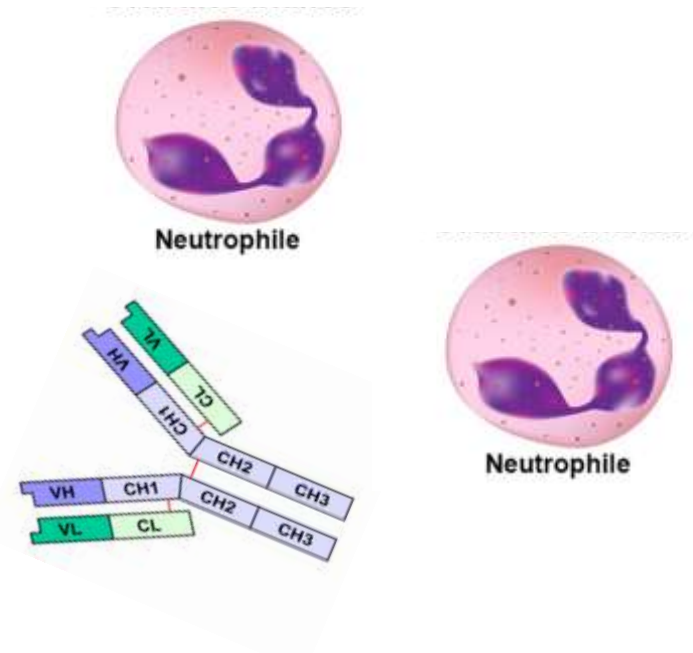


بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



Univ Batna 2  
Cours d'immunophysiopathologie  
Master 1 Biochimie Appliquée  
Préparé par Dr. Nadia DEKDOUK

# DIAGNOSTIC MOLÉCULAIRE DES MALADIES INFECTIEUSES



# **Plan de cours**

## **Introduction**

**1-Le principe de la PCR**

**2-Les avantages de la méthode**

**3-Détection de pathogènes**

**4-Quantification de pathogènes**

**5-Identification et caractérisation par séquençage**

**6-Comparaison des résultats**

**7-Etude d'un Exemple : Méthodes moléculaire de diagnostic de Covid-19**

# Introduction

Le diagnostic biologique des maladies infectieuses, parasitaires, bactériennes, virales et mycosiques fait appel à deux grands types de techniques :

- des techniques directes** qui permettent de rechercher l'agent pathogène en cause (directement par microscopie ou après culture) ou l'un de ses composants (antigènes, génome),
- des techniques indirectes** qui mettent en évidence la réponse de l'hôte à l'infection par la détection d'anticorps spécifiques ou diagnostic sérologique.

Bien qu'anticorps et antigènes soient bien des structures moléculaires, le terme de « diagnostic moléculaire » se réfère uniquement aux méthodes de détection et d'analyse du **génom**e.

La **PCR** (et méthodes dérivées : PCR en temps réel, PCR quantitative et RT-PCR) est la méthode de diagnostic moléculaire la plus utilisée pour détecter et identifier des pathogènes de culture difficile.

La cible est un acide nucléique (ADN ou ARN).

# 1-Le principe de la PCR

La PCR ou **Polymérase Chain Reaction** conduit à l'amplification *in vitro* de plusieurs millions de fois une séquence spécifique d'acide nucléique qui peut être minoritaire voir très rare ( $10^{-2}$ pg).

Elle exploite le processus de la réplication et fait appel, pour cela, sur la capacité de l'ADN polymérase à synthétiser le brin complémentaire d'un ADN servant de matrice. Pour initier le processus, des amorces (ou *primer*) s'hybrident de part et d'autre de la séquence à amplifier. Cette configuration permet à l'ADN polymérase de répliquer les 2 monobrins dans le sens 5' vers 3' et ainsi aboutir à la synthèse de nouveaux ADN doubles brins.

