



Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
Université de Constantine 3
Faculté de médecine de Constantine
Département de Pharmacie

TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE EN PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE

Dr. BENLARIBI IMANE HALIMA

Année universitaire : 2023/2024

1. Introduction :

La biologie moléculaire désigne l'**étude des acides nucléique**, ribonucléique (ARN) et désoxyribonucléique (ADN). Ses techniques reposent essentiellement sur l'**hybridation moléculaire**, sur la **réaction de polymérisation en chaîne (PCR)** et sur le **séquençage des acides nucléiques**.

Depuis leur apparition en 1970, elles ont connu un développement exponentiel, et permettent aujourd'hui de recueillir en quelques heures les données à l'échelle du génome entier.

Le diagnostic de la **toxoplasmose, du paludisme, des leishmanioses, des candidoses et des aspergilloses invasives** bénéficie largement de l'apport des outils moléculaires.

2. Limites des techniques classiques du diagnostic parasitologique et mycologique :

2.1. Diagnostic parasitologique direct :

Le diagnostic parasitologique direct par mise en évidence du parasite à l'examen microscopique :

- **Manque de sensibilité**,
- Ne permet pas toujours l'identification de l'espèce,
- Requiert un **personnel entraîné**
- Peu adapté à la détection de parasite tissulaire.

2.2. Les techniques sérologiques :

Les techniques sérologiques sont nombreuses, commercialisées, standardisées, simple à réaliser et automatisées. Elles ont les inconvénients suivants :

- Ne permet pas toujours différentier une infection évolutive d'une immunité ancienne.
- Réactions croisées entre les Helminthes.
- Distinction difficile entre les parasites du même genre.
- Elles sont moins performantes chez les immunodéprimés.

2.3. Techniques mycologiques d'identification :

On distingue 3 groupes de champignons représentés par **les levures, les champignons filamenteux et les champignons dimorphiques**.

- L'identification des levures repose leurs caractéristiques morphologiques et sur l'analyse des caractères biochimiques (assimilation et fermentation des sucres) par des tests standardisés. Bien que ces tests permettent d'identifier avec précision les levures les plus couramment identifiées en pathologie humaine, ils sont insuffisants pour l'identification des levures du genre **Trichosporon**, des associations de levures.
- L'identification des champignons filamenteux est basée exclusivement sur les caractères morphologiques. Certains champignons filamenteux ont **une croissance lente et difficile** sur les milieux standards et ne développent pas tous les critères nécessaires au diagnostic de l'espèce.
- Concernant les champignons dimorphiques leur identification se fait dans des **laboratoires spécialisés** à cause **du risque de contamination du manipulateur** (*Histoplasma sp.*).
- Impossibilité d'obtenir une culture in vitro à partir de prélèvement biologique due à l'inhibition des cultures par **traitement antifongique**.

3. Techniques de biologie moléculaire en parasitologie et mycologie :

Les techniques de biologie moléculaire les plus utilisées actuellement en parasitologie et mycologie médicales sont :

- L'extraction des acides nucléiques,
- La réaction de polymérisation en chaîne (PCR),
- Le séquençage des acides nucléiques,

- Les techniques de génotypage.

3.1. Technique d'extraction des acides nucléiques :

L'extraction des acides nucléiques (AN) constitue une **étape initiale** de l'examen de biologie moléculaire. Son objectif est d'isoler une quantité suffisante d'**AN purifié**.

Les étapes de l'extraction de L'AN à partir d'un prélèvement biologique (sang, LCR, LBA, selles, urines, expectoration, salive, culture...) sont :

1^{ère} étape : Rupture des membranes cellulaires.

2^{ème} étape : Lyse de la cellule ou du germe contenant l'AN à étudier.

3^{ème} étape : Dénaturation des complexes nucléoprotéiques pour libérer les AN.

4^{ème} étape : Inactivation des nucléases libérées qui peuvent dégrader les AN.

5^{ème} étape : Elimination des inhibiteurs de PCR, des protéines et de certaines catégories d'AN...

