 Maladies diagnostiquées au CHU IBNROCHD Annaba

1.1 Service de Bactériologie/Virologie

Les maladies diagnostiquées au niveau de ce service sont les mêmes maladies diagnostiquées dans le CHUC (Hépatite B et C, SIDA et COVID-19). Puisque le test de la COVID-19, représentant un risque élevé de contamination, se fait dans le même laboratoire que le reste de tests correspondant aux autres maladies infectieuses, des autres maladies, l'accès nous a été interdit pour pouvoir voir les différentes manipulations. La technique utilisée pour ces quatre maladies infectieuses est la PCR en temps réel à système fermé.

A part le diagnostic de ces maladies, aucune autre maladie n'est dépisté et l'activité de recherche à visée thérapeutique est absente.

7.1 Service de Biochimie

Les type de maladies diagnostiquées au niveau de ce laboratoire sont les maladies métaboliques héréditaires (Hémochromatose primitive, gène HFE) et les maladies cardiovasculaires (Polymorphisme du gène MTHFR et Polymorphisme du gène PAI-1. Les variantes de la technique de PCR utilisées sont : PCR classique, PCR en temps réel, RT-PCR, Gene scannings.

Aucune activité de dépistage n'est effectuée au niveau de ce laboratoire. Quant au domaine de la recherche à visée thérapeutique, le polymorphisme du gène de Cytchrome P450 est en cours d'acquisition.

~~7.1.1~~ Hémochromatose primitive (gène HFE)

Il existe plusieurs types d'hémochromatose selon la mutation en cause. Les différentes mutations se répartissent différemment dans le monde et semblent correspondre à des profils cliniques (manifestations et gravité) différents de la maladie. La forme la plus fréquente de la maladie est l'hémochromatose héréditaire HFE (ou de type 1). Elle est due à une mutation

d'un gène situé sur le chromosome 6, le gène HFE (protéine de l'hémochromatose humaine) (Brissot et al., 2008).

~~7.1.2~~ Polymorphisme du gène MTHFR

Il s'agit du gène de la 5,10-méthylène tétrahydrofolate réductase qui fait partie des enzymes intervenant dans le métabolisme de l'acide aminé soufré, homocystéine. La mutation ponctuelle c.677C>T sur le gène MTHFR génère un variant thermosensible dont l'activité est réduite ; il en résulte une hyperhomocystéinémie qui participe au développement de pathologies thrombotiques. Des investigations cliniques restent nécessaires pour préciser le risque thrombotique lié à ce variant de la MTHFR (CLÉMENT, 2019).

~~7.1.3~~ Polymorphisme gène PA-1

Il s'agit du gène qui code pour l'inhibiteur des activateurs du plasminogène de type 1, inhibiteur physiologique puissant de la fibrinolyse, est élevé au cours du diabète de type 2 et des maladies cardio-vasculaires (Alessi, Poggi et Juhan-Vague, 2007).

~~7.1.4~~ Polymorphisme gène Cytchrome P450

Le CYP450 est une enzyme de détoxification qui appartient à la phase I du métabolisme des xénobiotiques. Cette enzyme est codée par un gène très polymorphe dont le polymorphisme commun correspond à la substitution de la cytosine (C) par la thymine (T). Ce polymorphisme a été défini dans plusieurs cancers notamment le cancer du nasopharynx (NPC).

8 Echantillonnage

Dans les différents services visités, l'échantillonnage se fait avec un consentement du patient. La fréquence de l'analyse varie d'un test à un autre. En effet pour l'hépatite B et C se fait deux fois par semaine, pour le VIH la fréquence est d'une fois par semaine, pour les tests au niveau de l'unité de génétique CHUC ; ils se font hebdomadairement (20 patients par semaine).

Par contre la fréquence d'analyse COVID-19 est quotidienne et ce en relation avec le degré de contamination du virus au sein de la population.

9 Techniques : avantages, inconvénients, cout

La technique de PCR utilisée est très spécifique pour le diagnostic moléculaire. Le choix de la variante est en étroite relation avec le type de maladie diagnostiquée ou dépistée ce qui est assuré par les amorces utilisées pour chaque technique. Ces techniques permettent

également un diagnostic rapide (1h30, 5 h ; etc.) et une protection contre les éventuelles contaminations infectieuses (HBV, HCV, HIV, COVID-19) surtout avec la PCR en système fermé. Ceci représente les avantages de ces techniques.