**La PCR s'effectue sur 3 étapes:**

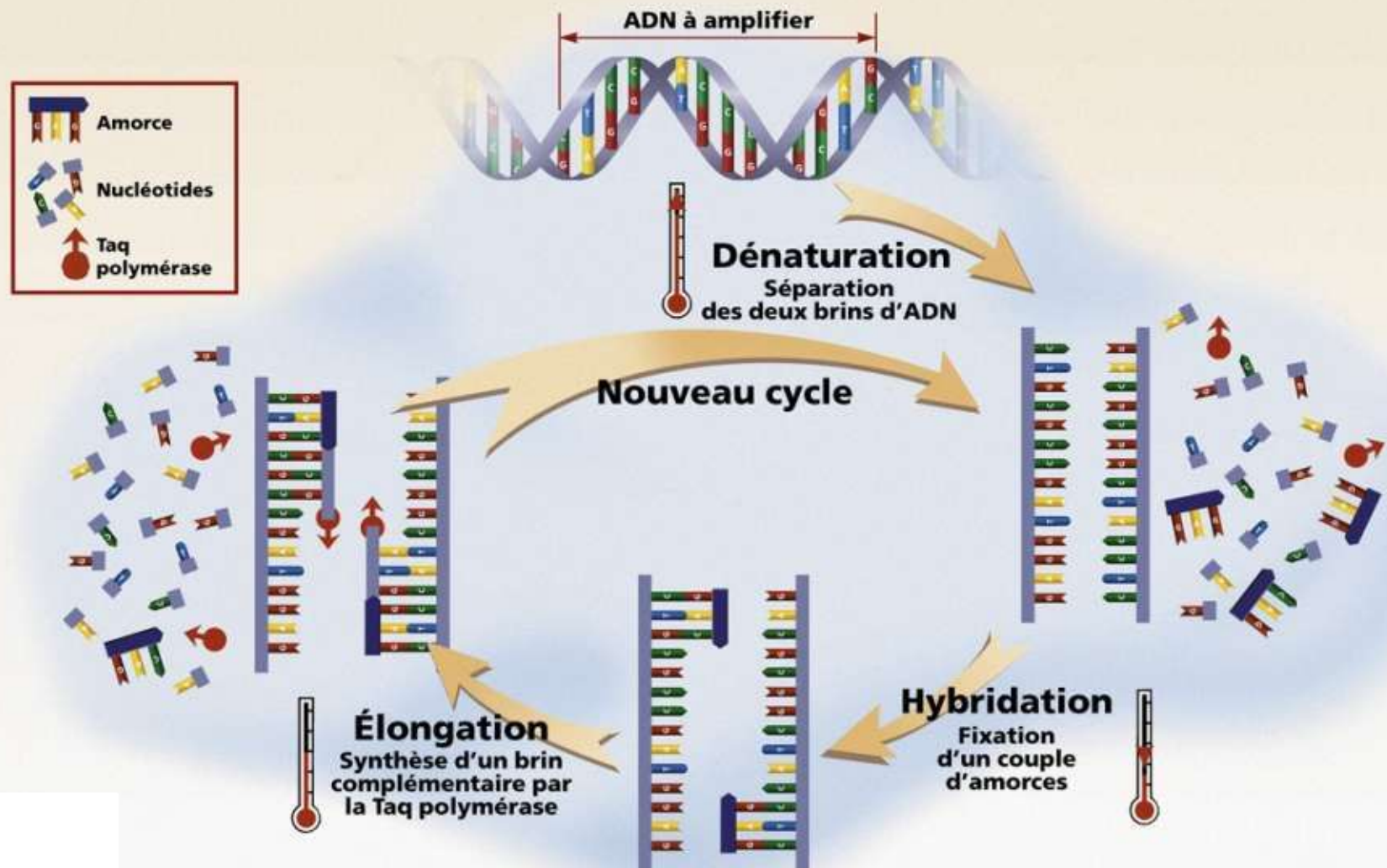
**a-La dénaturation thermique de l'ADN:** à 95°C, les liaisons d'hydrogènes sont rompues et les 2 brins de l'ADN se séparent. L'ADN passe sous forme simple brin dans le milieu.

**b-Hybridation des amorces:** le milieu réactionnel contient 2 amorces, chacune complémentaire d'un des 2 brins. La température permettant la fixation des amorces sur les monobrins d'ADN est comprise entre 50°C et 65°C. Les amorces en larges excès, s'hybrident dès lors qu'elles rencontrent les séquences complémentaires.

**c-Elongation /Extention des amorces:** intervention de la taq polymérase (ADN polymérase) qui allonge les amorces en y incorporant les désoxyribonucléiques complémentaires de la séquence de la matrice auquel elle est hybridée. Cette étape s'effectue à une température de 72°C (Figure).

# L'amplification de fragments d'ADN *in vitro* : la PCR

## Réaction cyclique d'amplification





Les cycles d'hybridation des amorces et de polymérisation d'ADN sont répétés au moins 30 à 50 fois aboutissant à une multiplication exponentielle de la séquence cible originale. Cette amplification explique la **sensibilité des techniques PCR** (ou plutôt leurs seuils de détection très bas : la présence de quelques copies de génome viral donne naissance en deux heures à plusieurs milliards de fragments identiques).

## **2-Les avantages de la méthode**

La PCR est un **moyen très performant de diagnostic des maladies infectieuses**, notamment dans les phases précoces de l'infection (dans la phase aiguë d'une maladie, avant l'apparition d'anticorps ).

Par ailleurs, la PCR n'est pas utile au diagnostic de certaines infections, mais peut être utile dans leur suivi ou dans certaines situations (Tableau).

	Détection par PCR	Détection d'antigènes	Sérologie
<b>Mononucléose infectieuse</b>			
<b>EBV, CMV, Toxoplasmose</b>	Rarement utile pour cette indication *	Pas d'utilité diagnostique	Recommandée pour le dépistage, en combinaison avec la détection d'anticorps hétérophiles et la formule sanguine (lymphocytose, lymphocytes atypiques) <sup>7</sup>
<b>Dépistage des maladies transmises par le sang</b>			
<b>VIH</b>	Non recommandée*: certains sous-types non détectables par les méthodes standards (VIH 2)	Méthode de choix, en complément de la détection d'anticorps	Méthode de choix, en complément de la détection d'antigènes
<b>Hépatite B</b>	Non recommandée*: hépatite B chronique inactive pouvant être négative à la PCR <sup>21</sup>	Méthode de choix, en complément de la détection d'anticorps	Méthode de choix, en complément de la détection d'antigènes
<b>Hépatite C</b>	Non recommandée*: charge virale négative par phases <sup>22</sup>	Potentielle alternative à la PCR Utilité pour le dépistage encore débattue	Méthode de choix, à confirmer par immunoblot
<b>Dépistage des maladies sexuellement transmissibles</b>			
<b>Syphilis</b>	Possible sur frottis de lésions, mais utile seulement en tout début d'infection	Pas d'utilité diagnostique	Recommandée pour le dépistage <sup>23</sup>
<b>Dépistage des maladies transmises par les tiques</b>			
<b>Borréliose</b>	Non recommandée pour le dépistage des cas simples. Utile dans certains cas en complément à la sérologie (PCR sur biopsie de peau ou liquide articulaire)	Pas d'utilité diagnostique	Recommandée pour le dépistage <sup>24</sup>
<b>Encéphalite à tiques (MEVE)</b>	Utilité limitée à la phase précédant les symptômes d'encéphalite	Pas d'utilité diagnostique	Recommandée pour le dépistage <sup>25</sup>

## **3-Détection de pathogènes**

### **3-1-Prélevement**

Un prélèvement adéquat est indispensable pour garantir la qualité d'une analyse. Typiquement, un frottis nasopharyngé pour la détection du virus de la grippe n'est optimal que s'il est fait de manière correcte (frottis profond). Pour les échantillons sanguins, il est préférable d'éviter les tubes héparinés, qui peuvent causer des inhibitions de la PCR. Dans le doute, il ne faut pas hésiter à contacter le laboratoire.