Les inhibiteurs d'ADN polymérase : leur présence dans l'échantillon donne des **faux négatifs**. Ex : l'hémoglobine et les IgG dans le sang.

6^{ème} étape : Isolement de l'AN cibles qui consiste à la purification de l'AN par précipitation, chromatographie, fixation sur silice...et sa concentration.

3.2. Réaction de polymérisation en chaîne PCR (Mullis, 1985):

La PCR est une technique de biologie moléculaire utilisée pour la **détection d'ADN ou d'ARN**.

3.2.1. PRINCIPE :

Son principe repose sur l'**amplification spécifique d'une séquence nucléotidique** (repérer un fragment d'ADN ou de gène précis, même en quantité infime dans un prélèvement biologique, puis de le multiplier).

Elle est fondée sur l'utilisation d'une **enzyme polymérase** qui permet de recopier à partir des **amorces nucléotidiques** une séquence cible de L'ADN.

3.2.1. ACTEURS DE LA PCR :

- **ADN cible** : sous forme de double brin, contient le fragment à amplifier.
- **Amorces d'ADN (primer)**: des petits fragments complémentaires de chaque brin de la séquence à amplifier, et correspond à une de ses deux extrémités, est un oligonucléotide synthétique d'une longueur de 17 à 30 bases.
- **Taq polymérase** : ADN polymérase thermostable, extraite de la bactérie *Thermus aquaticus*.
- **Précurseurs trinucleotidiques**: dGTP, dATP, dTTP, dCTP (désoxynucléotides_tri_phosphates), qui sont utilisés par la Taq polymérase pour synthétiser les brins d'ADN complémentaires.

3.2.2. TECHNIQUE :

La technique de PCR est constituée d'une trentaine de cycles chacun d'eux comportant 3 étapes :

- Dénaturation thermique,
- Hybridation des amorces,
- Extension (Elongation) des amorces.

Tous les éléments nécessaires à la réaction sont regroupés dans un tube qui sera placé dans un **thermocycleur** qui permet de monter à la température qui correspond à chaque étape rapidement.

Chaque cycle dure 1 à 3 minutes selon le type de l'appareillage.

3.2.2.1. Dénaturation thermique :

Le tube est chauffé quelques secondes à **95°C**. Cette étape consiste à la **séparation par la chaleur des deux brins d'ADN** en rompant les liaisons hydrogènes.

3.2.2.2. Hybridation des amorces :

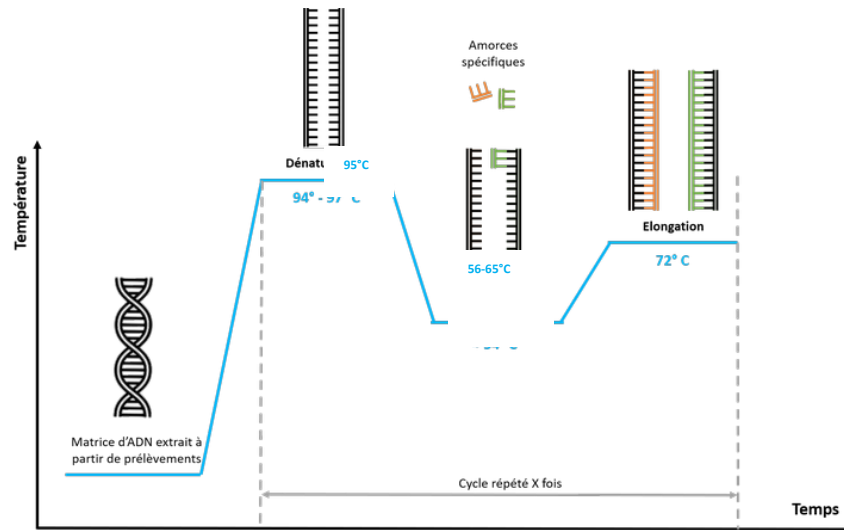
La température est rapidement abaissée à **56-65°C**. Les **amorces s'hybrident** sur leur séquence complémentaire sur les simples brins d'ADN cible.