Cependant l'approvisionnement irrégulier en réactifs spécifiques aux techniques, leur coût élevé ainsi que celui de l'équipement, en plus de la gratuité du test dans l'hôpital, font que l'application ces techniques est freinée.

10 Comparaison des niveaux d'utilisation médicale de la biologie moléculaire dans le monde

Etant donné le manque de facilité de la part des instances étatiques par rapport l'utilisation des techniques de biologie moléculaire en clinique, l'Algérie est très en retard par rapport les autres pays développés ou en cours de développement.

Dans l'est Algérien CHU Constantine et CHU Annaba, certaines techniques sont utilisées, la plus notable est la PCR. Depuis Mars 2017, le service de bactériologie de CHU Constantine a commencé à diagnostiquer des maladies infectieuses virales en appliquant la technique majeur de biologie moléculaire la PCR en temps réel, malgré l'absence de la disponibilité des réactifs. D'autre part, entre 2003-2004 le service de génétique, CHUC a démarré le diagnostic des maladies neuromusculaires (DMD, BMD, SMA), mucoviscidose, ambiguïté sexuelle, thromboses veineuses, cancer médullaire de la thyroïde et cancer du sein grâce à la disponibilité des réactifs fournit par le laboratoire de recherche de la biologie et génétique. Pour le service de biochimie, CHUA, il a débuté en 2007 le diagnostic des maladies cardiovasculaires et les maladies métaboliques héréditaires malgré que la disponibilité des réactifs et approvisionnement est irrégulière.

L'état d'utilisation des techniques de biologie moléculaire au Maroc est meilleur que le nôtre. Car ils utilisent en plus de la PCR et ses variantes les techniques d'hybridation moléculaire en fluorescence FISH dans le dépistage des maladies génétiques tels que la trisomie 21 (**Lamzouri et al., 2012**). En plus, le diagnostic des leucodystrophies (LD) est principalement basé sur la biologie moléculaire en utilisant le séquençage de Sanger, concernant les patients présentant un marqueur biochimique positif, puis par séquençage nouvelle génération ou *Next-Generation Sequencing* (NGS) concernant les patients sans marqueurs biochimiques apparent. Le dépistage et le domaine de recherche au Maroc sont plus avancé qu'en Algérie. En effet, l'approche par séquençage des gènes connu pour leur implication dans les leucodystrophies a permis d'identifier les types de leucodystrophies présentes au sein de la

population marocaine, mais aussi de mettre en évidence de nouvelles mutations (**Karkar, 2018**).

Par ailleurs, en Tunisie, l'analyse biomoléculaire d'Hypogonadisme Hypogonadotrope Congénital Normosmique en appliquant l'approche de séquençage à haut débit (NGS) de l'exome entier, a permis d'identifier une mutation dans le gène de mutation (**Moalla, 2020**). Aussi le diagnostic moléculaire par MLPA et techniques associés pour la Mucoviscidose. L'analyse MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) est une méthode moléculaire semi-quantitative basée sur une PCR multiplexe qui sert à identifier des délétions et des duplications d'un ou plusieurs exons (**H'Mida-Ben Brahim, 2015**).

En France, la CGH Array (*Comparative Genomic hybridization*) est l'examen de choix pour l'étude en routine des pathologies associées aux anomalies chromosomiques constitutionnelles. La CGH array, permet non seulement de détecter les anomalies chromosomiques déséquilibrées détectées par le caryotype mais aussi celles qui sont cryptiques. Aujourd'hui, c'est une technique fiable, reproductible et automatisable. Du fait de la connaissance du contenu en gènes du segment remanié, le cytogénéticien peut rechercher le(s) gène(s) potentiellement impliqué(s) dans le phénotype. Par ailleurs, la comparaison d'anomalies chevauchantes chez plusieurs patients permet d'identifier des régions et/ou des gènes contribuant à un signe clinique spécifique voir à l'ensemble des symptômes du syndrome. Par exemple, l'étude par CGH array de patients porteurs de délétions chevauchantes de la région 5q14.3q15 a permis l'identification du gène majeur (MEF2C) responsable du phénotype cognitif (**Malan et al., 2008**).