## **3-2-Détection**

### **3-2-1-Virus**

En permettant la détection de pathogènes pas ou difficilement cultivables, les méthodes moléculaires ont révolutionné la microbiologie médicale, principalement pour le diagnostic des maladies virales.

En effet, la culture de virus nécessite des lignées de cellules humaines ou animales immortalisées et peut prendre plusieurs semaines. Elle est de moins en moins utilisée et a été largement supplantée par la PCR, qui a également remplacé la sérologie pour de nombreuses indications, telles que l'infection aiguë à Herpès ou à Varicella zoster ou le zona.

### **3-2-2-Bactéries et champignons**

Contrairement aux virus, les techniques moléculaires n'ont pas remplacé les cultures pour les bactéries ou les champignons. Elles ont toutefois pris une place importante pour la détection de pathogènes spécifiques tels que *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (MRSA) ou *Clostridium difficile*.

De plus, la détection de certaines bactéries à croissance lente ou requérant des conditions de cultures très particulières (mycobactéries, *Chlamydia*) a également été améliorée et simplifiée par le développement de PCR spécifiques.

### **3-2-3-Parasites**

La détection par PCR est disponible pour de nombreuses infections parasitaires comme la toxoplasmose, la leishmaniose, l'amibiase (distinction entre *Entamoeba histolytica* et *dispar*) ou la malaria.

Pour ces maladies, les méthodes traditionnelles (microscopie ou sérologie) restent encore très utilisées, mais il est vraisemblable que les méthodes moléculaires gagnent en importance dans les prochaines années.

## **4-Quantification de pathogènes**

Outre une simple détection, les méthodes moléculaires modernes permettent également de donner des indications quantitatives, par exemple pour suivre l'évolution de la charge virale des virus VIH ou de l'hépatite C sous thérapie, et de détecter ainsi l'émergence de souches résistantes.

Cette quantification est également utile pour le diagnostic de réactivations de virus latents comme le polyomavirus BK ou le CMV (cytomégalovirus) chez les patients immunosupprimés.



## **5-Identification et caractérisation par séquençage**

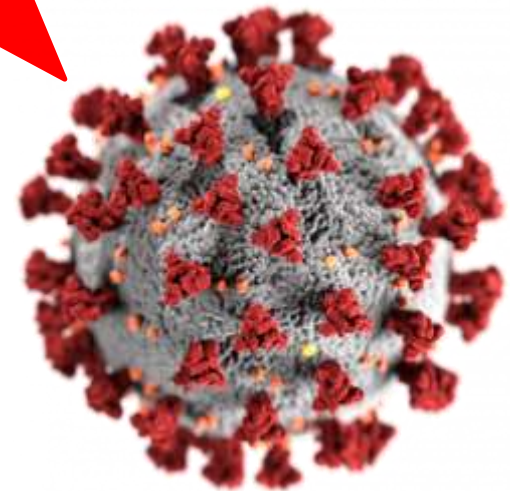
Bien que le séquençage de l'ADN ait été développé avant la PCR, toutes les méthodes modernes se basent désormais sur celle-ci. Son application la plus commune en microbiologie est la détection et l'identification de bactéries par le séquençage de l'ADN ribosomal. La séquence de ce gène étant spécifique à une espèce ou une famille, une identification est rendue possible, aussi lorsque la bactérie n'est pas ou plus cultivable. La détection de mutations causant des résistances aux thérapies est une autre application du séquençage, utilisée par exemple pour la caractérisation des virus VIH ou CMV.

## **6-Comparaison des résultats**

Les résultats de PCR quantitatives d'un laboratoire ne sont pas toujours comparables avec ceux d'un autre laboratoire. S'il existe depuis quelques années des standards internationaux pour certains paramètres infectieux comme le VIH ou l'hépatite B, ils ne sont pas disponibles pour tous les pathogènes. Le praticien doit en être conscient lorsqu'il compare des résultats de deux laboratoires. Le type d'échantillon est également un facteur critique pour la comparaison de résultats. Par exemple, la charge virale CMV mesurée dans le sang total n'est pas équivalente à celle mesurée dans le plasma, typiquement plus faible.<sup>[11](#)</sup>

# 7-Etude d'un Exemple : Méthodes moléculaire de diagnostic de Covid-19

**Comment faire le  
diagnostic de  
Covid-19 ?**



## 7-1-Définition

Les **coronavirus (CoV)** sont des virus qui constituent la sous famille *Orthocoronavirinae* de la famille Coronaviridae.

