



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Projet de Fin d'Etudes

Licence Sciences & Techniques
Sciences Biologiques Appliquées et Santé
(LST - SBAS)

**Techniques de biologie moléculaire utilisées
pour la détection du SARS-COV-2**

Présenté par : TOUZANI Fayrouz

Encadré par : Pr TAZI Adelali (FST Fès)

Dr EL MOUHI Hinde (Laboratoire BIOCENTRE-Tanger)

Soutenu le : Le 06 juillet 2021

Devant le jury composé de :

- **Pr TAZI Adelali (FST Fès)**
- **Pr AZZOUZI Amal (FST Fès)**

Stage effectué à : Laboratoire de biologie moléculaire BIOCENTRE-Tanger)

Année universitaire 2020-2021

Dédicace

À mes parents

Grâce à leurs encouragements et à leurs sacrifices, j'ai pu poursuivre mes études. Aucune dédicace ne pourrait exprimer mes respects, mes considérations et mes profonds sentiments affectueux envers eux. Qu'ils trouvent dans ce modeste travail l'expression de mes reconnaissances pour le soutien qu'ils n'ont cessé de m'apporter.

À tous mes professeurs

Leur disponibilité, les conseils qu'ils n'ont cessé de nous prodiguer et leurs soutiens m'obligent à leur témoigner mon profond respect et ma haute considération.

À tous mes amis et collègues

En souvenir de nos éclats de rire et des bons moments. En souvenir de tout ce qu'on a vécu ensemble. J'espère de tout mon cœur que notre amitié durera éternellement. Vous allez trouver ici le témoignage d'une fidélité et d'une amitié sincères.

À Toute la promotion de la licence SBAS 2020/2021

Remerciement

*Au terme de ce travail, je tiens d'abord à remercier chaleureusement mon encadrante de projet de fin d'étude, Dr **El MOUHI Hinde**, J'ai eu le privilège de travailler parmi votre équipe et d'apprécier votre sérieux, vos qualités et vos précieux conseils. Veuillez trouver ici l'expression de ma respectueuse considération et ma profonde admiration pour toutes vos qualités humaines.*

*Je remercie profondément Le professeur **Tazi Abdelali** d'accepter d'être mon encadrant du projet de fin d'étude.*

*Je remercie profondément Dr **AL ASRI Anasse**, Directeur du laboratoire d'analyse médicale **BIOCENTE**, je tiens à vous exprimer mes vifs remerciements de m'avoir donné l'occasion d'élaborer mon projet de fin d'études au sein de votre laboratoire.*

*Je tiens à remercier sincèrement le Professeur **AZZOUZI Amal**, de m'avoir honorée d'acceptant de juger mon présent travail. Veuillez trouver ici le témoignage de mes respects.*

Une tendre pensée pour mes parents, pour leur patience, leur présence à mes côté et leur contribution à l'élaboration de ce travail.

*J'adresse aussi mes remerciements à toute l'équipe du laboratoire d'analyse médicale **BIOCENTRE** pour leurs soutiens pendant toute la période du stage.*

Enfin, je remercie toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Table des matières

Dédicace	
Remerciements	
Liste des Figures et des Tableaux	
Liste des Abréviations	
Introduction Générale.....	1
Chapitre 1: Maladie COVID-19.....	2
I. Définition et historiques.....	2
II. Virus SARS-COV-2.....	2
1. Structure et morphologie du SARS-COV-2.....	2
2. Organisation génomique du SARS-COV-2.....	3
3. Cycle virale de SARS-COV-2.....	4
3.1.Liaison de SARS-COV-2 et pénétration dans cellule.....	4
3.2.Synthèse des composants du virus, assemblage et sortie de particules virales néosynthétisées.....	5
III. Physiopathologie de SARS-COV-2.....	6
IV. Symptomes.....	6
V. Diagnostic.....	7
1. Signes cliniques.....	8
2. Signes biologiques.....	8
3. Complication de la maladie COV-19.....	9
VI. Diagnostic moléculaire du Covid-19.....	9
1. RT-PCR en temps réel.....	9
2. PCR rapide.....	9
3. Test Anti-génique.....	10
VII- Vaccins contre SARS-COV-2.....	12
Chapitre 2 : Techniques de biologie moleculaire utilisees pour la detection de sars-cov-2.....	13
I. Extraction des acides nucléiques.....	13
1. Technologies d'extraction des acides nucléiques.....	13
1.1.Extraction organique.....	13
1.2.Extraction sur colonne.....	13
1.3.Extraction magnétique.....	13
2. Extraction de l'ARN du SARS-COV-2 par kit MagaBio.....	13
2.1-Etapes d'extraction.....	14
II. PCR.....	14
1. Principe.....	14
2. Historiques.....	15
3. Acteurs de la PCR.....	16
3.1.Acide désoxyribonucléique contenant le segment à amplifier.....	16
3.2.Amorces sens et anti-sens.....	16
3.3.ADN polymérase.....	17
3.4. Nucléotides dNTPs	17
3.5.Magnésium (Mg ⁺⁺).....	17
3.6.Notion de temperature de fusion.....	17
4. Réaction de la PCR.....	18
5. Migration électrophorese et révélation.....	18
6. Avantages.....	19
7. Limites de la PCR.....	19

III . RT-PCR.....	19
1. PRINCIPE.....	19
2. Interet de la RT-PCR en temps réel.....	20
3. Réalisation pratique.....	20
4. Application de la RT-PCR dans la détection de SARS-COV-2.....	20
4.1. Technologies de détection.....	21
4.2 Agents se liant à l'ADN double brin : SYBR Green I.....	21
4.3 Hydrolyse de sondes : Taqman.....	23
IV. PCR rapide	24
1. Principe.....	24
2. Application.....	24
V . test antigénique.....	26
1. Principe.....	26
2. Application.....	26
Chapitre 3 : partie pratique	27
I. Méthode.....	27
1. <i>RT-PCR en temps réel.....</i>	<i>27</i>
1.1 Extraction de l'ADN	27
1.2 Préparation de Mix	28
1.3 Lancement de la RT-PCR.....	29
2. <i>PCR rapide.....</i>	<i>30</i>
3. <i>Test Antigénique.....</i>	<i>30</i>
II. Résultat.....	31
1- <i>Résultat de la RT-PCR en temps réel.....</i>	<i>31</i>
2- <i>PCR rapide.....</i>	<i>31</i>
3- <i>Test antigénique.....</i>	<i>31</i>
III. DISCUSSION.....	32
IV. CONCLUSION	
V. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	33

Liste des figures

Figure 1: Structure du SARS COV 2

Figure 2: Structure d'ARN du virus SARS COV 2

Figure 3: Attachement du SARS COV 2 a la cellule hôte via récepteur ACE2

Figure 4: Processus de pénétration de SARS COV 2 dans la cellule hôte

Figure 5: Synthèse des composants de virus par l'utilisation de machinerie de la cellule hôte

Figure 6: Principe du teste antigénique

Figure 7: Dénaturation de l'ADN

Figure 8: Etape de la RT-PCR

Figure 09: Agent se liant al ADN double brin

Figure 10: Sonde d'hydrolyse Taqman

Figure 11: ID NOW COVID-19

Figure 12 : Test rapide de dépistage du nouveau coronavirus (SARS-Cov-2), utilisé par le Laboratoire BIOCENTRE

Figure 13 : Extraction des acides nucléiques

Figure 14: Microplaque Thermo Faste 96 puits

Figure 15: Modèle graphique de la PCR en temps réel ou l'intensité de la fluorescence est exprimé en fonction du nombre de cycle seuil

Liste des Abréviations

Ac : Anticorps.

ADN : Acide désoxyribonucléique.

Ag: antigène.

ARN : Acide ribonucléique

ARNm: Acide ribonucléique messenger, ARN messenger.

ARNt : Acide ribonucléique de transfert, ARN de transfert.

ARNr : Acide ribonucléique ribosomiaux, ARN ribosomiaux....

COVID-19 : Coronavirus disease 2019

CI : Candidose invasive.

Cq : Valeur de quantification du cycle

CT : Valeur du cycle seuil

dNTP: DésoxyNucléotide-Triphosphate

Kb : Kilobase.

RT-PCR : Réaction de transcription inverse et de polymérisation en chaîne

RTase : Reverse transcriptase.

SARS-CoV-2:Syndrome respiratoire sévère aigu du Coronavirus

Pb : Paire de bases.

PCR : Polymérase Chain Réaction.

Tm: Melting temperature.

INTRODUCTION GENERALE

Déclenchée en décembre 2019 au centre de la chine, la pandémie du Covid 19 a atteint 186 pays au premier avril 2020, causant la contamination de plusieurs millions et de décès (1).

Comme c'est le cas dans plusieurs pays, le Maroc a adopté un confinement total suite à la propagation alarmante du virus, en plus il a suivi une stratégie basée sur le diagnostic précoce qui consiste à tester et isoler les personnes contaminées (1).

Les stratégies efficaces de tests reposent sur des résultats obtenus dans un délai d'exécution rapide, à partir des tests de diagnostic précis et fiables. Ils fournissent des informations essentielles pour la surveillance des maladies et les interventions ciblées pour les communautés qui en ont le plus besoin. Ces tests peuvent également aider les systèmes de santé à gérer les ressources dans les structures hospitalières.

L'objectif de notre stage consiste à explorer les différentes techniques qui permettent le diagnostic de contamination par le Sars-CoV-2 et particulièrement les techniques de biologie moléculaire les plus utilisées en laboratoire d'analyses médicales.

Le présent travail est organisé en trois parties principales.

La première partie est consacrée à une revue bibliographique concernant la pandémie Covid-19, SARS COV-2 et son cycle de vie.

La deuxième partie est consacrée à différentes techniques de biologie moléculaires utilisées pour la détection du SARS-COV-2.

La dernière partie traite la partie expérimentale que nous avons réalisée au Laboratoire BIOCENTRE de Tanger.

CHAPITRE I : MALADIE COVID-19

I. Définition et Historique

Covid-19 fait référence à « Coronavirus Disease 2019 », est une maladie causée par le coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS-CoV-2), Cette maladie infectieuse est une zoonose, dont l'origine est encore débattue, apparait pour la première fois à Wuhan, en Chine, le 31 décembre 2019, et déclaré comme pandémie, le 11 Mars 2020, par l'organisation mondiale de santé (1). Suite à sa propagation rapide dans le monde entier, en 09 Juin 2021, plus de 173 millions cas sont confirmés positifs à l'échelle mondiale, y compris plus de 3 millions décès(2).

Le virus se transmet par contact direct avec les gouttelettes respiratoires produites par une personne infectée (lorsqu'elle tousse ou éternue) et au contact des surfaces contaminées par le virus. Le virus du COVID-19 peut survivre sur les surfaces pendant plusieurs heures, mais de simples désinfectants peuvent le tuer.