Outre, la technologie de séquençage de nouvelle génération (NGS) comprend la détection de variantes germinales dans des maladies héréditaires, des variantes somatiques dans des cancers, des sous-populations d'ADN cellulaire libre circulant et des génomes viraux ou microbiens uniques dans des infections ou des génomes métamicrobiens dans la flore humaine normale ou altérée.

L'avantage de la mise en œuvre du NGS dans le diagnostic est l'introduction du test de nombreux gènes à la fois dans un temps relativement court et à des coûts relativement faibles, ce qui permet d'obtenir davantage de diagnostics moléculaires (**Favereaux, 2021**).

Par ailleurs, aux Etats-Unis, une entreprise s'est spécialisée dans les tests de diagnostic moléculaire à partir de sa propre technologie TEM-PCR (*Target Enriched Multiplex Polymerase Chain Reaction*). C'est une technologie innovante, performante et très rapide

basée sur une PCR multiplex en 1 temps, utilisant 3 paires d'amorces. Les produits de PCR marqués sont ensuite hybridés sur des plaques de *microarrays* (puces d'ADN) (**James B Wood et al., 2018**).

Conclusion

Conclusion

L'originalité de cette étude réside dans le fait qu'elle traite un sujet très important pour l'évolution de la clinique en Algérie en utilisant les différentes techniques de biologie moléculaire. Ce travail nous a permis de faire le point sur des connaissances concernant l'importance majeure des outils et techniques de biologie moléculaire. Elle nous a permis également de savoir l'intérêt de la biologie moléculaire dans le diagnostic, le dépistage et le domaine de recherche. L'analyse de nos résultats montre que les maladies génétiques, métaboliques et infectieuses sont analysées par ces techniques de fréquence très faible au niveau du Constantine et du CHU de Annaba dans l'Est algérien.

Les avantages des techniques de biologie moléculaire, ont joué un rôle majeur dans le développement du domaine de la santé en Algérie.

La fiabilité des résultats, rapidité et le temps minimisé permet d'analyser même les différentes maladies rares et inconnues.

Pour arriver à des résultats fiables, il est nécessaire de développer des études précises dans ce domaine pour obtenir des résultats et des découvertes grâce auxquelles nous pouvons utiliser ces techniques dans la clinique, le dépistage et la recherche dans de nombreux domaines et atteindre l'utilisation de ces outils de façon optimale dans nos CHU.

Notre étude est considérée comme une étape initiale de recherche de ce domaine et elle mérite d'être élargie sur tous les hôpitaux et CHU du territoire national algérien.