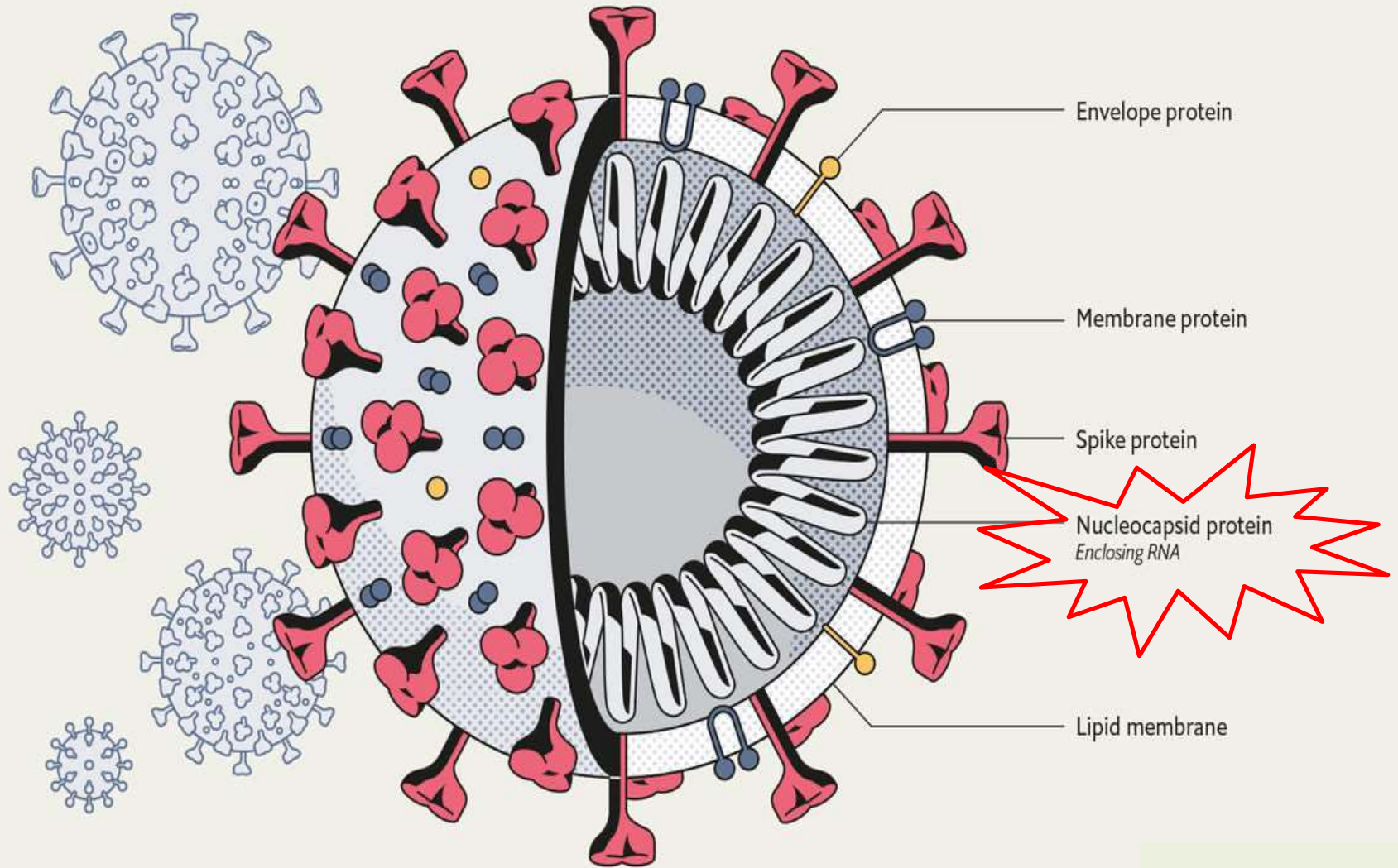
Le nom "coronavirus", du latin signifiant « virus à couronne », est dû à l'apparence des virions sous un microscope électronique, avec une frange de grandes projections bulbeuses qui évoquent une couronne solaire .

## 7-2-Structure

Les coronavirus sont munis d'une **enveloppe** virale incluant -une **Capside** caractérisée par des protéines en forme de massue (dites « protéines de pointe »). Ils ont un génome à **ARN monocaténaire** (c'est-à-dire à un seul brin), de 26 à 32kilobases (ce qui en fait les plus grand génomes parmi les virus à ARN).

Ils se classent parmi les Nidovirales , puisque tous les virus de cet ordre produisent un jeu imbriqué d'ARNm sous-génomique lors de l'infection (Figure ).

Des **protéines en forme de pointe**,une **enveloppe**, membrane et capsid contribuent à la structure d'ensemble de tous les coronavirus. Ils peuvent muter et se recombiner.