Les symptômes de la maladie COVID-19 peuvent inclure de la fièvre, de la toux et un essoufflement. Dans les cas les plus graves, l'infection peut provoquer une pneumonie ou des difficultés respiratoires. Plus rarement, la maladie peut être mortelle.

Ces symptômes sont comparables à ceux de la grippe (influenza) ou d'un rhume banal, des maladies beaucoup plus courantes que le COVID-19, d'où la nécessité de procéder à des examens afin de confirmer qu'une personne est bien atteinte du COVID-19.

Dans tous les cas, il est important de se rappeler que les principales mesures de prévention restent les mêmes : il convient de se laver fréquemment les mains et d'observer une hygiène respiratoire (se couvrir la bouche et le nez avec le pli du coude ou un mouchoir en cas de toux ou d'éternuement, puis jeter le mouchoir dans une poubelle fermée)(3).

II. Virus SARS-COV-2

1. Structure et morphologie du SARS-CoV-2

Les coronavirus sont des virus sphériques enveloppés d'un diamètre de 80 à 120 nm. La capsid virale formée par la nucléoprotéine (N) et le génome est contenue dans l'enveloppe et est de symétrie hélicoïdale. A la surface des particules sont enchâssées trois protéines structurales, la protéine de membrane M, la protéine d'enveloppe E et la protéine S. La protéine S, également nommée Spike, donne cet aspect de couronne en microscopie électronique et le nom de cette

famille virale (Figure 1), elle est responsable l'attachement et la fusion du virus avec la membrane de la cellule hôte.

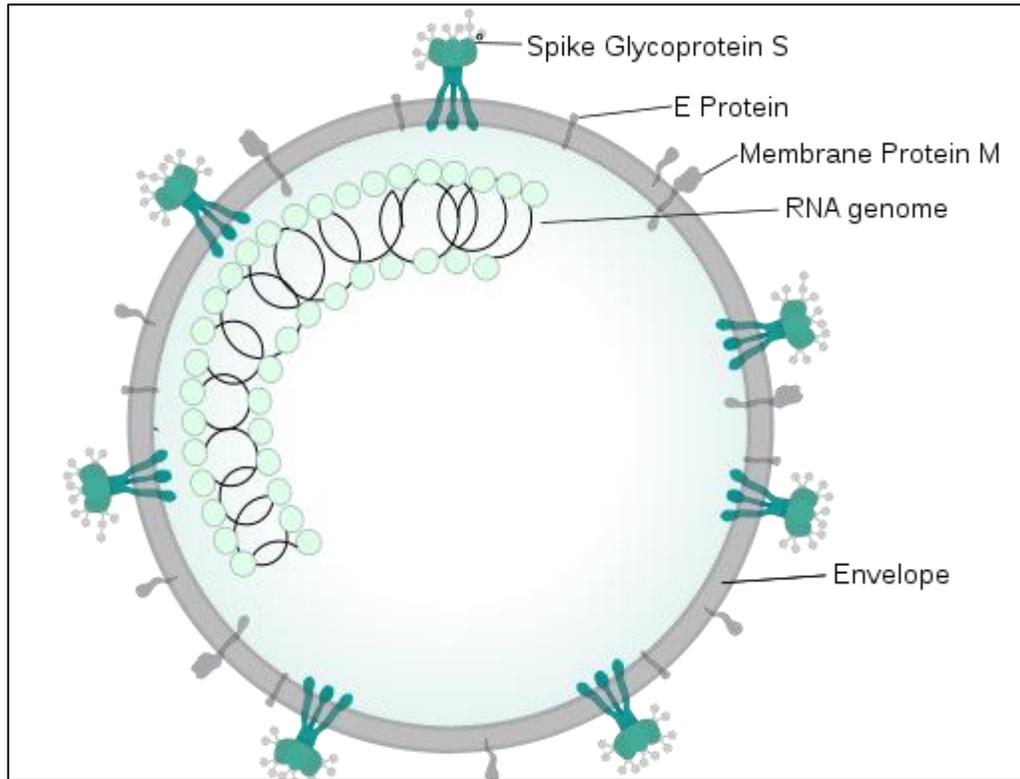


Figure 1 : Structure du SARS COV 2.

2. Organisation du génome du SARS-CoV-2

Le génome du SARS-COV-2 est un ARN simple brin de polarité positive de 30 kb, qui le classe parmi les plus grands génomes de virus à ARN connus. Le génome possède une extrémité 5' coiffée et une queue polyadénylée (polyA) en 3'. L'extrémité 5' contient également une séquence régulatrice de transcription (*transcriptional regulatory sequence* TRS) leader et une région non traduite (*untranslated region* UTR) contenant plusieurs structures secondaires nécessaires à la réplication et à la transcription. Des structures ARN indispensables à la réplication et à la synthèse d'ARN viral sont également présentes dans l'UTR de l'extrémité 3'. Plusieurs cadres ouverts de lecture sont présents. Deux cadres ouverts de lecture ORF1a et ORF1b (*Open Reading Frame*) chevauchant s'occupent les deux premiers tiers du génome. Ils codent des poly-protéines clivées en 16 protéines non structurales nécessaires à la réplication virale (Figure 2).

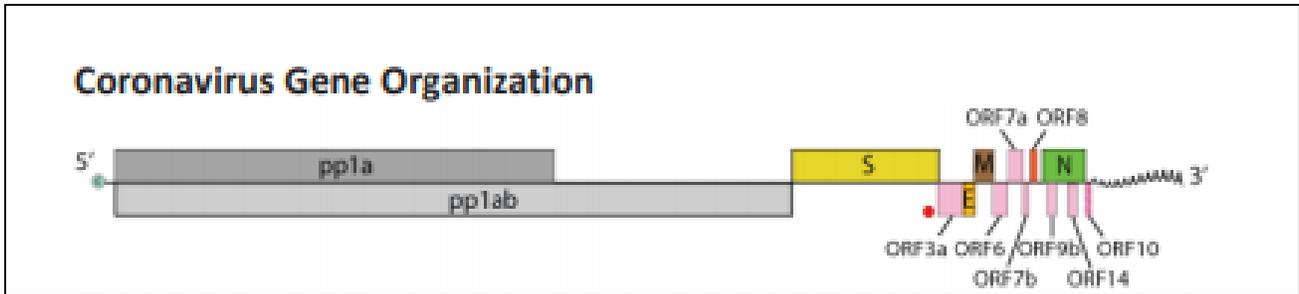


Figure 2 : Structure d'ARN du virus SARS-COV-2

3. Cycle viral de SARS-COV-2

3.1. Liaison de SARS-COV-2 et pénétration dans la cellule

Le virus est un pathogène intracellulaire obligatoire, et doit pénétrer dans une cellule hôte pour pouvoir se multiplier (on parle de réplication). La première étape de ce processus est donc l'entrée du matériel viral dans le cytoplasme après avoir franchi la membrane cellulaire. L'étape d'entrée débute par l'attachement de la particule virale à la surface de la cellule. Celle-ci repose sur l'interaction entre les spicules à la surface de la particule virale (protéine S du SARS-CoV-2) et la glycoprotéine angiotensine-converting enzyme 2 (ACE2) qui agit en tant que récepteur d'entrée (Figure 3).

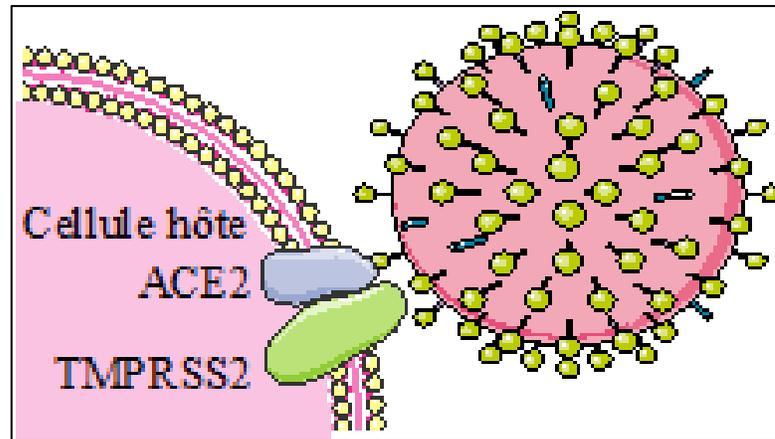


Figure 3 : Attachement du SARS COV 2 a la cellule hôte via récepteur ACE2

Après la fixation à l'ACE2, le spicule virale (S) est coupé en deux parties par une protéase (enzyme qui coupe les protéines) de la cellule hôte. Cet évènement moléculaire est nécessaire pour exposer une partie de la séquence polypeptidique de S appelée « peptide de fusion » qui s'insère dans la membrane cellulaire. S'ensuit par un rapprochement entre l'enveloppe du virus et la membrane cellulaire, toutes deux formées par une bicouche lipidique qui fusionneront.

Parmi ces protéases, la molécule TMPRSS2 qui est présente à la surface de la cellule permet la fusion du virus avec la membrane plasmique de la cellule hôte.

Le virus peut également entrer par « endocytose »: la fixation de Spike à ACE2 va induire une invagination de la membrane plasmique, englobant le virus qui rentre dans un « endosome » où une protéase, activée par l'acidité de ce compartiment, permettra de déclencher la fusion entre la membrane endosomale et la membrane virale. La fusion entre les membranes cellulaires et virales libère l'ARN viral dans le cytoplasme cellulaire où se met en place la réplication du virus (Figure 4).