Références

- Abettan C, Condomines C, Labauge P, Ribotton M, Renard E, et .Wojtusciszyn, A. Pied de Charcot bilatéral chez une jeune diabétique : une association rare. *Annales d'Endocrinologie*. 2014.75 (5-6):389.
- Adams D et Eng C. Next-Generation Sequencing to Diagnose Suspected Genetic Disorders. *New England Journal of Medicine*. 2018. 379(14): 1353-1362.
- Afzal A. Molecular diagnostic technologies for COVID-19: Limitations and challenges. *Journal of Advanced Research*. 2020.26:149-159.
- Alessi M C, Poggi M, Juhan-Vague I. Plasminogen activator inhibitor-1 adipose tissue and insulin resistance. *Current Opinion in Lipidology*.2007. 18(3) : 240-245.
- Artigas-Pallares J, [Gabau-Vila E](#) et [Guitart-Feliubadaló M](#). Syndromic autism: II. Genetic syndromes associated with autism. *Rev neurol* .2005.40:151-62.
- Barden D. Southern Blotting. *Brenner's Encyclopedia of Genetics*. 2013. 4: 492-493.
- Bernard H, Bruno Baudin et Philippe Lefebvre. *Appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire*.2^{ème} édition. Flammarion Éditions.2008.
- Biacchesi Stéphane, Chevalier Christophe, Galloux Marie, Langevin Christelle, Le Goffic Ronan et Brémont Michel. *Les virus : Ennemis ou alliés ?* Quæ Éditions. 2017.
- Brissot P, Troadec M B, Bardou-Jacquet E , Lan C L, Jouanolle A M, Deugnier Y, Loréal O. Current approach to hemochromatosis. *Blood Reviews*. 2008. 22(4): 195-210.
- Blons Hélène. Dépistage du cancer colorectal : un test fiable fondé sur la détection des mutations d'APC. *Med Sci*.2002. 18 (5) : 544-545.
- Borde C, Maréchal V, Barnay-Verdier S. Apport de la biologie moléculaire dans l'identification de nouveaux virus. *Revue Francophone Des Laboratoires*, 2009. (417) : 29-37.
- Bourde-Vacher K, Chaussende F, Meunier A, Pivert G, Vesseron S, Boyer J-C et Sher A. Congrès de l'AACC 2016 (American Association for Clinical Chemistry). *IRBM News*.2017. 38(1): 1-81.
- Burcelin R, Chabo C,Luche É, Serino M, et Corthier G. Les lipopolysaccharides bactériens et les maladies métaboliques. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*.2010. 45(3) : 114 -121
- Catros V. Les CAR-T cells, des cellules tueuses spécifiques d'antigènes tumoraux. *Médecine/sciences*. 2019. 35(4):316-326.
- Chelli D, Dimassi K, Chaabouni M, Moez Ben Saad, Mssaed H, Bchir F , et al . Diagnostic anténatal de la trisomie 21 : expérience du service A du centre de maternité de Tunis .*Semantic scholar*. 2008.18(4) : 199-203.
- Cicolella André. *Cancer du sein. En finir avec l'épidémie*. Edition Les Petits Matins. 2016.
- Clauser Eric et Conchon Sophie. *Biochimie génétique - biologie moléculaire - 300 qcm et exercices*. Masson. 2004.
- Costes Bruno. *Analyse du gène CFTR : application au diagnostic génotypique de la mucoviscidose et à l'étude des corrélations génotype-phénotype*. [Thèse de doctorat].université Paris 12.1996.
- Dahimène F, Durigneux J, Nadaj, A, Mercier S, Péréon Y, et Magot A. Cas clinique 3 : dystrophie musculaire de Becker et atteinte cognitive. *Revue Neurologique*.2018.174 : 169-184.
- Davide P Clark et Nanette J Pazdernik .*Biotechnology: Applying the Genetic Revolution*.1st edition. Amsterdam: Academic pressElsevier.2010.

- Delepech M. La PCR un outil qui a mis la biologie moléculaire à la portée de tous les laboratoires d'analyse médicale. 2021. 205 :387-388.
- Eide M L et Debaque H. Méthodes de détection des HPVs et techniques de génotypage dans le dépistage du cancer du col utérin. *Annales de Pathologie*.32(6) : 401-409.
- Elliott R. Jacobson. *Infectious Diseases and Pathology of Reptiles: Color Atlas and Tax* .1st édition. CRC Press .2007.
- Étienne J et Clauser É. *Biochimie Génétique Biologie Moléculaire* .8^{ème} édition. Masson Éditions. 2004.
- Étienne J, Clauser , houseset C et Roingeard P. *Biochimie génétique biologie moléculaire* .9^{ème} édition. Masson Éditions .2006.
- Faiz I, Itry M. SFP P-064 – Amyotrophie spinale infantile : Cause fréquente des hypotonies congénitales au Maroc. *Archives de Pédiatrie*.2014. 21(5) :774.2014.
- Ferrarini A , Jacquemont S, Beck Popovic M, Bonafé L, Martinet D. Puce à ADN: Pourquoi et pour qui? .*Rev Med Suisse*. 2010.6: 390-396.
- Férec Claude.la mucoviscidose du gène à la thérapeutique. *Medecine/ sciences*. 37(6) : 618-624.2021.
- Forster Peter et Renfrew Colin. *Phylogenetic methods and the prehistory of language*. Edition: McDonald Institute Monographs. 2006.
- Frenkian-Torres A et Toledo M. La biologie moléculaire en diagnostic infectieux. *IRMN News*. 2014. 35(2): 42-53.
- Gullett J C, Nolte F S *Quantitative Nucleic Acid Amplification Methods for Viral Infections*. *Clinical Chemistry*.2014. 61(1) :72-78.
- Hejazian M et Nguyen Li W. Lab on a chip for continuous-flow magnetic cell separation.2015.15 (4):959-970.
- Jublanc C, et Bruckert E. L'insuffisance surrénalienne chez l'adulte. *La Revue de Médecine Interne*.2016.37(12) : 820-826.
- Karkar Adnane. *Leucodystrophies : aspects génétiques et moléculaires au Maroc*. [Thèse de doctorat]. Université Sorbonne Paris.2018.
- Kaplan Jean-Claude et Delpech Marc. *Biologie moléculaire et médecine*. 3^{ème} édition. [Lavoisier msp](#) Éditions. 2007.
- [Katlama](#) C .Qu'est-Ce Que le VIH? *Histoire Naturelle de la Maladie .VIH et sida* 2^{ème} édition. Pages 3-7. 2008.
- Lamoril J, Ameziane N, Deybach J-C, Bouizegarène P et Bogard M. Les techniques de séquençage de l'ADN : une révolution en marche. Première partie. *Immuno-Analyse et Biologie Spécialisée*. 23(5) :260-279.
- Lamzouri Afaf, Natiq Abdelhafid, Tajir Mariam, Sendid Mohamed et Sefiani Abdelaziz. Le diagnostic anténatal de la trisomie 21 par l'hybridation in situ en fluorescence(FISH): à propos des premiers tests réalisés au Maroc. *Pan African Medical Journal*. 2012.13(38): 1-11
- Lamzouri A, Ratbi I, et Sefiani. A. Syndrome de Silver Russell: A propos de 3 cas et revue de la littérature. *Pan African Medical Journal*. 2013.14 :91.
- Laudenbach V, Mantz J et Desmots JM. Comprendre la biologie moléculaire. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*.1999. 18(7) :725-747.
- [Le Guen](#) YT, [Le Gall](#) T, [Laurent](#) , [Arbonneau](#) F, [Braun](#) S et [Montier](#) T. Dystrophie musculaire de Duchenne.*Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*.2021. 205:509-188.
- Leber A, Everhart L, Balada-Llasat K , Cullison JM, Daly J, Holt J et Bourzac S. Multicenter Evaluation of BioFire FilmArray Meningitis/Encephalitis Panel for Detection of Bacteria,