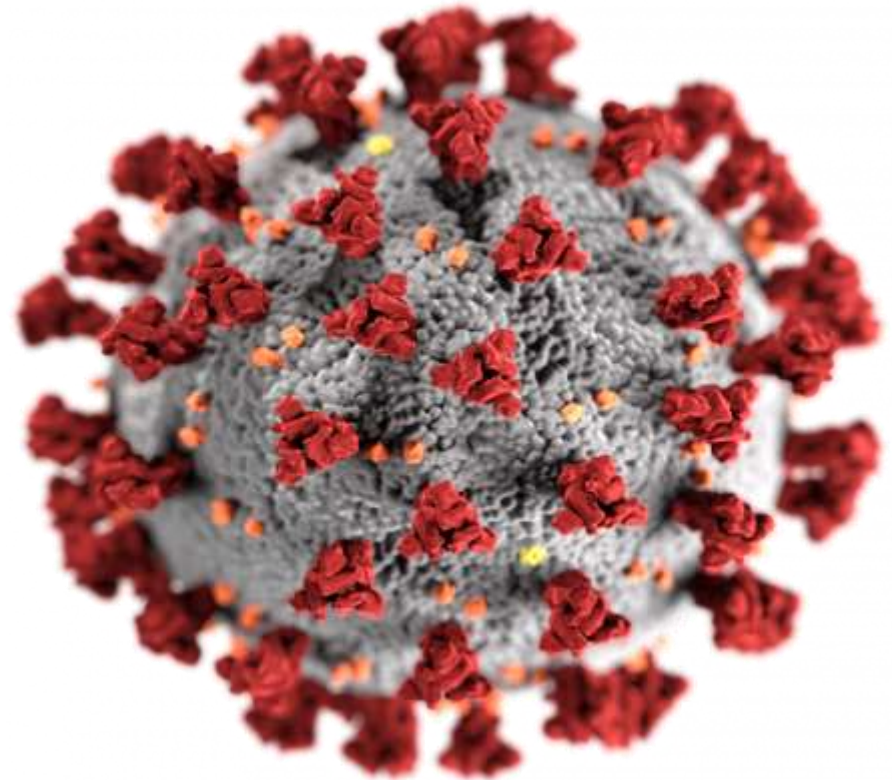
Structure de coronavirus

Plus récemment ont été identifiés trois types de coronavirus responsables de **graves pneumopathies** :

\*\*le SARS-CoV

\*\*le MERS-CoV

\*\*le **SARS-CoV-2**, celui de la maladie coronavirus 2019 (**Covid-19**) apparue en Chine en 2019 et responsable d'une sévère pandémie en 2020 .



## **7-3- Diagnostic de Covid-19**

Pour la confirmation des cas de Covid-19, nous disposons de deux principaux outils :

### **7-3-1-Les tests sérologiques**

Les tests sérologiques pratiqués sur le sérum du patient détectent les anticorps fabriqués par l'organisme en réponse à l'infection. Leur présence certifie que le sujet a développé l'infection, qu'elle ait été symptomatique ou non. L'infection par le SARS-CoV-2 induit la production d'anticorps spécifiques dès le 4<sup>e</sup> jour de la maladie. Deux types d'anticorps sont produits, les précoces, appelés **IgM** qui commencent à être sécrétés dès la fin de la première contamination et disparaissent au bout d'un temps relativement court. Les anticorps de protection, les **IgG**, sont les vrais défenseurs contre l'infection.



Ils apparaissent au bout de 8 à 10 jours et persistent très longtemps après la guérison dans le sérum des patients.

La production des IgG est relancée très rapidement par l'organisme chaque fois qu'il entre à nouveau en contact avec l'agent infectieux qui a entraîné sa première production (d'où l'intérêt des rappels de vaccination).

Le rôle protecteur de ces anticorps IgG est également utilisé comme traitement, en perfusion de plasma ou le sérum de patients guéris de COVID-19.

Ce sérum apporte au malade des anticorps protecteurs tout prêts en attendant qu'il produise ses propres anticorps. C'est ce que l'on appelle la sérothérapie.

Le diagnostic sérologique est très utile pour identifier les sujets qui ont été en contact avec le virus : les malades asymptomatiques, les malades guéris pour vérifier qu'ils sont bien couverts contre une nouvelle infection.

### **7-3-2-Les tests moléculaires**

Les tests moléculaires ont pour principe de lire la carte génétique du virus présent, équivalent à une carte d'identité ou d'empreintes digitales.

Les tests se font directement sur les prélèvements .

## **A- Objectif**

rechercher les personnes porteuses du virus:

- Soit malades à isoler ou à traiter suivant le degré de l'atteinte.
- Soit porteuses asymptomatiques mais contagieuses et donc à confiner pour éviter la dissémination du virus.

La répétition des tests est recommandée chez les personnes à risques (soignants ou personnes en contact avec des personnes infectées par exemple) ou chez des personnes malades initialement négatives.

# **B-Méthodologie**

## **b1-Prélèvements**

rechercher la présence directe de l'ARN (génomme viral) du coronavirus dans les **voies aériennes** des personnes susceptibles de porter ce virus.

Les prélèvements à faire incluent les sécrétions nasales profondes que l'on recueille à l'aide d'un écouvillon spécial (kits de prélèvements) et que l'on dépose dans un tube stérile contenant un milieu dit de transport qui sert à préserver la vitalité du virus.

## **b2- Extraction des ARN**

### **b3-Technique**

La technique utilisée est une PCR en temps réel ou RT-PCR dont le protocole a été standardisé par l'OMS.