3.2.2.3. Extension des amorces :

La température est augmentée à **72 °C**, ce qui permet à la **Taq polymérase d'ajouter des nucléotides** (complémentaire à la séquence cible) aux amorces hybridées, dans le sens 5' vers 3'.

A la fin du premier cycle, deux copies de la séquence d'ADN cible sont obtenue. Dès le **3ème cycle** apparaissent les **amplicons**, ADN double brins borné par les amorces (copies du fragment d'AND cible).

A la fin des 30 cycles (1 h 30 à 4 h), **2³⁰ copies** de la séquence cible sont générées.



3.2.3. TYPE DES TECHNIQUES PCR :

3.2.3.1. PCR en point final "PCR conventionnelle ou classique" :

La détection à **partir du produit final** de la réaction. Elle est de moins en moins utilisée au profit de la PCR en temps réel mais néanmoins elle reste la technique de référence pour la détection de certains microorganismes.

3.2.3.2. PCR en temps réel ou RT-PCR ou PCR quantitative ou qPCR :

Consiste à **mesurer la quantité d'ADN polymérisé à chaque cycle** grâce à l'utilisation d'amorces ou de **sondes fluorescentes**.

3.2.3.3. PCR multiplex :

Elle permet l'**amplification de plusieurs cibles** simultanément dans le même tube en utilisant **plusieurs couples d'amorces**.

3.2.3.4. Nested PCR (PCR nichée) :

Est une PCR en deux étapes :

- 1ère étape : PCR classique.
- 2ème étape : amplification de l'amplicon à l'aide d'un nouveau couple d'amorces.
- Elle permet d'augmenter la sensibilité (deux PCR successives) et la spécificité de la méthode (utilisation de deux couples d'amorces).

3.2.4. Avantages et inconvénients :

Avantage :

- Technique rapide, sensible et spécifique.
- Ces applications sont nombreuses : recherche de parasites, champignons, virus, oncogène...

Inconvénients :

- Nécessite des **conditions optimales** : amorces, température, nombre de cycles...
- **Inhibiteur de PCR.**
- **Risque de contamination** : produit amplifié contamine un tube prêt à être amplifié donnant un faux positif.

3.3. Technique de séquençage d'AN :

Il consiste à déterminer la **succession** des nucléotides sur l'ADN.

3.3.1. Principaux types des techniques de séquençage :

3.3.1.1. Séquençage type Sanger :

Il s'agit d'une méthode de **synthèse enzymatique sélective** d'où on part d'un **ADN simple brin** dont on connaît au moins une partie de la séquence.

Technique :

1^{ère} étape :

La synthèse d'un brin complémentaire d'un brin cible à l'aide d'une **polymérase** à partir d'une **amorce**, en présence de **4 désoxyribonucléotides** et une faible concentration de **4 didésoxyribonucléotides** (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) dont chacun est marqué par un **fluorochrome de couleur différente** qui jouent le rôle de **terminateur de chaîne** (stopper la polymérisation).