- Viruses, and Yeast in Cerebrospinal Fluid Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*.2016. 54(9): 2251-2261.
- Longeaux Jacque. Le clonage embryonnaire humain à visée scientifique. *Association Nouvelle revue théologique*. 132 :404 – 423.2010.
- Li Y, Oosting M, Deelen P, Ricaño-Ponce I, Smeekens S, Jaeger et Netea M. Inter-individual variability and genetic influences on cytokine responses to bacteria and fungi.*Nature Medicine*. 2016. 22(8):952-960.
- Liesman R, Pritt M, B Maleszewski, J et Patel R . Laboratory Diagnosis of Infective Endocarditis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2017.55(9):2599-2608.
- Malan V, Lapierre JM, Vekemans M, Romana S P. La CGH array : un bouleversement de la pratique hospitalière en cytogénétique. *IRBM* .2007.28 (5-6) :245-251.
- Maréchal V. Southern blot/ Northern blot .EMC Biologie médicale. 2007.Doi:10.1016/S0000-0000(06)47801-3.
- McHugh L, Seldon T, Brandon R, Kirk T, Rapisarda A, Sutherland A et J Brandon. A Molecular Host Response Assay to Discriminate Between Sepsis and Infection-Negative Systemic Inflammation in Critically Ill Patients: Discovery and Validation in Independent Cohorts. *PLOS Medicine*. 2015. 12(12) :1001916.
- [Moalla M](#), [Safi W](#), [Ghorbel D](#), [Al-Mutery AF](#), [Mahfood M](#), [Mejdoub-Rekik N](#), Abid M, Mniffekri M, Kacem Hadj f, et Kacem Hadj H . Séquençage à haut débit de l'exome entier d'une famille Tunisienne atteinte d'Hypogonadisme Hypogonadotrope Congénital Normosmique.*Annales d'Endocrinologie*. 2020. 81: 215-216
- Morange Michel. Histoire de la biologie moléculaire .2^{ème} édition .Paris : La Découverte Éditions.2003.
- Morel F, Jaffré J, Sougakoff W, Aubry A, Véziris N. Place de la biologie moléculaire dans le diagnostic de la tuberculose. *Revue Des Maladies Respiratoires*. 2020. 37:412-416.
- Nicolas Alain. Applications de la technologie des Puces à ADN à l'étude de la différenciation méiotique et des mécanismes de recombinaison chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. [Thèse de doctorat]. Université de Paris 6. 2004.
- Pendleton K M, Erb-Downward J, Bao Y, Branton W, Falkowski N, Newton D et Dickson R. Rapid Pathogen Identification in Bacterial Pneumonia Using Real-Time Metagenomics. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2017. 196(12): 1610-1612.
- Ranjard Lionel, Cuny Philippe, Maron Pierre-Alain, et Verame d'Oiron. La microbiologie moléculaire au service du diagnostic environnemental. ADEME. 2017.
- Rault G, Roussey M, Desrues , Turck D, Perez T, Wallaert B, et Tréguer R. Mucoviscidose : recommandations pour l'organisation des centres et réseaux de soins. *Archives de Pédiatrie*.2001. 8: 802-817.
- Ruppé É, Lisboa T et Barbier F. The gut microbiota of critically ill patients: first steps in an unexplored world. *Intensive Care Medicine*. 2018.44: 1561-1564.
- Saraswathy N et Ramalingam P. Genome mapping. *Concepts and Techniques in Genomics and Proteomics*. 2011.17 : 77-93.
- Schalkwyk LC. YAC and PAC Maps. *Encyclopedic Reference of Genomics and Proteomics in Molecular Medicine*. 2006. 2035-2038.
- Scicluna B, Klouwenberg K, van Vught, Wiewel M , Zwinderman A et H van der Poll. A Molecular Biomarker to Diagnose Community-acquired Pneumonia on Intensive Care Unit Admission. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*.2015. 132:404 - 423.