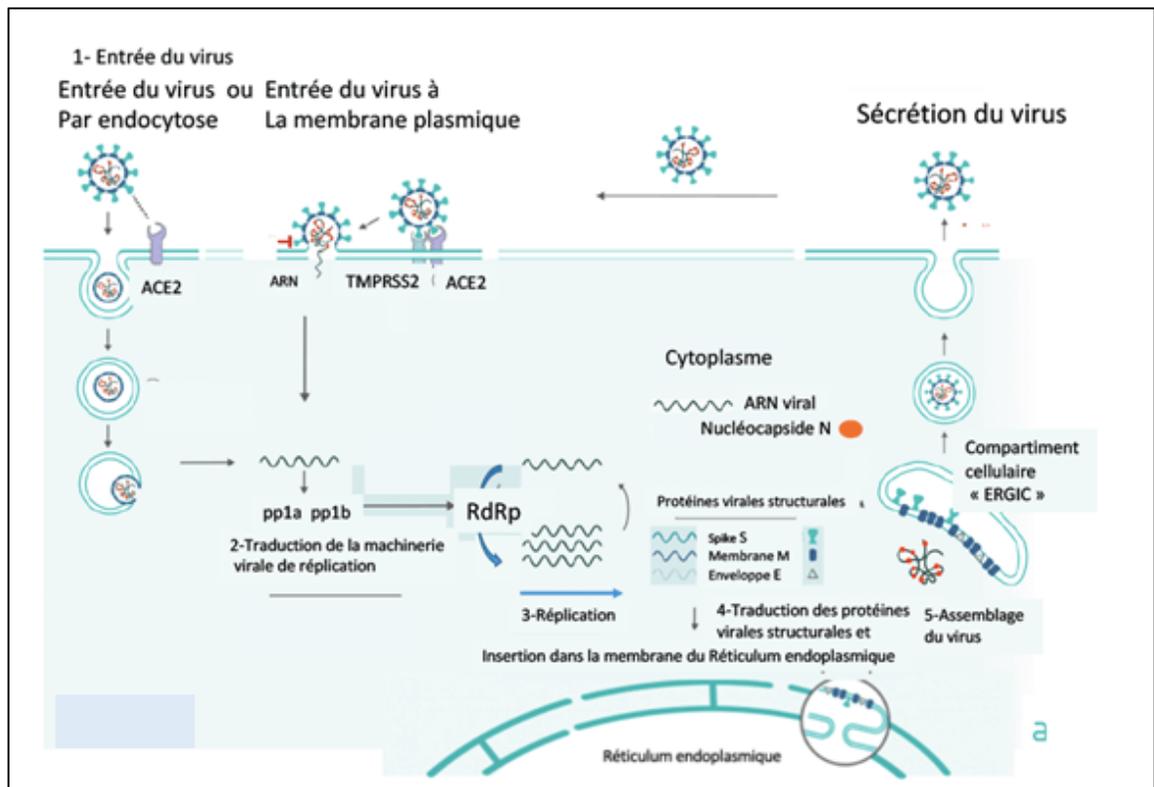


Figure 4: Processus de pénétration de SARS COV 2 dans la cellule hôte

La présence du récepteur viral est un déterminant majeur de la reconnaissance spécifique entre le virus et l'hôte (ou tropisme), c'est-à-dire la cellule, le tissu ou même l'espèce animale dans laquelle le virus peut se multiplier. SARS-CoV-2 peut donc infecter les cellules humaines exprimant ACE2 : cellules du poumon, des artères, du cœur, des reins et de l'intestin (4).

3.2. Synthèse des composants du virus, assemblage et sortie de particules virales néo-synthétisées.

Une fois à l'intérieur de la cellule hôte, le virus va détourner les processus cellulaires (on parle aussi de machineries) de production de protéines (traduction) au profit de la synthèse de ses

propres composants. L'ARN viral est traduit par les ribosomes (usines où l'ARN messenger contenant l'information génétique est converti en protéine fonctionnelle). Ce processus met en jeu les ARN de transfert cellulaires (ARNt) qui mettent en correspondance un « codon » de trois nucléotides et un acide aminé donné (Figure 5) (4).

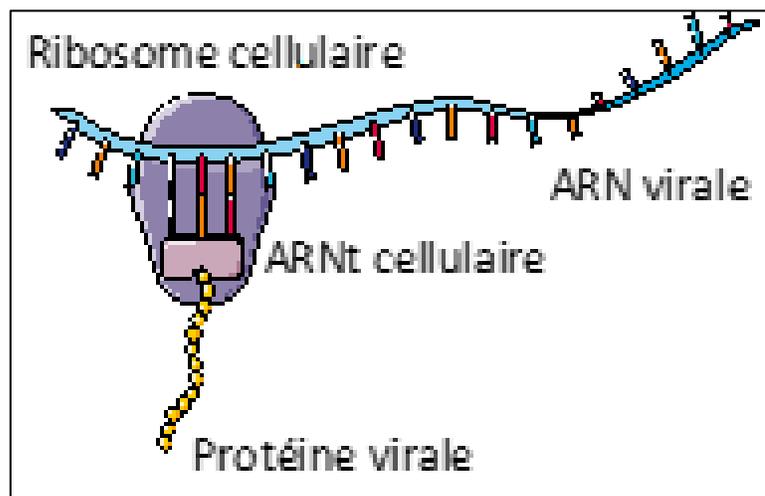


Figure 5: Synthèse des composants de virus par l'utilisation de machinerie de la cellule hôte.

III. Physiopathologie de SARS-COV-2

Le SARS-CoV-2, comme le SARS-CoV-1, utilise l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 (ACE2) comme récepteur cellulaire principal afin de pénétrer dans la cellule hôte. Après une incubation de cinq jours environ, 70 % des patients infectés développent une toux, de la fièvre, ou une dyspnée. Cette phase d'invasion virale est suivie, chez certains patients, d'une réaction immunitaire inadaptée marquée par l'aggravation de la symptomatologie respiratoire, et du syndrome inflammatoire, en général huit à dix jours après les premiers symptômes. Cette phase dysimmunitaire, parfois appelée orage cytokinique, peut être associée à une coagulopathie, l'ensemble correspondant, pour certains auteurs, à un sepsis viral. Dans les sepsis bactériens, la réaction inflammatoire, délétère et responsable de dommages organiques, est particulièrement difficile à explorer, ce qui peut expliquer le nombre important de travaux concernant l'orage cytokinique dans la COVID-19(5).

IV. Symptômes SARS-COV-2

Les sujets qui ont une infection à COVID-19 peuvent n'avoir que peu ou pas de symptômes, bien que certains patients soient gravement malades et décèdent. Les symptômes peuvent comprendre :

- ✓ Fièvre
- ✓ Toux
- ✓ Essoufflement ou difficultés respiratoires
- ✓ Frissons ou tremblements répétés avec des frissons
- ✓ Fatigue
- ✓ Douleurs musculaires
- ✓ Céphalées
- ✓ Maux de gorge
- ✓ Perte récente de l'odorat ou du goût ou les deux
- ✓ Congestion ou écoulement nasal
- ✓ Nausées ou vomissements
- ✓ Diarrhée

V. Diagnostique

1. Signes cliniques

Les signes cliniques associent le plus souvent des signes généraux et des signes respiratoires ; ils sont polymorphes et non spécifiques. La tomodensitométrie thoracique est un outil important d'aide au diagnostic et de triage pour les patients dont l'état justifie une hospitalisation. Les deux complications principales de la maladie sont d'une part la détresse respiratoire par aggravation de la pneumonie, qui survient le plus souvent après sept à dix jours d'évolution dans le cadre d'un orage cytokinique, et la maladie thromboembolique d'autre part. Le taux de létalité est de l'ordre de 2 %. La prise en charge en milieu hospitalier comporte l'oxygénation le plus souvent et toujours la prévention de la maladie thromboembolique. Les surinfections bactériennes sont rares. Le remdésivir est un traitement permettrait de raccourcir la durée des signes cliniques chez des patients hospitalisés et sous oxygénothérapie. La dexaméthasone est le traitement qui permettrait de réduire la létalité chez les patients dont l'état

justifie une ventilation mécanique. Le développement de nombreux candidats vaccins suscite beaucoup d'espoir pour accélérer la sortie de pandémie(6).

2. Signes biologiques

L'apparition des signes cliniques s'accompagne de perturbation du bilan biologique. Le bilan biologique montre une :

- Augmentation des D-dimères $> 1 \mu\text{g/mL}$ et une baisse de TP ;
- Augmentation des polynucléaires neutrophiles et diminution des lymphocytes.
- Hyperbilirubinémie totale, hypoalbuminémie, élévation de l'urée et des LDH;
- Elévation d'IL-2, IL-7, IL-10, facteur de stimulation des colonies de granulocytes (GCSF), protéine induite par l'interféron gamma 10 kD (IP-10), protéine chimio attractante des monocytes 1 (MCP-1), protéine inflammatoire des macrophages 1- α (MIP -1 α)et TNF- α .(7).

3. Complication de la maladie COVID-19

Le COVID-19 est connu pour provoquer des atteintes respiratoires parfois lourdes, mais aussi d'autres déficiences :

- Neurologiques,
- Neurocognitives,
- Cardiovasculaires,
- Digestives,
- Hépatorénales,
- Métaboliques,
- Psychiatriques,

De plus, un séjour en réanimation avec une immobilisation prolongée, parfois une trachéotomie, peut entraîner des complications. Certaines de ces complications nécessitent l'intervention d'un orthophoniste(8).

VI. Diagnostic moléculaire de la maladie COVID-19

1. RT-PCR en temps réel

Le test de RT-PCR utilisé pour diagnostiquer la maladie COVID-19 repose sur la détection de l'ARN du SARS-CoV-2, en utilisant des sondes marquées et des amorces spécifiques de certains gènes du SARS-CoV-2.

Les kits de détection des acides nucléiques par RT-PCR en temps réel du coronavirus (SARS-CoV-2) sont basés sur la méthode PCR qui utilise une sonde fluorescente et une amorce spécifique pour détecter deux ou trois régions spécifiques au sein du génome du nouveau coronavirus (SARS-CoV-2). En général, il s'agit des gènes ORF_1ab, RdRp, E et N. Cette détection peut se faire séparément pour chaque gène ou en multiplex (tous les gènes dans la même réaction).

2. PCR Rapide ID NOW

La performance d'une analyse PCR de laboratoire à la simplicité d'un test de terrain. Il permet de tester en quelques minutes les personnes potentiellement exposées à la Covid -19.

Le test ID NOW COVID-19 effectué sur l'instrument ID NOW est un test de diagnostic moléculaire in vitro rapide utilisant une technologie d'amplification d'acide nucléique isotherme, contrairement à la RT-PCR traditionnelle, elle ne nécessite pas de cycles de températures pour amplifier l'ARN. Cette technologie est destinée à la détection qualitative de l'acide nucléique de l'ARN viral du SARS-CoV-2 sur des écouvillons nasaux, nasopharyngés et oropharyngés chez des patients symptomatiques et donc, suspectées de COVID-19.

ID NOW est un test rapide, simple d'utilisation. C'est un test rapide de technologie d'amplification d'acide nucléique (résultat dans 15 minutes) réalisé à l'aide d'un instrument portatif, destiné à la détection et au diagnostic qualitatifs du SRAS-CoV-2 à partir d'écouvillons nasaux, nasopharyngés et pharyngés chez des patients symptomatiques.

L'instrument ID NOW occupe un petit espace, est peu encombrant et comprend une interface graphique simple d'utilisation en laboratoires ou en points de service. La trousse ID NOW COVID-19 contient toutes les composantes nécessaires à la réalisation d'un dosage pour le SRAS-CoV-2 sur l'instrument ID NOW.