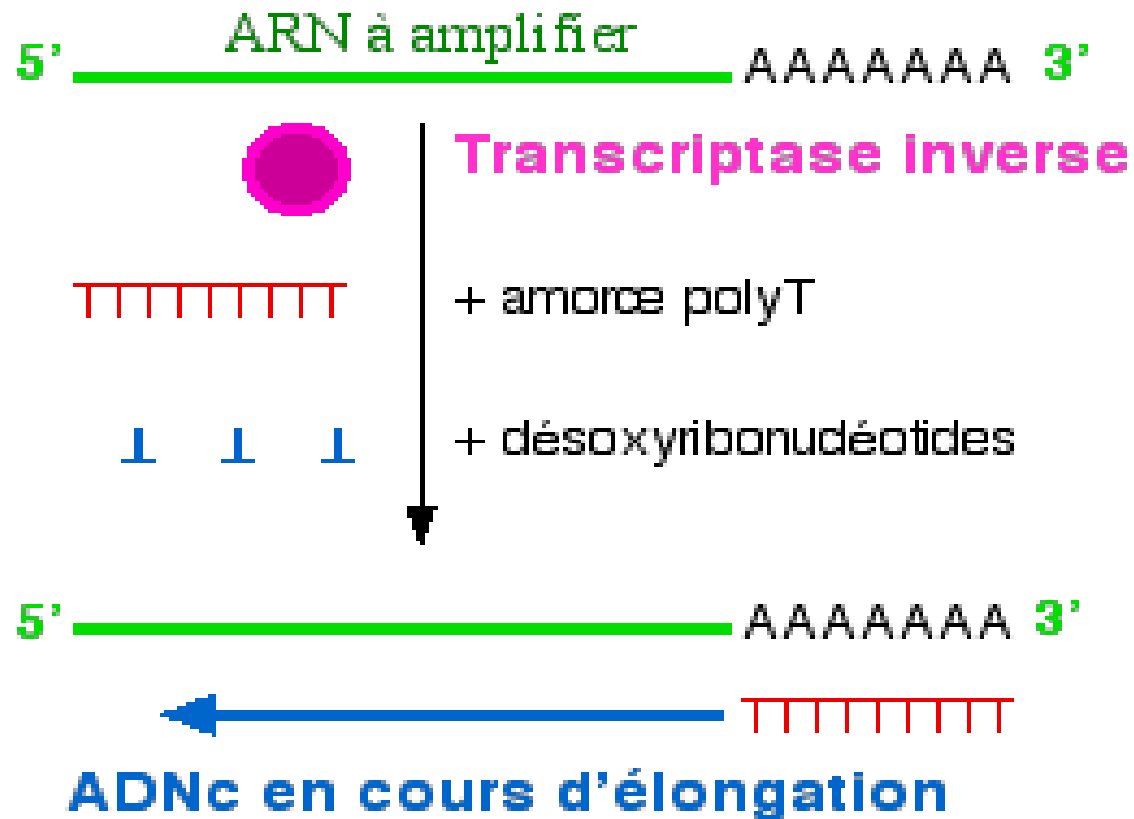
RT-PCR est la seule technique de diagnostic biologique du COVID-19 recommandée à ce jour permettant la détection du génome du coronavirus SARS-CoV-2 .

La **RT-qPCR** est une technique qui permet de faire **une PCR (réaction en chaîne par polymérase) quantitative à partir d'un échantillon d'ARN**.

### **\*\*\*Etapes**

**i-L'ARN est rétrotranscrit** grâce à une enzyme appelée **transcriptase inverse**, qui permet la synthèse de l'ADN complémentaire

(ADNc) est ensuite utilisé pour réaliser une PCR quantitative en ADN .Donc La synthèse d'ADNc est catalysée par des **transcriptases inverses** qu' utilise le brin d'ARN viral comme matrice (Figure).



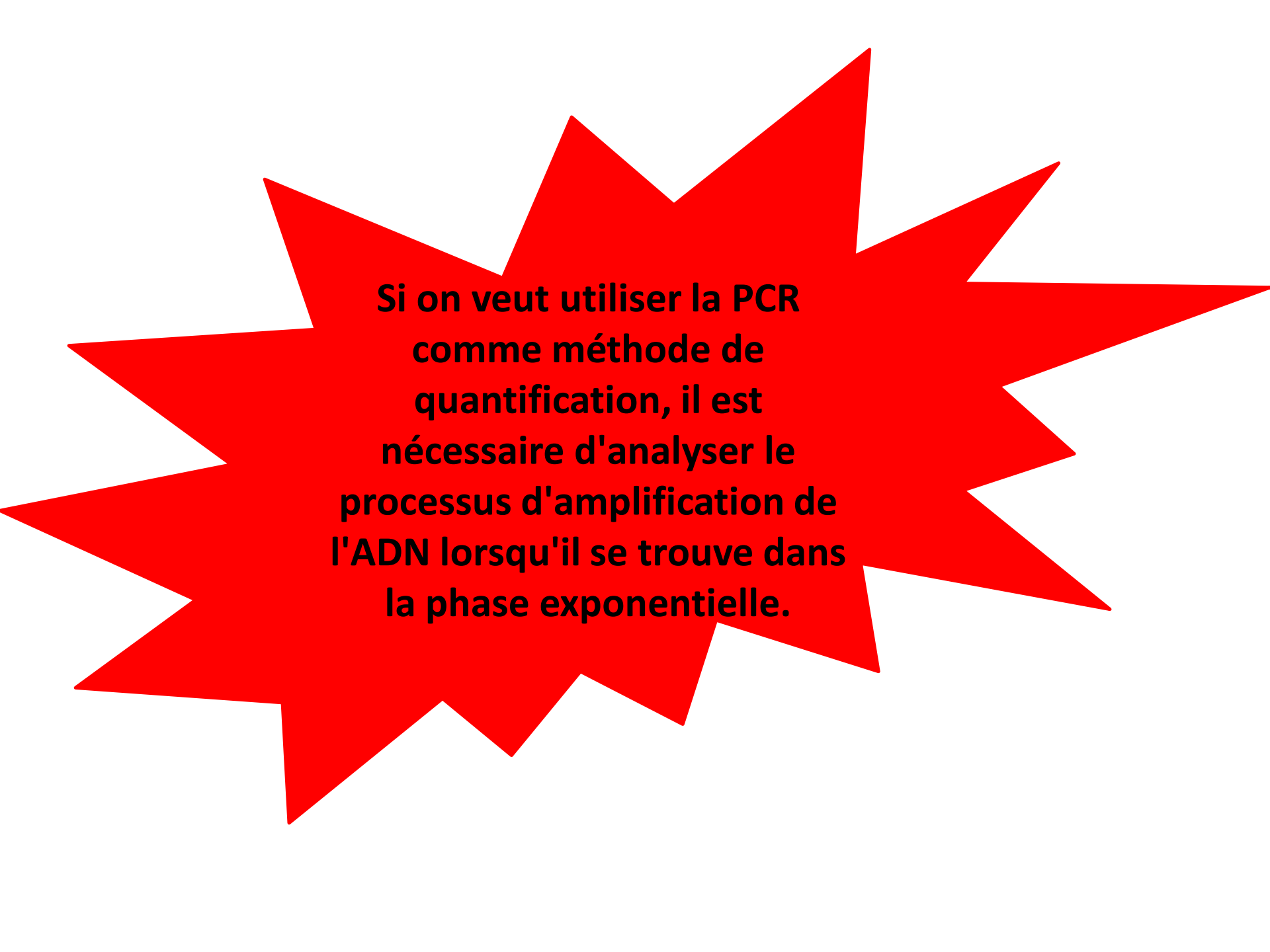
**principe de la réaction de transcription inverse en présence d'amorce polyT**