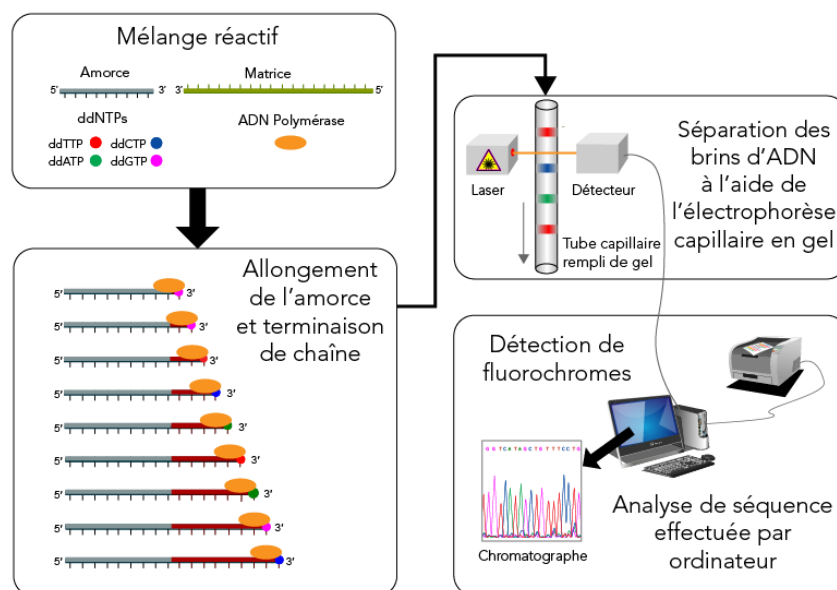
Donc un mélange de brins d'ADN complémentaires est rajouté au brin d'ADN qu'on souhaite séquencer et qui vont tous varier en longueur d'une paire de base.

Chacun de ces brins nouvellement synthétisé va produire une couleur spécifique selon le didésoxyribonucléotide terminal.

2^{ème} étape :

Migration de l'ensemble de ces brins dans un capillaire associé à un détecteur. Les brins vont migrer dans le capillaire selon leur taille (du plus petits au plus gros).

En enregistrant de la fluorescence en fonction de temps, on va pouvoir associer à chaque couleur une des 4 bases et ainsi construire la séquence.



3.3.1.2. Séquençage haut débit (SHD OU NGS):

Elle permet d'obtenir des millions de séquences de l'ordre d'une centaine de paires de bases. Elle ne séquence que des brins d'ADN. Les études de transcriptome doivent être précédées par une extraction de l'ARN suivie *reverse transcription* en ADN.

– **Les principales techniques de SHD :**

- **L'étude du génome complet :**

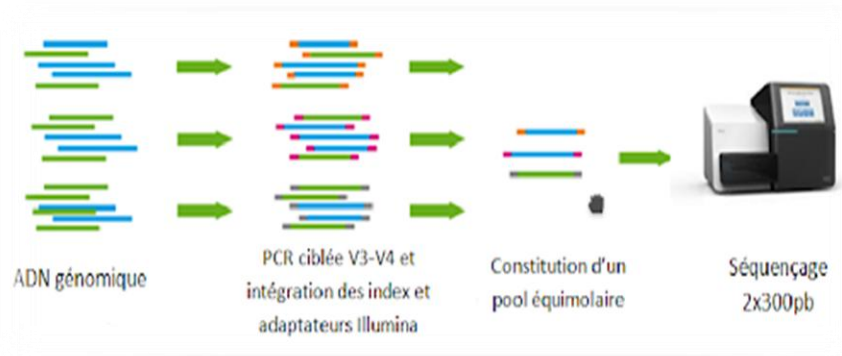
Consiste à séquencer l'ensemble de l'ADN présent dans le prélèvement.

- **L'étude du génome ciblé :**

Consiste à séquencer l'ensemble de l'ADN après une première PCR plus ou moins ciblée.

3.3.1.3. La lecture :

L'analyse consiste à comparer les millions de brin d'ADN à un génome ou séquence d'ADN dans la base des données.



3.3.2. Technique de génotypage :

Les techniques de génotypage sont fondées sur l'analyse du polymorphisme génétique d'un individu d'une même espèce.

Deux types majeurs de polymorphisme sont utilisés comme marqueurs génétique des parasites et des champignons :

- Le polymorphisme nucléotidique,
- Le polymorphisme de longueur des microsatellites.

3.3.2.1. Le polymorphisme nucléotidique :

Il correspond à une **variation d'un seul nucléotide** à un endroit précis du génome.

Deux méthodes sont disponibles pour mettre en évidence le polymorphisme nucléotidique :

- **PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism):**

Elle analyse le polymorphisme des fragments d'ADN de différentes tailles, obtenus après action de différentes enzymes de restriction (restriction intragénique).