Les résultats concernent l'identification de l'ARN du SRAS-CoV-2, qui est généralement détectable dans les échantillons respiratoires pendant la phase aiguë de l'infection. Des résultats positifs indiquent la présence d'ARN du SRAS-CoV-2 ; une corrélation clinique avec les

antécédents du patient et d'autres informations diagnostiques est nécessaire pour déterminer le statut d'infection du patient. Des résultats positifs n'excluent pas une co-infection avec d'autres virus.

Les résultats négatifs doivent être considérés comme présomptifs et, s'ils ne correspondent pas aux signes et symptômes cliniques ou s'ils sont nécessaires à la prise en charge du patient, doivent être testés avec différents tests moléculaires autorisés ou approuvés.

Les résultats négatifs n'excluent pas l'infection par le SRAS-CoV-2 et ne doivent pas être utilisés comme seule base pour les décisions de prise en charge des patients. Les résultats négatifs doivent être pris en compte dans le contexte des expositions récentes du patient, de ses antécédents et de la présence de signes et symptômes cliniques compatibles avec la COVID-19.

Le test ID NOW COVID-19 est destiné à être utilisé par des professionnels de la santé ou des opérateurs qualifiés qui sont compétents pour effectuer des tests à l'aide de l'instrument ID NOW(9).

3. Test antigénique

Le test rapide, dit antigénique, vise à détecter des protéines virales S de SARS-COV-2 présentes dans un échantillon clinique. Le résultat de ce test peut être connu, quelques minutes après la prise de l'échantillon.

Les tests rapides sont basés sur le principe de l'immuno-chromatographie à flux latéral et sont disponibles sous forme de cassette. Le test est basé sur la séparation des composants d'un mélange à travers un milieu en utilisant la force capillaire et la liaison spécifique et rapide d'un anticorps à son antigène.

Les IgM et IgG sont des immunoglobulines sont produites par le système immunitaire pour assurer une protection contre le SRAS-CoV-2. Les IgM et IgG anti-SARS-CoV-2 peuvent donc être détectées dans les échantillons des patients affectés en utilisant un test sérologique (Figure 6)

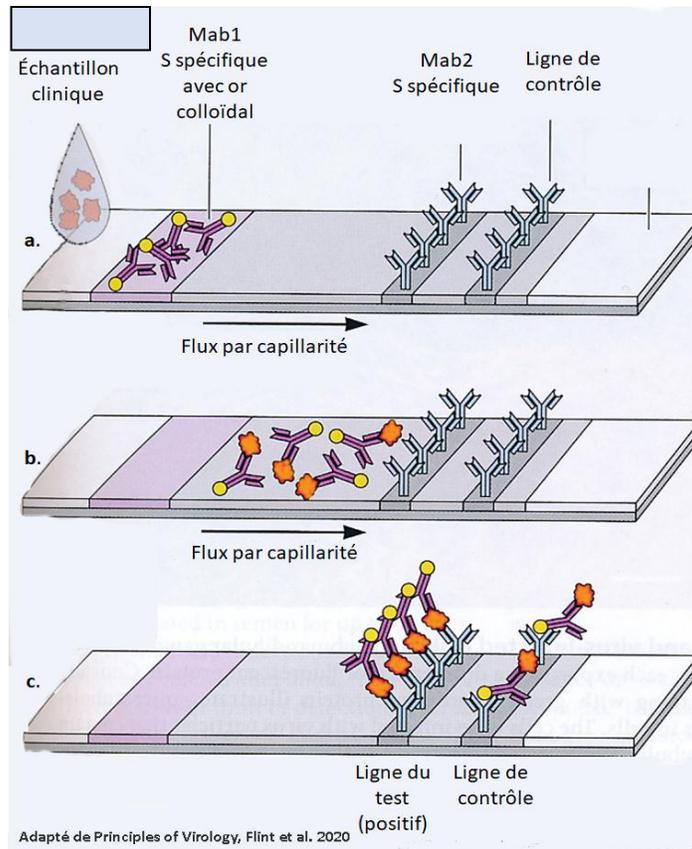


Figure 6 : le principe du test antigénique.

L'échantillon est déposé à l'extrémité de la bandelette (a.). Le liquide contenant les protéines virales de l'échantillon migre par capillarité sur la bandelette et rencontre une ligne d'anticorps spécifiques munis d'un détecteur coloré (or colloïdal). Ces anticorps ne sont pas immobilisés, ils sont emportés dans le flux de liquide. Lorsque l'antigène rencontre ces anticorps, le complexe antigène-anticorps se forme et continue sa migration. Il vient buter sur une deuxième ligne d'anticorps anti-protéine virale cette fois fixés au support (b.) La protéine virale liée aux premiers anticorps munis du détecteur vont être retenus sur cette ligne et former une ligne colorée. Les anticorps non complexés avec cette deuxième ligne vont continuer leur migration et buter sur une ligne qui fixe cette fois les anticorps eux-mêmes, qu'ils soient ou non liés avec l'antigène, formant une deuxième ligne colorée. Cette ligne dite de contrôle est le garant de la bonne migration des anticorps sur la bandelette. Elle est toujours visible et sert à certifier le bon déroulement du test (la bonne migration par capillarité). Quant à la première ligne elle n'est visible que si l'antigène a bien été lié aux premiers anticorps. En son absence, le test est négatif(10).

VII. Vaccins contre SARS-COV-2

Les vaccins stimulent le système immunitaire de façon à induire une protection spécifique contre le virus de la COVID-19, des différences existent quant à la technique utilisée.

Les « vaccins à ARN messenger », comme ceux de BioNTech-Pfizer, Moderna ou CureVac, consistent à injecter dans l'organisme non pas le virus mais des molécules d'« ARN messenger », fabriqué au laboratoire. Cet ARN, encapsulé dans des particules de lipides, sans adjuvant chimique, ordonne aux cellules au niveau du site d'injection (principalement les cellules musculaires et les cellules du système immunitaire) de fabriquer une protéine spécifique du virus responsable de la maladie COVID-19, ce qui activera une réponse immunitaire. Il est ensuite rapidement éliminé. L'ARN messenger ne pénètre jamais dans le noyau de la cellule et n'a aucune action sur le génome.

Les vaccins développés par AstraZeneca et par Janssen reposent quant à eux sur un « vecteur viral non répliquatif » : un virus inoffensif qui ne peut se reproduire dans les cellules est utilisé pour transporter le matériel génétique du coronavirus, fabriquant la protéine qui déclenchera une réponse immunitaire.

Les « vaccins à virus inactivé », les plus couramment utilisés, et les « vaccins à virus vivant atténué » reposent sur une injection du virus entier ou d'une partie de virus préalablement rendu inoffensif afin de déclencher une réponse immunitaire en cas d'infection(11).

CHAPITRE 2 : TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

UTILISEES POUR LA DETECTION DE SARS-COV-2

I- Extraction des Acides Nucléiques

L'extraction des acides nucléiques (ADN et ARN) est une technique qui isole les acides nucléiques à partir des cellules en quantité et en qualité suffisante pour permettre ses analyses.

1- Technologies d'extraction des acides nucléiques

1.1. Extraction organique

L'extraction organique la plus courante est la méthode utilisant une solution de phénol-chloroforme. L'extraction organique implique l'ajout et l'incubation dans plusieurs solutions chimiques différentes ; comprenant une étape de lyse, une extraction au phénol-chloroforme, une précipitation à l'éthanol et des étapes de lavage.

L'avantage de la méthode au phénol-chloroforme est la simplicité du protocole, la dénaturation rapide des nucléases et la stabilisation des acides nucléiques. Le principal inconvénient est l'utilisation de produits chimiques toxiques comme le phénol et le chloroforme, et le risque de contamination est accru du fait du transfert de l'ADN entre plusieurs tubes(12).

1.2. Extraction sur colonne

L'extraction en phase solide sur colonne de centrifugation, tire parti du fait que l'AN se lie à la silice. L'échantillon contenant l'AN est ajouté à une colonne contenant un gel de silice ou des billes de silice et des sels chaotropes. L'AN se lie à la silice, tandis que le reste de la solution est éliminé par lavage à l'hexanol pour éliminer les sels chaotropes et d'autres constituants inutiles.

L'AN peut ensuite être réhydratée avec des solutions aqueuses à faible teneur en sel permettant l'élution des AN.

Les avantages de ce type de méthodes sont la facilité d'utilisation, la flexibilité et la capacité d'automatisation(13).

1.3. Extraction par billes magnétique

La technique consiste à séparer les acides nucléiques de mélanges complexes par hybridation complémentaire.

La méthode utilise des billes magnétiques permettent une liaison sélective de l'AN en présence de fortes concentrations de sel. L'acide nucléique lié à une bille magnétique peut être facilement séparé de la phase aqueuse à l'aide d'un aimant, ce qui permet un traitement rapide des échantillons et un contrôle fin des volumes de solution.

Les méthodes à base de billes magnétiques sont idéales pour l'automatisation et le traitement à haut débit, car elles éliminent le besoin de centrifugation et d'autres étapes fastidieuses(14).

2. Extraction de l'ARN de SARS-CoV-2 par Kit MagaBio

Maga Bio est le kit d'extraction utilisé au laboratoire BIOCENTRE TANGER pour extraire l'ARN du SARS-CoV-2. Il repose sur l'utilisation des billes magnétiques en utilisant un automate BIOER.

Ce kit d'extraction est un moyen rapide et pratique pour l'isolement rapide de l'ADN ou de l'ARN pour les agents pathogènes viraux, et est validé pour plusieurs souches de SRAS-CoV-2, agent des maladies Covid-19. Il peut utiliser comme échantillons : des écouvillons oro-naso-pharyngé, du plasma (frais ou congelé), du sérum, de l'urine, de la salive, des matières fécales et des cultures cellulaires ou des tissus infectés par des virus. Les acides nucléiques purifiés sont prêts pour la PCR, la RT-PCR, le NGS et toute autre application existante ou à venir(15).

Durant mon stage, on a extrait 50 patients à partir des écouvillons naso-pharyngés, cette extraction est destinée pour faire RT-PCR en cherchant l'agent pathogène responsable de la maladie COVID-19, le SARS-CoV-2.

2.1. Etapes d'extraction

En utilisant des plaques d'extractions prêtes à l'emploi déjà pré-remplies par le réactif nécessaire à l'extraction, en ajoutant 10µl de la protéinase K dans chaque de la plaque, puis en ajoutant 300µl de l'échantillon a testé dans puits correspondants.

Voir annexe.

II- PCR

1. Principe

La PCR ou Polymérase Chain Réaction est une technique qui permet l'amplification des acides nucléiques humains ou exogènes. Elle repose sur la capacité d'une enzyme, une ADN polymérase, à synthétiser le brin complémentaire d'un ADN servant de matrice.