- Sedel, F., Lyon-Caen, O., et Saudubray J-M. Les maladies métaboliques héréditaires traitables en neurologie. *Revue Neurologique*.2007.163(10) :884-896.
- Sherman D K, Bunyan D P, Creswell J D et Jaremka L M. Psychological vulnerability and stress: The effects of self-affirmation on sympathetic nervous system responses to naturalistic stressors. *Health Psychology*. 2009. 28(5) : 554-562.
- Shuma S. DNA Ligases: Progress and Prospects. *Journal of Biological Chemistr*. 2009. 284(26):17365-17369.
- Szelechowski et A. Saïb. Une nouvelle arme contre le cancer. Bilan sur les virus oncolytiques. *Virologie*. 2005. 9(4):261-271.
- Tagu Denis et Moussard Christian .Principes des techniques de biologie moléculaire. 2^{ème} édition. [INRA](#) Éditions .2003.
- Tauber Maïté. Le syndrome de Prader-Willi. *Annales d'endocrinologie*.2013. 68(8) : 129-137
- Tremblay J et CRISPR. Un système qui permet de corriger ou de modifier l'expression de gènes responsables de maladies héréditaires. *Médecine/sciences*. 2015. 31(11) : 1014-1022.
- Uhel et Zafrani L. Nouvelles techniques de biologie moléculaire. *Méd Intensive Réa*. 2019. 28(6) :464-472.
- Vielh P, Schmitt F C. Cytopathologie moléculaire. Outils et applications. *Annales de Pathologie*.2012. 32(6) : 444-450.
- Vincent Ecochard, Didier Fournier, Laurence Nieto et Laurent Paquereau .Techniques et Stratégies en Biologie Moléculaire Première partie. Université Paul Sabatier – Toulouse. 2011.
- Wilson JM, Gansbacher B, Berns Kl, Bosch F, Kay MA, Naldini L et Wei YQ. Good news on the clinical gene transfer front. *Hum. Gene Ther*. Mai. 2008.19(5): 429-30.
- Wood J B, Sesler C, Stalons D, Grigorenko E, Schoenecker J G et Creech C B. Performance of TEM-PCR vs Culture for Bacterial Identification in Pediatric Musculoskeletal Infections. *Open Forum Infectious Diseases*.2018. 5(6).
- Yves Morin. PETIT LAROUSSE DE LA MEDECINE. 3^{ème} édition. Paris : LAROUSSE. 2002.
- Zanardi A, Bandiera D, Bertolini F, Corsini C, Gregato G, Milani P et al .Carbone, R. Miniaturized FISH for screening of onco-hematological malignancies. *BioTechniques*. 2010.49(1): 497-504.
- Zangrando Jennifer. Implication des ARNs non codants dans l'infarctus de myocarde et le remodelage ventriculaire post-infarctus. [Thèse de Doctorat]. Université de Lorraine.2015.