- **MLST (multi locus sequence typing):**

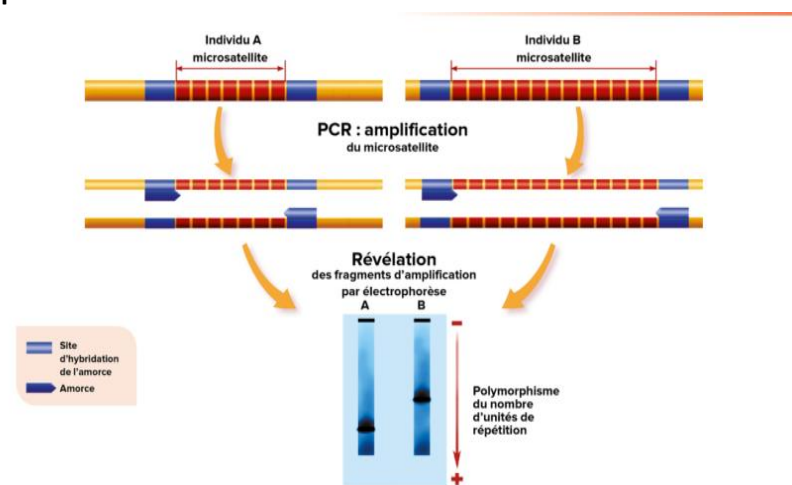
Elle est fondée sur le séquençage d'ADN, elle analyse des séquences nucléotidiques de **plusieurs loci** codant des fragments de **gène de ménage**, non soumis à des pressions de sélection qui modifient l'interprétation des relations entre les souches.

3.3.2.2. Le polymorphisme de longueur des microsatellites :

Les microsatellites : sont des répétitions en tandem d'un court motif de bases nucléotidiques (1 à 10 nucléotides).

La mise en évidence ce type de polymorphisme se fait en deux étapes :

- **Amplifier par PCR** la séquence d'ADN contenant le microsatellite.
- **Analyse électrophorétique.**



Paire d'amorces spécifiques bordant le microsatellite => Marqueur microsatellite

4. Apport de la biologie moléculaire en parasitologie :

La PCR et ses variantes ont été largement utilisées pour détecter l'ADN parasitaire à partir de prélèvements biologiques variés (sang, LBA, LCR, liquide amniotique, humeur aqueuse, biopsie...).

Les méthodes moléculaires sont appliquées dans :

- Le diagnostic de certaines parasitoses,
- Recherche de marqueurs moléculaires de résistance aux médicaments,
- Le typage des parasites.

4.1. Diagnostic de parasitoses :

4.1.1. Toxoplasmose :

a. Toxoplasmose congénitale :

– Diagnostic anténatal :

Elle permet un **diagnostic précoce** par détection de l'ADN toxoplasmique par technique PCR dans le **liquide amniotique**. Le résultat est obtenu en 24 à 48 heures (6 semaines pour l'inoculation à la souris).

La PCR est un examen **indispensable**.

– Diagnostic postnatal :

La PCR est pratiquée sur le **placenta**, couplée à la sérologie du nouveau-né.

b. Toxoplasmose du sujet immunodéprimé :

– Sida :

La détection de l'ADN toxoplasmique dans le **LCR, le sang, la moelle osseuse et le LBA** par technique PCR est un **examen essentiel** pour le diagnostic des formes sévères.

– Greffe de moelle osseuse ou transplantation d'organe (cœur, rein, foie):

La PCR est un **examen essentiel** pour le diagnostic chez le greffé par détection de l'ADN dans le **sang, moelle osseuse et biopsie du greffon**.

c. Toxoplasmose oculaire :

Détection de l'ADN toxoplasmique dans l'humeur aqueuse par PCR principalement chez les sujets immunodéprimés.

4.1.2. Paludisme :

- La PCR sur le sang est une **technique complémentaire** des méthodes conventionnelles du diagnostic (frottis sanguin, gouttes épaisses et QBC).
- La PCR facilite le diagnostic d'une espèce difficile sur frottis sanguin lors de modification morphologique sous l'effet du traitement.
- La PCR est **plus performante** pour mettre en évidence des **associations d'espèce**.