## ii-PCR

Selon les protocoles , il est recommandé d'inhiber la réaction de transcription inverse et de détruire ou dénaturer l'hybride ARN/ADNc.

Dans un premier temps, la Taq polymérase catalyse la synthèse du second brin d'ADNc en utilisant le premier brin comme matrice.

Ensuite, la PCR permet d'amplifier le fragment d'ADNc.

A large, red, multi-pointed starburst shape is centered on a white background. Inside the starburst, there is a block of text in a bold, black, sans-serif font. The text is centered and reads: "Si on veut utiliser la PCR comme méthode de quantification, il est nécessaire d'analyser le processus d'amplification de l'ADN lorsqu'il se trouve dans la phase exponentielle."

**Si on veut utiliser la PCR  
comme méthode de  
quantification, il est  
nécessaire d'analyser le  
processus d'amplification de  
l'ADN lorsqu'il se trouve dans  
la phase exponentielle.**



### **iii- PCR quantitative**

Utilisation des propriétés de la PCR pour calculer la quantité d'ADN amplifiée, ou bien la quantité d'ADN matrice soumis à amplification.

On se trouve alors dans une logique quantitative, et on parle de PCR quantitative.

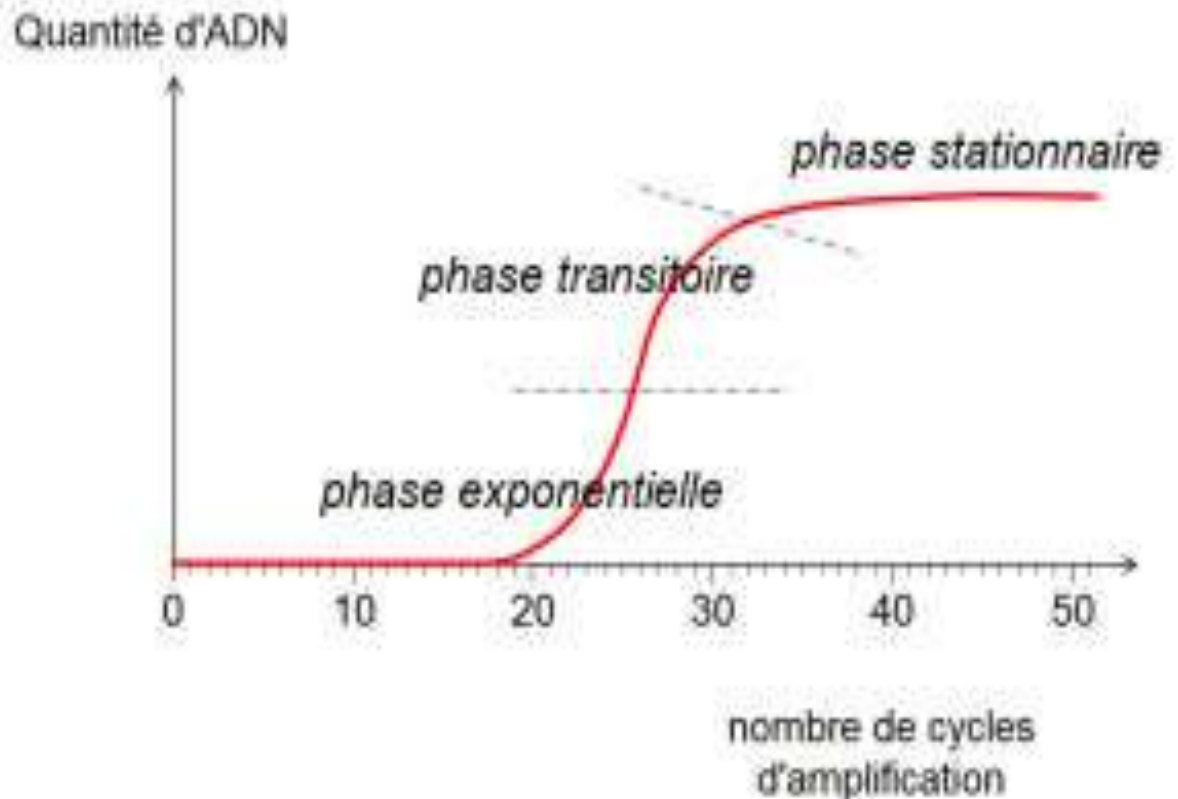
**La formule :  $Q_n = (1+E)^n \cdot Q_0$**

est la formule fondamentale à partir de laquelle tous les calculs quantitatifs peuvent être réalisés.

Pour déterminer la quantité initiale d'un ADN d'intérêt dans un échantillon en utilisant une approche de PCR quantitative, il faut analyser les échantillons lorsque le processus d'amplification est en phase exponentielle .