La PCR correspond à une amplification d'un fragment d'ADN spécifique délimité par des amorces (ou primer). Celles-ci sont constituées d'un segment de 17 à 30 bases d'acide nucléique.

Leur association à l'ADN cible et suivie d'une élongation par la polymérase, aboutissant à la synthèse d'un ADN double brin.

Cette amplification est répétée un certain nombre de fois afin d'obtenir une quantité d'ADN suffisante pour être détectée et analyser.

2. Historique

Cette technique révolutionnaire d'amplification de l'ADN permettant l'obtention en peu de temps de 10^6 copies d'un fragment d'ADN cible, a été inventée en 1985 par Kary Mullis, qui travaillait pour la firme Cetus, en Californie. En 1990, K. Mullis a obtenu le prix Nobel pour son invention.

La technique a été utilisée la première fois pour amplifier un fragment d'ADN de la β globine humaine en vue d'effectuer le diagnostic de l'anémie à cellulescaliciforme (drépanocytose).

Deux progrès technologiques capitaux ont été à la base de l'utilisation très large de la PCR en biologie moléculaire et en biologie clinique :

- L'utilisation de l'ADN polymérase thermostable supportant la Température élevée de dénaturation de l'ADN. La première enzyme Thermostable utilisée en PCR est la Taq polymérase isolée d'une bactérie Thermophile, *Thermus aquaticus*, isolée d'une source d'eau chaude du Parc de Yellowstone, aux Etats-Unis. Depuis d'autres Polymérases ont été isolées à partir d'autres microorganismes et sont commercialisées.
- Le développement de blocs chauffants automatisés programmables, permettant le passage rapide et automatisé d'une température à une autre, au cours des cycles d'amplifications ; ces blocs chauffants appelés thermocycleurs ont permis l'automatisation de la technique et sa diffusion dans de nombreux laboratoires.

3 .Acteurs de la PCR

3.1. L'acide désoxyribonucléique contenant le fragment à amplifier

Il est constitué de deux brins formant une double hélice. L'ADN est formé d'unités de bases, les nucléotides (une base + un sucre [le désoxyribose] + un phosphate), reliés par des liaisons phosphodiesters. On distingue quatre bases:

- Adénine (A) et Guanine (G) sont des bases puriques
- Cytosine (C) et Thymine (T) sont des bases Pyrimidique

Les bases Azotes sont liées les uns aux autres par des liaisons hydrogène

- La base A est associée à la base T par deux liaisons hydrogènes.
- La base G est associée à la base C par trois liaisons hydrogènes.

Chaque brin d'ADN possède une extrémité 5'-phosphate et une extrémité 3'-hydroxyle.

Par convention une orientation a été définie: elle se fait de 5' vers 3' (5'3'). Par ailleurs, les Deux brins sont orientés en sens opposé : on dit qu'ils sont antiparallèles. On peut facilement séparer les liaisons hydrogènes : on parle alors de dénaturation. Celle-ci est réversible. La réassociation s'appelle la renaturation ou hybridation. Elle peut se faire ADN/ADN, ADN/ARN ou ARN/ARN.

L'ADN cible sera extrait du milieu biologique à analyser (cultures cellulaires ou d'organismes, prélèvements sanguins, squames, biopsies...)

3.2 Amorces sens et anti-sens

Tout d'abord les amorces, en tant que séquence nucléotidiques s'expriment en 5'-3'. L'amorce dite "sens" est celle qui se lira dans le bon ordre lorsqu'elle est placée sur le brin. Donc en effet elle se place sur le brin anti-sens. A l'inverse l'amorce anti-sens est placée sur le brin sens.

Le choix des amorces, qui est évidemment crucial, est entre les mains de l'expérimentateur. Pour définir et faire synthétiser les amorces, il faut en général connaître la séquence du fragment que l'on veut amplifier. A partir de la séquence disponible, il faut déterminer les enchaînements nucléotidiques à partir desquels la polymérase pourra synthétiser de ' novo' les brins d'ADN.

Les amorces doivent donc être :

- ✓ Complémentaires des brins d'ADN existants ;
- ✓ "Orientées" dans le "bon" sens de façon à permettre la synthèse d'ADN de 5' en 3'.

Les amorces utilisées pour la PCR ont des longueurs habituellement comprises entre 17 et 30 pb, selon les applications pour lesquelles elles sont définies. Les amorces sont obtenues par synthèse chimique et à la demande, c'est-à-dire selon la séquence que définit l'expérimentateur.

3.3. ADN Polymérase

On utilise la Taq-Polymérase. Il s'agit d'une ADN polymérase ADN-dépendante possédant une activité exonucléase 5' 3' mais sans activité 3'5' (pas d'action correctrice). C'est une enzyme thermorésistante dont la température optimale de fonctionnement est comprise entre 70 et 75°C et dont la demi-vie est supérieure à 2h à 92° C et de 40 minutes à 95° C. Cette propriété de thermo-résistance est à l'origine de son utilisation dans la technique d'amplification génique PCR.

3.4. Nucléotides dNTPs

Les quatre désoxyNucléotides-Triphosphates: dGTP, dATP, dTTP et dCTP, seront Assemblés par la Taq-polymérase et formeront le brin d'ADN complémentaire.

3.5. Magnésium (Mg ++)

Ce cation est un cofacteur indispensable au bon fonctionnement de la polymérase et l'incorporation des précurseurs. Il doit être apporté en concentration précises sous forme de MgCl₂.

Tous ces composants forment ce qu'on appelle le MIX

3.6. Notion de température de fusion ou Tm

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

Le Tm est calculé par des logiciels informatiques (bio-informatique) ou approché par une formule plus pratique: (2°C par base nucléotidique A ou T) + (4°C par base G ou C)(Figure 07).

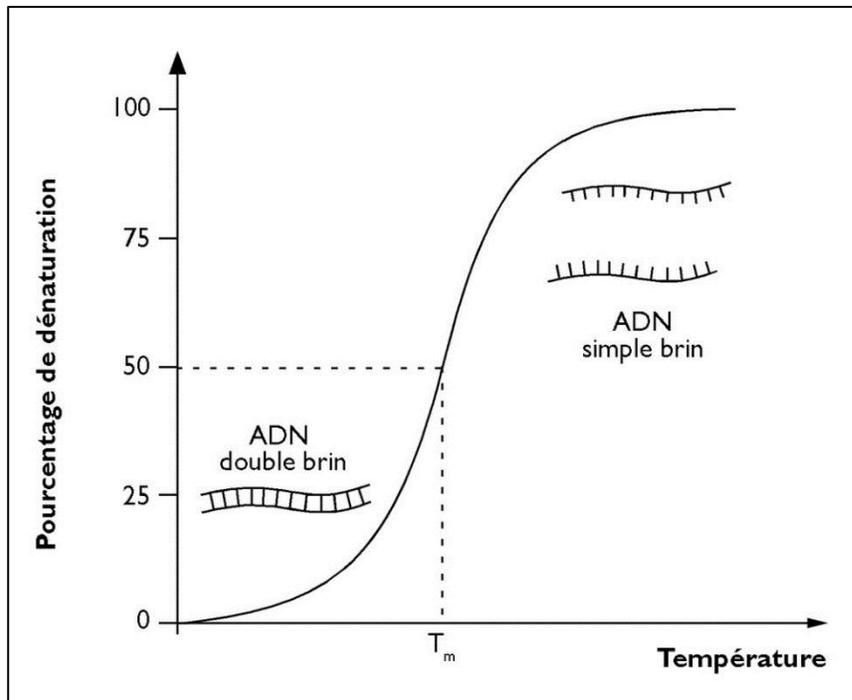


Figure 7 : Dénaturation de l'ADN

4 . La Réaction

La PCR est une succession de cycle allant jusqu'à 45, chaque cycle est une succession de 3 étapes : *la dénaturaturation, l'hybridation et l'élongation.*

- La phase de dénaturaturation consiste à séparer les 2 brins d'ADN afin de préparer l'étape suivante. La durée et la température de cette étape dépend de la teneur en bases CG, et la longueur de l'ADN matrice.
- La phase d'hybridation permet aux amorces sens et anti-sens de s'hybrider aux matrices d'ADN (les 2 brins séparés lors de la dénaturaturation). Le temps et la température de cette étape varient en fonction de la séquence des amorces.
- La phase d'élongation permet aux polymérase de synthétiser le brin complémentaire de l'ADN matrice. Ce nouveau brin est synthétisé à partir des dNTPs libres présents dans le milieu réactionnel. La durée de cette étape dépend de la longueur de la séquence à amplifier(16).

5. Migration électrophorèse et révélation

Les fragments d'ADN amplifiés peuvent être visualisés sur des gels d'agarose après électrophorèse.

Le gel forme des mailles au sein desquelles les acides nucléiques sont piégés. A pH= 7, leur migration se fait vers l'anode. En parallèle des fragments étudiés, on fait migrer un marqueur de poids moléculaire contenant des fragments de taille connue.

Pour visualiser le front de migration, le produit amplifié est mélangé à un colorant, le bleu de bromophénol qui présente également l'avantage d'alourdir l'échantillon afin qu'il sédimente au fond des puits de dépôt creusés dans le gel.

- ✓ La visualisation des acides nucléiques se fait après addition de bromure d'éthidium (BET), agent intercalant qui se glisse entre les bases des acides nucléiques (à manier avec précaution car cancérigène), quand il est intercalé entre ces bases, il présente une fluorescence violée sous lumière ultraviolet.

6. Avantages de la PCR

- ✓ La PCR est une technique très sensible car elle est capable de générer une très grande quantité d'acide nucléique à partir de quelques copies de la séquence recherchée
- ✓ Rapidité
- ✓ Spécificité

7. Limite de la PCR

La PCR reste une technique parfois délicate à réaliser et à interpréter du faite :

- ✓ Des risques d'inter contamination lors des prélèvements.
- ✓ De la possible dégradation des acides nucléiques en particulier de l'ARN ainsi que de la présence d'inhibiteurs de PCR lors de certain Prélèvements.
- ✓ De la contamination facile du milieu réactionnel lors de l'analyse au laboratoire.
- ✓ Des faux positifs dus à la sensibilité extrême de la technique.
- ✓ La contamination par aérosols de produits PCR.

III- RT-PCR en temps réel

1. Principe

La technologie de PCR en temps réel devient de plus en plus populaire dans différents secteurs d'activité. Cette technologie est basée sur la détection et la quantification d'un reporter fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction de PCR. Étant donné qu'elle utilise généralement des systèmes en tubes

fermés et que la quantification ne requiert aucune manipulation post amplification, les problèmes de contamination post-PCR par les amplicons sont significativement réduits. Le processus complet est automatisé du début à la fin rendant cette technologie très performante pour des applications d'analyses à grande échelle.