4.1.3. Leishmaniose viscérale :

- La PCR sur le **sang ou la moelle osseuse** à un intérêt dans le **diagnostic et le suivi post thérapeutique**, elle a l'avantage de sa **sensibilité et rapidité**.

c.1.4. Trypanosomoses américaine ou maladie de Chagas :

La PCR permet un **diagnostic précoce de la maladie congénitale** que la sérologie.

La PCR est devenue **extrêmement utile** durant la **phase chronique de la maladie**.

c.1.5. Amœbose :

La PCR est la **technique de référence** pour distinguer *Entamoeba histolytica* (pathogène) de *I.E. dispar* et *I.E. moshkovski* (non pathogènes).

4.2. Recherche de marqueurs moléculaires de résistance aux médicaments :

La mise en évidence de **polymorphismes nucléotidiques** associés à la résistance dû à *P. falciparum* aux antipaludiques.

4.3. Typage parasitaire :

Les techniques moléculaires sont massivement utilisées pour le typage des parasites, au niveau du **genre, de l'espèce voire de la souche** :

- Souches de *Toxoplasma gondii*,
- Espèces et souches de *Leishmania*,
- Espèces d'amibes : différencier *Entamoeba histolytica* de l'*E. dispar* et de l'*Moshkovski*,
- Génotype de *Giardia duodenalis* et *Dientamoeba fragilis*,
- Espèces de **microsporidies** et de *Cryptosporidium*,
- Espèces et génotypes de *Trichinella*.

d. Apport de la biologie moléculaire en mycologie :

d.1. Diagnostic :

Les techniques de biologie moléculaire permettent d'identifier avec précision les espèces de champignons et de diagnostiquer plus **précocement les infections fongiques invasives dues aux levures du genre *Candida* et aux moisissures du genre *Aspergillus***.

d.2. Exploration des mécanismes de résistance aux antifongiques :

La recherche des **mutations associées à la résistance**, acquise sous traitement ou d'origine environnementale.

Ex : Résistance aux azolés de l'*Aspergillus fumigatus*, résistance acquise des levures du genre *Candida* aux échinocandines

d.3. Enquête épidémiologique :

Le typage moléculaire d'isolats de l'environnement et de malades permet de définir **le mode de transmission et la source des épidémies fongiques nosocomiales** (candidoses et aspergilloses).

Bibliographie :

1. Nedjma Ameziane, M. Bogard, J. Lamoril. Principe de biologie moléculaire en biologie clinique.
2. ANOFEL. Parasitologie et mycologie médicale. Guide des analyses et pratiques diagnostiques.
3. Guillaume V. fiches pratiques parasitologie sanguine.
4. Bessières M-H et al. Apport de la biologie moléculaire au diagnostic des parasitoses. Elsevier SAS. Médecine et maladies infectieuses 35(2005) S52-S53.
5. Paugam A. Application de la biologie moléculaire au diagnostic de la toxoplasmose et d'autres protozooses. Elsevier, Paris. Revue française des laboratoires,1999, N°315.
6. Cassaing S. et al. Biologie moléculaire et quantification : application en parasitologie. Elsevier, Paris. Revue française des laboratoires,2002, N°351.
7. Bougnoux M-E. Nouvelles applications des techniques de biologie moléculaire en mycologie médicale. Elsevier, Paris. Revue française des laboratoires,2003, N°351.
8. Paugam A. Apports et limites de la biologie moléculaire en mycologie médicale. Elsevier, Paris. Revue française des laboratoires,1999, N°315.
9. Vassias I. Principe de l'amplification en chaîne par polymérase. EMC biologie médicale 2012 ;7(1):1-5 [article 90-60-001-A].
10. Meziane N. Bogard M., Lamoril J. Principe de biologie moléculaire et biologie clinique. 2005.