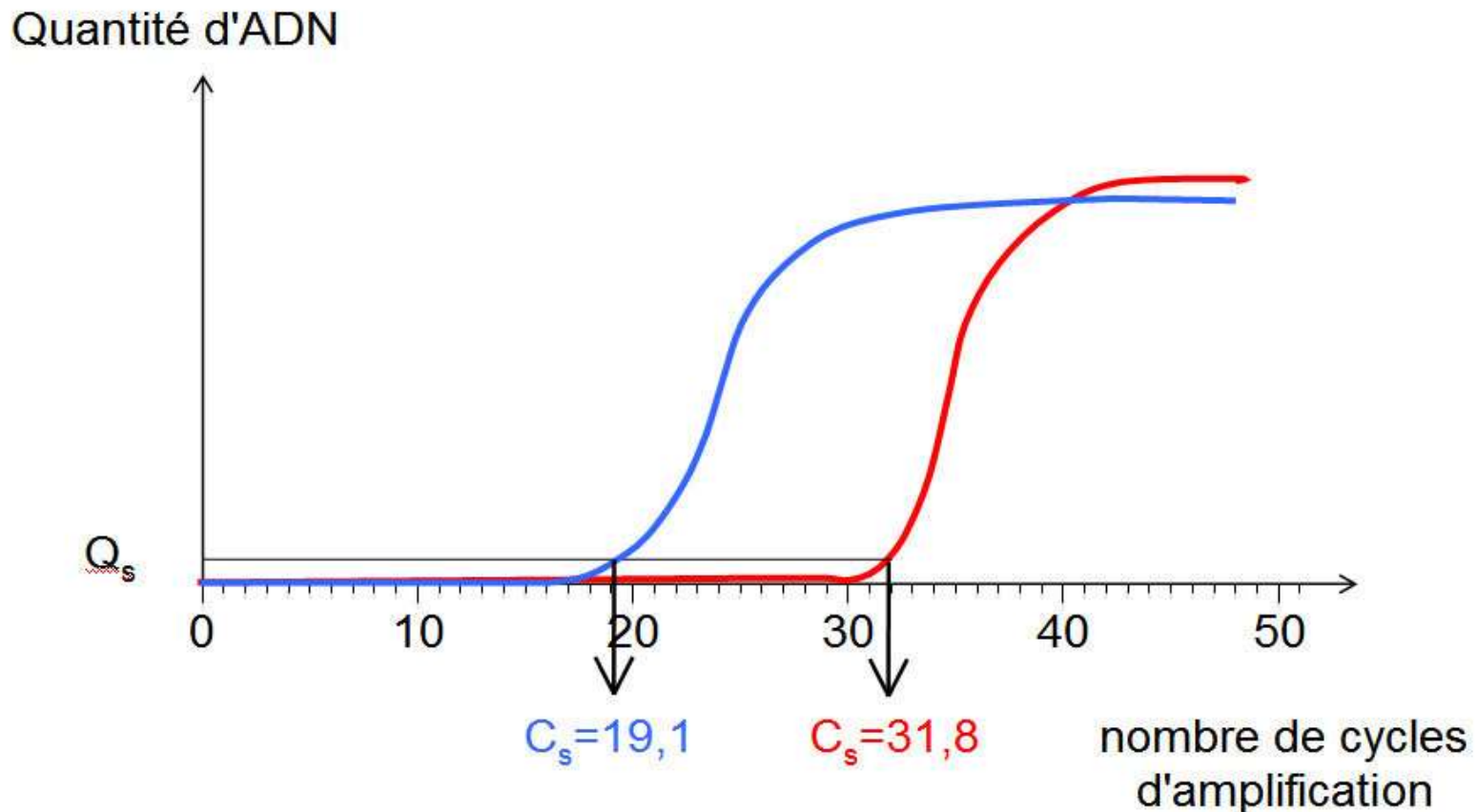
### Les trois phases de la réaction de PCR

\*\*Plus la mesure de la quantité d'ADN dans l'échantillon est précoce, plus l'expérimentateur a de chances que cette mesure ait lieu en phase exponentielle.



Le nombre de cycles d'amplification nécessaires pour atteindre la 'valeur seuil' est appelé 'cycle seuil' ( $C_s$  en français,  $C_t$  en anglais).

### Notion de cycle seuil $C_s$



L'efficacité de la duplication de l'ADN est un paramètre crucial pour le calcul des quantités d'ADN amplifiées ou présentes à l'origine.

le mélange réactionnel nécessaire pour réaliser une expérience de PCR quantitative doit comprendre :

**\*Comme pour la PCR « classique » :**

- 1- l'ADN matrice,
- 2- les amorces oligonucléotidiques à partir desquelles la polymérisation de l'ADN s'enclenche,
- 3-les désoxyribonucléotides qui sont incorporés dans l'ADN (dATP, dCTP, dGTP et dTTP),
- 4- la TAQpolymérase,
- 5- une solution tampon appropriée au bon fonctionnement de la TAQpolymérase.

**\*\*et un composé supplémentaire :**

6- le SYBR Green, qui s'intercale entre les deux brins de l'ADN lorsque la synthèse d'ADN double brin a lieu et qui permet la quantification de l'ADN à la fin de chaque cycle de synthèse d'ADN.

Pour mieux comprendre les étapes de diagnostic moléculaire de COVID-19 / Coronavirus Test:  
Real time RT-PCR - Animation video ,vous pouver Consultez :  
[https://www.youtube.com/watch?v=ThG\\_02miq-4](https://www.youtube.com/watch?v=ThG_02miq-4)

نَسْأَلُ اللّٰهَ عِزَّ وَعِلْمًا أَن يَعْلَمَنَا  
بِمَا يَنْفَعُنَا وَيَنْفَعُنَا بِمَا عَلَّمَنَا

آمِينَ يَا رَبَّ الْعَالَمِينَ