2. Intérêt de la RT-PCR en temps réel

La technique de RT-PCR en temps réel, hautement sensible et spécialisée, permet d'établir un diagnostic fiable en seulement trois heures, bien que les laboratoires mettent six à huit heures en moyenne. Elle est beaucoup plus rapide que les autres méthodes d'isolement de virus disponibles et présente un risque plus faible de contamination ou d'erreur puisque toutes les étapes peuvent être réalisées dans un tube fermé. De toutes les techniques disponibles, elle reste la plus précise pour le dépistage du virus de la COVID-19.

3. Réalisation pratique

La RT-PCR se déroule en deux phases : Une première phase correspond à la copie d'ARN messenger en ADN complémentaire (ADN), et une seconde phase correspond à une réaction PCR classique sur l'ADN synthétisé.

Dans la première phase, l'ARN messenger à étudier est repéré en utilisant une sonde oligo-nucléotidique spécifique (amorce 1 qui s'hybride à l'extrémité 3' du seul ARNm auquel on s'intéresse), puis la transcriptase inverse (ou rétro transcriptase) permet la synthèse du brin complémentaire (sous une forme d'ADN simple brin), une seconde amorce oligo-nucléotidique spécifique (amorce2) permettra la synthèse du second brin par extension. L'ADN complémentaire synthétisé servira ensuite de matrice pour une réaction PCR classique (Figure 08).

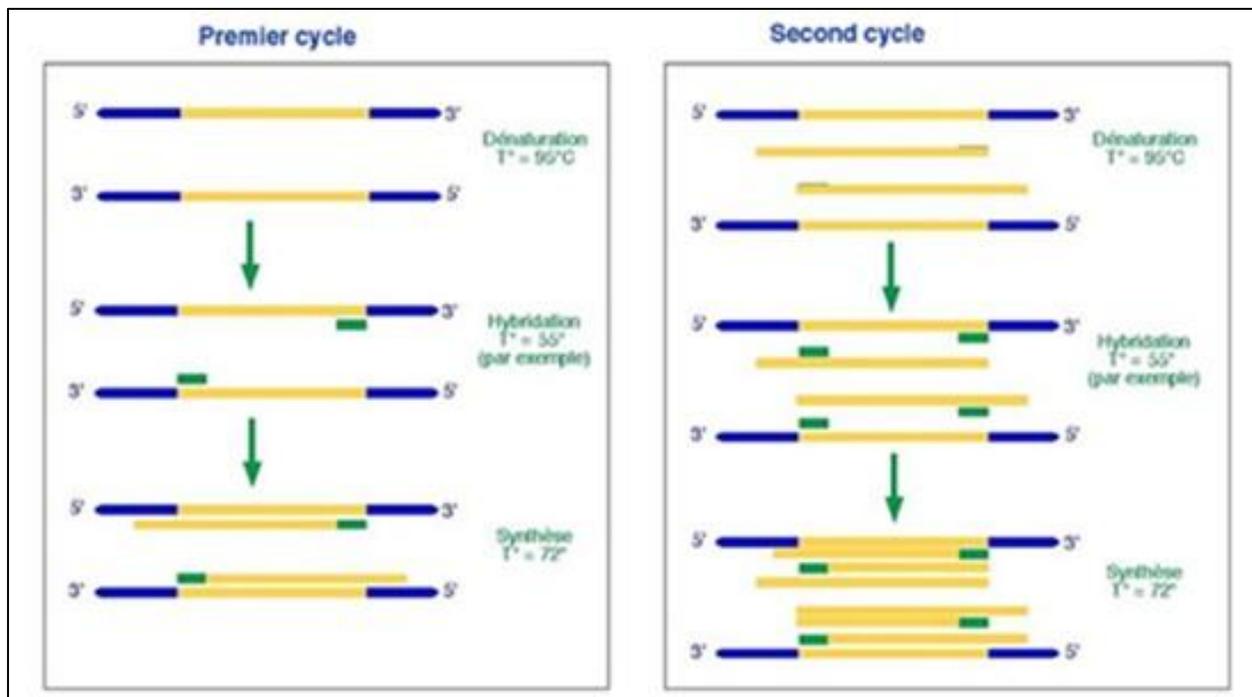


Figure 08 : Etapes de la RT-PCR

4. Application de la RT-PCR dans la détection de SARS-COV-2

4.1. Technologies de détection

Tous les systèmes de PCR en temps réel reposent donc sur la détection et la quantification d'un émetteur fluorescent pendant le processus d'amplification et l'augmentation du signal d'émission fluorescente est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits durant la réaction. Il existe deux principes généraux pour la détection quantitative des amplicons : les agents se liant à l'ADN double brin (ex. SYBR Green I) et les sondes fluorescentes. Pour cette dernière catégorie, il existe présentement quatre technologies principales : on focalise sur hydrolyse de sondes (Taqman),

4.2. Agents se liant à l'ADN double brin : SYBR Green I

Le SYBR Green I, dont le mécanisme de liaison n'est pas bien défini, est l'agent le plus fréquemment utilisé. Ses avantages sont qu'il est économique, facile à utiliser et possède plus de sensibilité que le bromure d'éthidium sans inhiber la réaction d'amplification.

Lors de la réaction d'amplification par PCR, le colorant libre en solution exhibe peu de fluorescence. Durant l'étape d'élongation, une augmentation de la fluorescence est associée à la quantité de colorant se fixant à l'ADN double brin naissant. Lors du suivi en temps réel,

l'augmentation du signal de fluorescence est observée pendant l'étape de polymérisation et l'émission fluorescente décroît complètement lorsque l'ADN est dénaturé à l'étape suivante. Conséquemment, l'émission de fluorescence est mesurée à la fin de chaque étape d'élongation pour chacun des cycles par un système de lecture intégré à l'appareil de PCR en temps réel qui permet de suivre l'augmentation de la quantité d'ADN amplifié durant la réaction(figure 09).

La technologie basée sur le SYBR Green I ne nécessite aucune sonde fluorescente mais sa spécificité repose entièrement sur ses amorces. Elle ne requiert donc aucune expertise particulière pour le design des sondes fluorescentes et n'est pas affectée par des mutations dans l'ADN cible qui influencent l'hybridation des sondes spécifiques.

Étant donné que le SYBR Green I se fixe à n'importe quelle molécule d'ADN double brin, cette technologie présente une certaine versatilité puisque le même agent peut être utilisé pour détecter plus d'un produit d'amplification dans la même séquence réactionnelle.

Cette technologie présente aussi certains désavantages: 1) étant donné que l'ADN double brin total émet des signaux, il devient impossible en cours de réaction de s'assurer de la spécificité des amplicons ou de discriminer les différents amplicons dans le cas de multiplexage; 2) le mauvais appariement (mis-primering), générant souvent des bandes d'ADN superflues observables sur gel d'électrophorèse, peut conduire à des faux positifs ou une surestimation de la quantification; 3) l'émission de fluorescence peut être biaisée par la masse moléculaire de l'ADN amplifié par un amplicon plus long qui fixera davantage de molécules fluorescentes par rapport à un amplicon plus court dans la même réaction.(17)

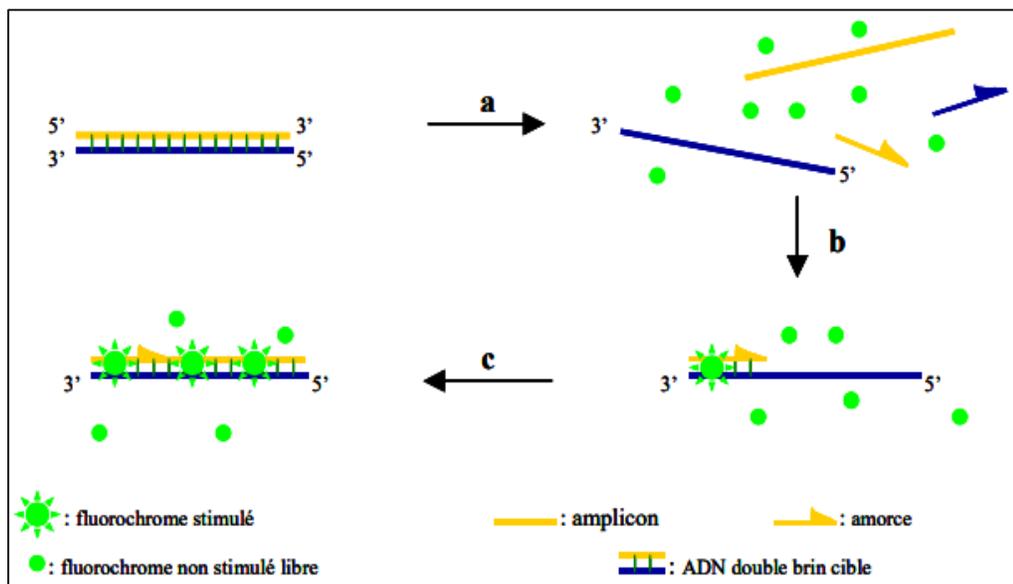


Figure 09 : Agent se liant à l'ADN double brin.

4.3. Hydrolyse de sondes : Taqman

La technologie Taqman est basée sur l'activité 5'-exo-nucléasique de la Taq polymérase pour hydrolyser une sonde hybridée à sa séquence cible sur l'amplicon durant l'étape d'hybridation/extension de la PCR. Un fluorochrome émetteur (reporter) (ex. FAM : 6-carboxyfluorocéine) est fixé à l'extrémité 5' de la sonde d'hybridation et son émission est inhibée par un second fluorochrome suppresseur (quencher) présent à l'extrémité 3' (ex. TAMRA : 6-carboxy-tetraméthyl-rhodamine). Lorsque stimulé, le fluorochrome émetteur transfère son énergie au fluorochrome, étant donné que l'activité 5'exonuclease de la Taq polymérase est spécifique à l'ADN double brin, les sondes libres en solution demeurent intactes et aucune fluorescence n'est émise. Lors de l'étape d'hybridation, la sonde et les amorces se fixent à leurs séquences complémentaires respectives. A l'étape suivante, la Taq polymérase débute l'élongation du nouveau brin d'ADN à partir de l'amorce jusqu'à ce qu'elle rencontre sur son passage la sonde hybridée qu'elle déplace et hydrolyse avec son activité 5'-exo-nucléasique. Le 'reporter' est alors libéré de l'environnement du suppresseur permettant ainsi l'émission de fluorescence qui augmente à chaque cycle proportionnellement au taux d'hydrolyse de la sonde (Figure 10).