Sites web

Allard Jacques. Symptômes de l'infarctus du myocarde, personnes à risque et facteurs de risque. Passport Santé.2013. www.passeportsante.net.

Amrouche Idris. Coronavirus : symptômes par ordre d'apparition, diagnostic, traitement, tout ce qu'il faut savoir. Doctissimo. 2020. www.doctissimo.fr.

Aubourg P. Adrénoleucodystrophie liée à l'X. Encyclopédie Orphanet Grand Public.Paris. 2007.www.orphanet.net.

Bellon Gabriel et Desmazes-Dufeu Nadine. La mucoviscidose. Encyclopédie Orphanet Grand Public.Paris.2006. www.orphanet.net.

Benlian Pascale, Bonnefond Amélie, Eladari Dominique, Froguel Philippe, Montagne Louise, Perimenis Pierrette, Vambergue Anne et Vaxillaire Martine. Diagnostic moléculaire et identification de nouveaux gènes impliqués dans les formes monogéniques de diabète et de maladies associées.UMR1283.2015.www.good.cnrs.fr.

Bême David. Cortisol. Doctissimo.2018. www.doctissimo.fr.

Bême Davide. Technique du clonage. Doctissimo.2014. www.doctissimo.fr.

Boulianne France et Milot Alain. Prise en charge systématisée des personnes atteintes d'hypertension artérielle. 4ème édition. Canada Société québécoise d'hypertension artérielle. 2016. www.sqha2.hypertention.qc.ca.

Burnier Michel, Pruijm Menno et Bochud Murielle. Génétique et hypertention artérielle : qu'avons-nous appris ? 2009. www.revmed.ch.

Clément Arthur. Impact des mutations du gène MTHFR en médecine (fertilité notamment) et intérêt de la prise en charge thérapeutique. Gynéco Online. 2019. www.gyneco-online.com.

Cheriyedath Sussha, Southern Blot-Lab Technique Used to Detect Specific Biomolecules. News Medical Life Sciences. 2019. www.news-medical.net.

Daly Patricia A. et Landsberg Lewis. Néoplasies endocriniennes multiples, types 2B (NEM 2B). Le manuel MSD. 2019. www.msmanuals.com.

Della Valle Anne-Christine. Diabète : symptômes, causes, diagnostic, traitements. Le journal des femmes santé.2020. www.sante.journaldesfemmes.fr.

Delobel Bruno. La cytogénétique moléculaire. Etat d'OMSK Médical université Russia.2014. www.eduinrus.ru.

Descamps Diane et Bernard Bichat-Claude. Infection VIH : outils virologiques. INSERM UMR1137.Paris. 2015. www.inserm.fr.

Douablin Alexandre. Extraction d'ADN/ARN. BiomniGene.2017. www.biomnigene.fr.

- Elmouatassim Said. Diagnostic de la mucoviscidose par séquençage de nouvelle génération. Eurofins. 2013. www.eurofins-biomnis.com.
- Favereaux Alexandre. Plateforme Next Generation Sequencing (NGS). Inserm. 2021. www.inserm.com.
- Gary Robbins. Chemistry 'genius' named head of Scripps Research. SignonSanDiego. 22 February 2011. www.signonsandiegouniontribune.com.
- Grossman Ashley B. Maladie d'Addison (insuffisance corticosurrénalienne primaire ou chronique). Manuel MSD. 2020. www.msdmanuals.com.
- H'MIDA-BEN BRAHIM Dorra. Diagnostic en biologie moléculaire de la mucoviscidose (gène CFTR: OLA, séquençage, MLPA). Orphanet. 2015. www.orphanet.net.
- Iglesias Annabelle. Troponine : analyse sanguine, interprétation des résultats. Doctissimo. 2018. www.doctissimo.fr.
- Juneau Martin. Les troubles cardiaques, maladies cardiovasculaires (angine et crise cardiaque). PasseportSanté. 2011. www.passeportsante.net.
- Kikoïne John et Boulestreau Romain. L'hypertension artérielle (HTA) : les recommandations de l'ESC/ESH. CardioOnline. 2018. www.cardio-online.fr.
- Lamirand Clémence. Diabète : symptômes, causes, diagnostic, traitements. LE JOURNAL DES FEMMES SANTE. 2013. www.sante.journaldesfemmes.fr.
- Leblanc Candice. Comment diagnostiquer la mucoviscidose ? MediPedia. 2021. www.fr.medipedia.be.
- Lecomte, Comment identifier un proche avec un ADN? Sciences et avenir. 2015. www.sciencesetavenir.fr.
- Lépine Paul. Le sida. Passeport Santé. 2014. www.passeportsante.net.
- Madre Jean-François. L'action des enzymes de restriction. Plateforme-ACCES. 2016. www.acces.ens-lyon.fr.
- Mennecier Didier. Gros plan sur l'hépatite virale B. HpatowEB. 2010. www.hepatoweb.com.
- Negura Lucian, Carasevici Eugen, Huma Anca-Mihaela et Artenie Vlad. Méthologie actuelles de la biologie moléculaire pour la détection des mutations. ResearchGate. 2006. www.researchgate.net.
- Niccoli-Sire P. et Conte-Devolx B. Cancer médullaire de la thyroïde. Orphanet. 2007. www.orpha.net.
- Plantier Jean-Christophe et Simon François. Diagnostic sérologique des infections à VIH. Développement et Santé. 2002. www.Devsante.org.
- Perron Karl. Extraction des Acides nucléiques. BiOutils. 2007. www.bioutils.ch.