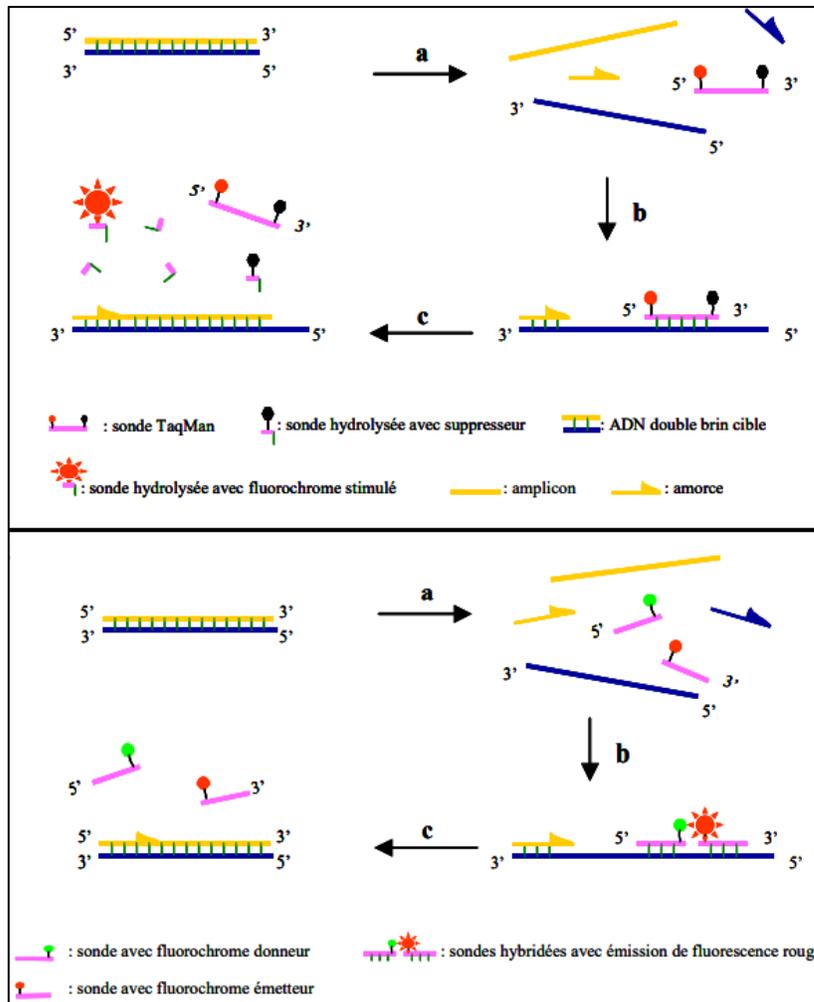


Figure 10. : Sonde d'hydrolyse Taqman.

IV- PCR rapide

1.Principe

C'est une technique d'amplification isothermique des acides nucléiques pour la détection qualitative des acides nucléiques viraux, elle permet de faire l'amplification d'un seul échantillon.

2.Application

On Utilise des échantillons fraîchement prélevés pour une performance optimale du test. Un prélèvement inadéquat des échantillons ou une manipulation/conservation ou un transportin adapté des échantillons peut donner des résultats erronés. ID NOW pour la détection de COVID-19 est l'appareil qu'on utilise pour faire les teste rapide, est un test avec un écouvillon directement sans élution dans un milieu de transport viral, car la dilution entraînera une

diminution de la détection des échantillons faiblement positifs. L'appareil ID NOW accepte les écouvillons naso-pharyngés, nasaux ou de gorge fraîchement prélevée depuis moins d'une heure.

ID NOW de COVID-19 est un dosage automatisé. Il comprend un récipient pour échantillon contenant un tampon d'élution/de lyse, une base de test composée de deux tubes à réaction scellés, comprenant chacun une pastille lyophilisée, une cartouche de transfert pour transférer l'échantillon élué sur la base de test et l'instrument ID NOW. Les tubes à réaction dans la base de test contiennent les réactifs nécessaires à l'amplification du SRAS CoV-2 ainsi qu'un contrôle interne. Les matrices (similaires aux amorces) conçues pour cibler l'ARN du SRAS-CoV-2 amplifient une région unique du segment RdRp. Des phares moléculaires marqués par fluorescence sont utilisés pour identifier spécifiquement chacune des cibles de l'ARN amplifié. Pour effectuer le dosage, le récipient pour échantillon et la base de test sont insérés dans l'instrument ID NOW. L'échantillon est ajouté au récipient pour échantillon et transféré dans la base de test via la cartouche de transfert, ce qui déclenche l'amplification de la cible. Le chauffage, le mélange et la détection sont assurés par l'instrument (Figure 11) (18).



Figure 11: Logiciel ID NOW COVID-19.

V- Test antigénique

1.Principe

Le test antigénique par immuno-capture est une technique immuno-chromatographique basée sur la détection d'antigènes dans un échantillon à tester, poursuit le spécialiste. L'anticorps est déposé sur la membrane du test et va se lier aux antigènes du virus s'ils sont présents dans l'échantillon. Dans ce cas, une bande de couleur apparaîtra dans la fenêtre test(19).

2. Application

Le test antigénique est réalisé sur un prélèvement naso-pharyngé (écouvillon dans le nez). L'écouvillon est placé dans une solution de transport du virus, appelée tampon. Une pipette permet de mélanger le tout afin de produire une réaction chimique. Ensuite un prélèvement est effectué de ce mélange et en déposer trois petites gouttes sur la cassette du test qui contient des anticorps. Si le prélèvement contient bien les antigènes du coronavirus, le complexe chimique généré au contact des anticorps va provoquer l'apparition d'une bande colorée après 15 minutes sous forme de bandes de couleur. 2 bandes = positif, 1 bande = négatif (Figure 12) (20).



Figure 12 : Test rapide de dépistage du nouveau coronavirus (SARS-Cov-2), utilisé par le Laboratoire BIOCENTRE

CHAPITRE 3: Partie pratique

I. Matériel

Nous avons travaillé sur 50 prélèvements Naso-pharyngé pour la technique RT-PCR, 9 prélèvements Naso-pharyngé pour le teste PCR rapide et 20 prélèvements nasopharyngé pour le test Antigénique

II. Méthode

1. RT-PCR en temps réel

1.1 Extraction d'ADN

Le matériel biologique utilisé comme matrice pour l'analyse RT-PCR est AN donc une extraction Naso-pharyngé ou Oro-pharyngé sont nécessaire.

L'extraction de l'ADN permet d'isoler l'ADN de cellules ou de tissus. L'ADN ainsi extrait ensuite utiliser pour la recherche de biologie moléculaire, telles que la PCR. Il existe différents protocoles pour extraire l'ADN, mais le principe est à peu près toujours le même :

- Lyse des cellules, c'est-à-dire qu'on utilise un détergent afin de casser les membranes cellulaires et nucléaires.

- Élimination des protéines

- Élimination des autres acides nucléiques (ARN ...)

- Précipitation de l'ADN.

L'extraction réalisée par la protéinase K et le **Kit MagaBio** par l'utilisation de la technique Extraction par billes magnétique, cette technique permet une liaison sélective de l'AN en présence de fortes concentrations de sel. L'acide nucléique lié à une bille magnétique peut être facilement séparé de la phase aqueuse à l'aide d'un aimant, ce qui permet un traitement rapide des échantillons et un contrôle fin des volumes de solution.

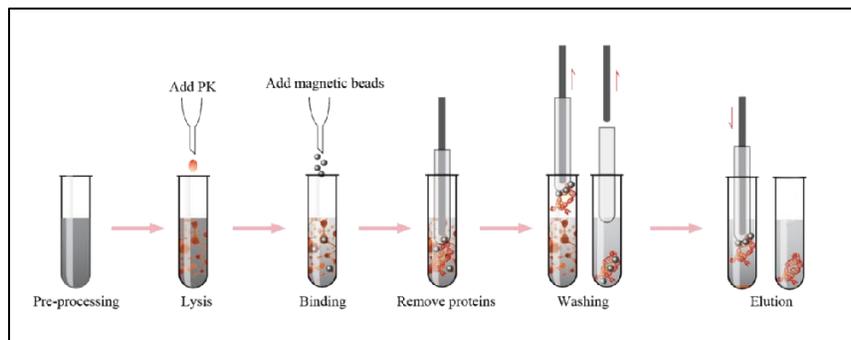


Figure 13 : Extraction des acides nucléiques

1.2 Préparation de Mix

On Préparer le mélange réactionnel en raison de 15 μ l par réaction (13 μ l de n-cov PCR mix et 2 μ l de l'Enzyme), le mix contient les amorces sens et anti-sens, les quatre désoxy-nucléotides, et le Magnésium (Mg ++), et on utilise l'enzyme de l'ADN polymérase thermostable pour assurer l'amplification

Avant de préparer le mélange, on fait quelque calcul pour savoir le volume de MIX et le volume d'enzyme qui doit ajouter selon le nombre de la réaction.

Exemple

Nbre de réaction	1	19*	35**	52***	100****
n-cov PCR mix	13	247	455	676	1300
n-cov PCR Enzyme	2	38	70	104	200
TOTAL (μl)	15	285	525	780	1500

*19 = 16prélèvements+2contrôles+1volume_mort

**35= 32prélèvements+2contrôles+1volume_mort

***52= 48prélèvements+2contrôles+2volumes_morts

****100= 96prélèvements+2contrôles+2volumes_morts

- 1- Application Récupérer le kit du Mix dans le congélateur et décongeler doucement par frottement entre les mains, puis vortexer et donner un petit coup de centrifugeuse pour décanter la solution.
- 2- Préparer le mélange réactionnel
- 3-Placer la plaque PCR sur le portoir réfrigéré et déposer **15 μ l** de la préparation du Mix dans chaque puits (figure 13).



Figure 14 : Microplaque Thermo Faste 96 puits

1.3 Lancement de la RT-PCR

Le mélange est ensuite placé dans un appareil de RT-PCR thermocycleur, où il est chauffé et refroidi suivant des cycles qui déclenchent des réactions chimiques permettant d'obtenir de nouvelles copies, identiques, des séquences d'ADN viral cibles. Les cycles se répètent de nombreuses fois pour continuer à copier ces séquences. À chaque cycle, la quantité double : on passe de deux copies à quatre, puis de quatre à huit, et ainsi de suite. Le processus de RT-PCR en temps réel comprend généralement 40 cycles, ce qui signifie qu'à la fin du processus environ 40 milliards de nouvelles copies des séquences d'ADN viral sont produites à partir de chaque brin d'ARN viral présent dans l'échantillon.