- Ray Marie-Céline. L'infarctus de myocarde. Futura-sciences. 2019. www.futura-sciences.com
- Robert-Ebadi [Helia](#), Becker [François et](#) Righini [Marc](#). Thrombose veineuse profonde du membre supérieur : une forme particulière de maladie thromboembolique veineuse. Revue médicale Suisse.2015. www.revmed.ch.
- Rossant-Lumbroso Jacqueline et Rossant Lyonel. Embolie pulmonaire : symptômes personnes à risques et traitements. Doctissimo. 2019. www.doctissimo.fr.
- Vasseur Francis. Les maladies génétiques "complexes". Clinique de Santé Publique. 2011. www.campus.cerimes.fr.
- Vayssières Emma .Le virus de l'hépatite C : bilan de 30 années de recherche. Planet vie.2019. www.planet-vie.ens.fr.

Annexe

Annexe 1 : Questionnaire

Etat des lieux de l'utilisation actuelle des techniques de la biologie moléculaire dans le domaine médical

1- Intérêt des techniques de biologie moléculaire dans la médecine

- Dans le Diagnostic :

Types de maladies diagnostiquées :

.....
.....

Noms des maladies diagnostiquées :

.....
.....

- Dans le Dépistage :

Maladies dépistées

.....

- Dans la Recherche à visée thérapeutique :

.....
.....
.....

2- Concernant les techniques de biologie moléculaire

Quelles sont les techniques utilisées ?.....

.....
.....

Si c'est une technique de PCR, de quelles variantes s'agit-il ?.....

.....
.....
.....

Le type de technique ou la variante de PCR a-t-elle une relation avec le type de maladie diagnostiquée ou dépistée ?.....

.....
.....
.....

Pour le polymorphisme, quelle est la technique utilisée ?.....

.....
.....
.....

3- Concernant l'échantillonnage

Se fait-il avec ou sans consentement des patients ?

.....
.....

Quelle est la fréquence d'analyse des échantillons (régulièrement, une fois par semaine, par mois, ou plus) ?.....

.....

4- Avantages / Inconvénients des techniques

Spécificité du diagnostic/dépistage.....

.....
.....

Quel est l'élément de la technique qui assure la spécificité vis-à-vis de la maladie diagnostiquée/dépistée ?.....

.....
.....

Durée du diagnostic :

.....
.....

Coût élevé / inaccessibilité du test pour les malades.....

.....

Disponibilité des réactifs utilisés pour les techniques.....

.....
.....

5- Facilités / contraintes de la part des instances étatiques par rapport à l'utilisation des techniques de biologie moléculaire en Algérie (Annaba)

.....
.....

6- Année depuis laquelle les analyses médicales sont effectuées par techniques de biologie moléculaire

.....
.....

7- Par rapport aux pays maghrébins voisins ou aux autre pays arabes somme-nous au même niveau d'utilisation des techniques de biologie moléculaire dans le domaine médical ?

.....
.....