À mesure que les copies des séquences de l'ADN viral sont produits, les marqueurs se fixent sur les brins d'ADN et émettent une fluorescence qui est mesurée par l'ordinateur de l'appareil. Les résultats s'affichent en temps réel à l'écran. L'ordinateur effectue un suivi de la quantité de fluorescence dans l'échantillon à la fin de chaque cycle. Lorsque le niveau de fluorescence dépasse un certain seuil, la présence du virus est confirmée. Le nombre de cycles nécessaires pour atteindre ce seuil permet également aux scientifiques d'estimer la gravité de l'infection : plus le seuil est atteint rapidement, plus l'infection est grave.

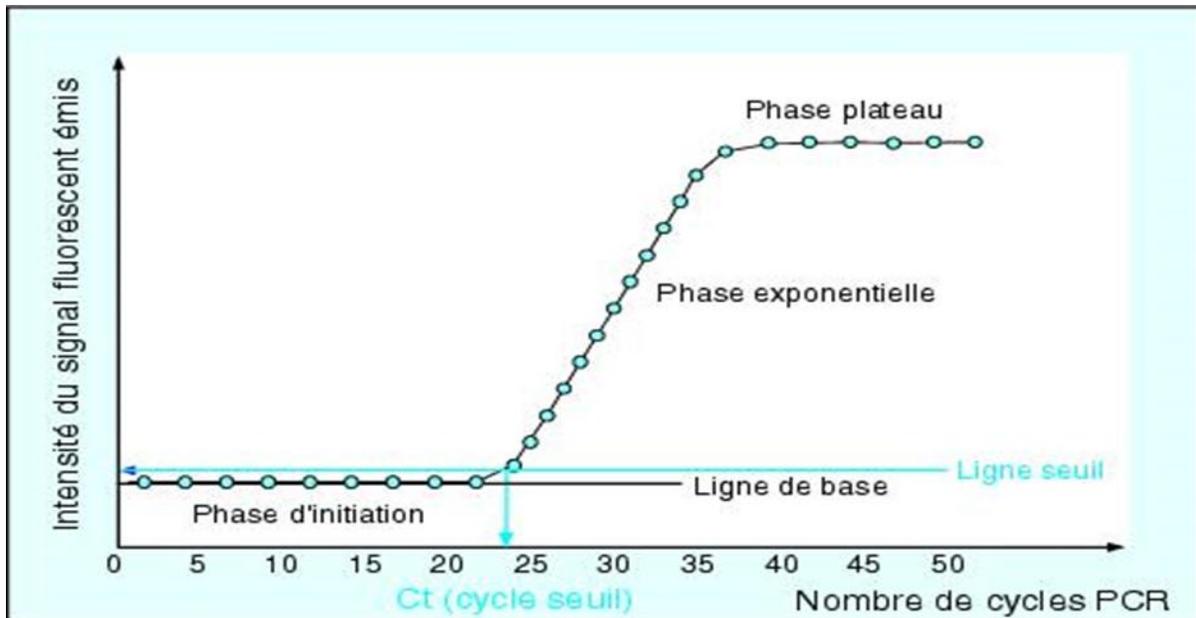


Figure 15 : Modèle graphique de la PCR en temps réel où l'intensité de la fluorescence est exprimée en fonction du nombre de cycles seuil

2. PCR rapide

Pour le test PCR rapide on utilise ID NOW COVID-19 qui comprend un récipient pour échantillon contenant un tampon d'éluion/de lyse, une base de test composée de deux tubes à réaction scellés, comprenant chacun une pastille lyophilisée, une cartouche de transfert pour transférer l'échantillon élué sur la base de test et l'instrument ID NOW. Les tubes à réaction dans la base de test contiennent les réactifs nécessaires à l'amplification du SRAS-CoV-2 ainsi qu'un contrôle interne. Les matrices (similaires aux amorces) conçues pour cibler l'ARN du SRAS-CoV-2 amplifient une région unique du segment RdRp.

3. Test Antigénique

On a effectué des tests antigéniques sur plusieurs échantillons, à l'aide d'une cassette, il est également effectué lors de tests PCR rapide lorsque le test est positif, pour valider le test

- Prélèvement nasopharyngé (écouvillon dans le nez).
- Placé écouvillon dans une solution d'extraction du virus, appelée tampon.
- Produire une réaction chimique par une pipette qui permet de mélanger la solution
- Prélever le mélange et déposer trois petites gouttes sur la plaquette du test qui contient des anticorps.

Si le prélèvement contient bien les antigènes du coronavirus, le complexe chimique généré au contact des anticorps va provoquer l'apparition d'une bande colorée après 15 minutes sous forme de bandes de couleur. 2 bandes = positif, 1 bande = négatif.

III. Résultats

1. Résultat de la RT-PCR

Sur les 50 prélèvements reçus, nous avons réalisé des tests RT-PCR, le résultat obtenu montre qu'il y a 22 prélèvements positifs et 28 prélèvements négatifs.

- Répartition selon le sexe

La moitié des prélèvements positifs appartiennent à des patients de sexe féminin et l'autre moitié au sexe masculin.

- Répartition selon l'âge

A partir des résultats obtenus sur 22 patients, nous avons constaté qu'une seule personne infectée appartient à la tranche d'âge inférieure à 30 ans, 16 personnes infectées ont un âge entre de 30 et 50 ans et 5 personnes infectées pour la tranche d'âge entre 50 et 70

Sur ce petit effectif réalisé le pourcentage de positivité le plus élevé trouve pour la tranche d'âge entre 30 et 50 ans

Sur les 22 prélèvements, 15 patients sont asymptomatiques et 7 patients présentent des symptômes.

2. Résultats de PCR-Rapide

Sur les 9 tests rapides réalisés, un seul test a été positif (peut-être à cause de la sensibilité de la technique)

3. Test antigénique

Nous avons réalisé 20 tests, on a obtenu 10 positifs et 10 négatifs

IV. Discussion

Les trois techniques que nous avons utilisées sont les plus appliquées dans les laboratoires d'analyse pour la détection de SARS-COV-2. Ils permettent de donner des résultats rapides et fiables. Les résultats que nous avons obtenus ont montré que la tranche d'âge entre 30 et 50 est la plus infectée, peut être due à l'activité plus élevée de ses personnes.

V. Conclusion

Face à la pandémie COVID-19, et grâce au développement technologiques, les laboratoires ont mis au point différents techniques d'analyse, les 3 plus utilisées sont RT-PCR, PCR rapide et le teste antigénique. La technique RT-PCR est la plus sensible et la plus spécifique, né au moins elle nécessite au moins 3 heures.

1. Nouveau coronavirus (2019-nCoV) [Internet]. [cité 26 mars 2021]. Disponible sur: <https://www.who.int/fr/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>
2. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard [Internet]. [cité 9 juin 2021]. Disponible sur: <https://covid19.who.int>
3. La maladie à coronavirus (COVID-19) : Qu'est-ce que c'est ? [Internet]. [cité 13 juin 2021]. Disponible sur: <https://www.unicef.org/wca/fr/coronavirus-cest-quoi>
4. Bourdon B. Le cycle viral de SARS-CoV-2 | Arbre des Connaissances [Internet]. [cité 2 juin 2021]. Disponible sur: <https://arbre-des-connaissances-apsr.org/2020/05/29/le-cycle-viral-de-sars-cov-2/>
5. Bonny V, Maillard A, Mousseaux C, Plaçais L, Richier Q. COVID-19 : physiopathologie d'une maladie à plusieurs visages. *Rev Med Interne*. juin 2020;41(6):375- 89.
6. Desvaux É, Faucher J-F. Covid-19 : aspects cliniques et principaux éléments de prise en charge. *Rev Francoph Lab*. nov 2020;2020(526):40- 7.
7. Jamai Amir I, Lebar Z, yahyaoui G, Mahmoud M. Covid-19 : virologie, épidémiologie et diagnostic biologique. *Option/Bio*. 2020;31(619):15- 20.
8. Le COVID-19 et ses complications : le recours à l'orthophonie peut être nécessaire [Internet]. Haute Autorité de Santé. [cité 3 juin 2021]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/jcms/p_3193620/fr/le-covid-19-et-ses-complications-le-recours-a-l-orthophonie-peut-etre-necessaire
9. download.pdf [Internet]. [cité 14 juin 2021]. Disponible sur: <https://www.fda.gov/media/136525/download>
10. Principes du test antigénique anti SARS-CoV-2 | Virologie pour tous [Internet]. [cité 4 juin 2021]. Disponible sur: <https://viropourtous.ch/principes-du-test-antigenique-anti-sars-cov-2/>
11. Quels sont les différents types de vaccins contre la COVID-19 et comment fonctionnent-ils ? [Internet]. [cité 7 juin 2021]. Disponible sur: <https://professionnels.vaccination-info-service.fr/FAQ/Repondre-aux-questions-sur-la-vaccination-COVID/Quels-sont-les-differents-types-de-vaccins-contre-la-COVID-19-et-comment-fonctionnent-ils>
12. Extraction des acides nucléiques Clinisciences [Internet]. [cité 10 mai 2021]. Disponible sur: <https://www.clinisciences.com/achat/cat-extraction-des-acides-nucleiques-2034.html>
13. Extraction ADN génomique du sang - Colonne de centrifugation Clinisciences [Internet]. [cité 10 mai 2021]. Disponible sur: <https://www.clinisciences.com/achat/cat-extraction-adn-genomique-du-sang-4779.html>
14. Extraction fragments ADN et PCR - Billes magnétiques Clinisciences [Internet]. [cité 10 mai 2021]. Disponible sur: <https://www.clinisciences.com/achat/cat-extraction-fragments-adn-et-pcr-4797.html>

15. Biospin Viral DNA/RNA Extraction Kit 100 Prep [Internet]. Pro Lab Supply Corp. [cité 10 mai 2021]. Disponible sur: <https://prolabcorp.com/biospin-viral-dna-rna-extration-kit-100-prep/>
16. Produits pour la PCR Clinisciences [Internet]. [cité 11 mai 2021]. Disponible sur: <https://www.clinisciences.com/achat/cat-produits-pour-la-pcr-2035.html>
17. La PCR en temps réel: principes et applications. :11.
18. PON_procedure_technique_id_now.pdf [Internet]. [cité 24 mai 2021]. Disponible sur: https://www.inspq.qc.ca/sites/default/files/lspq/PON_procedure_technique_id_now.pdf
19. Test antigénique : définition, comment ça se passe ? [Internet]. [cité 22 mai 2021]. Disponible sur: <https://sante.journaldesfemmes.fr/fiches-anatomie-et-examens/2668993-test-antigenique-definition-grippe-coronavirus-indications-deroule-gratuit/>
20. Test Covid-19 : PCR, antigénique, sérologique, lequel passer ? [Internet]. Qare. [cité 21 mai 2021]. Disponible sur: <https://www.qare.fr/sante/coronavirus/test/>