

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة I
Frères Mentouri Constantine I University
Université Frères Mentouri Constantine I

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

كلية علوم الطبيعة والحياة

Département de : **biologie animale**

قسم بيولوجيا الحيوان

**Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master de
Génétique.**

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : biologie animale.

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

*Validation d'une nouvelle technique basée sur la
PCR isotherme pour le dépistage du SARS-Cov-2*

Présenté par : LEGHROUMI IMANE

le 23/06/2022

Jury d'évaluation :

Encadreur : Dr .CHEKROUD Karim.

MCA ENSB-Constantine.

Examineur 1 : Mme SATTI Dalila

Professeur- UFM Constantine.

Examineur 2 : Mme ZIADA Hadia

MCA - UFM Constantine.

Année universitaire
2021 - 2022

Avant-propos

Le travail présenté dans ce projet de fin d'études est réalisé dans le cadre de l'obtention du diplôme de Master en Génétique à la faculté de Science de la Nature et de la Vie 'Université Frères MENTOURI sous la direction du Dr. CHEKROUD KARIM.

Les différentes étapes expérimentales de ce projet ont été réalisées au Laboratoire de l'École Nationale Supérieure de Biotechnologie Taoufik Khaznadar.

Remerciements

Tout d'abord, Louange à Dieu le tout puissant qui m'a donné la force et la volonté d'achever ce modeste travail.

Ce travail est l'aboutissement d'un long cheminement au cours duquel j'ai bénéficié de l'encadrement, des encouragements et du soutien de plusieurs personnes, que je souhaite remercier.

*J'adresse mes sincères remerciements au Dr **CHEKROUD KARIM** mon encadreur pour son orientation, ses précieux conseils et son aide dans la réalisation de ce mémoire.*

Qu'il trouve ici l'expression de mon respect et ma reconnaissance.

Je ne manquerai pas de remercier nos enseignants du département de biologie en particulier : l'équipe de la génétique veuillez trouver ici l'expression de ma respectueuse considération et ma profonde admiration pour toutes vos qualités scientifiques et humaines.

*Je tiens à remercier l'ingénieur de laboratoire de l'Ecole Nationale Supérieure de Biotechnologie Taoufik Khaznadar « **LAMIA** ».*

Finalement, merci à tous ceux qui ont contribué au succès de mon stage et qui m'a aidée lors de la rédaction de ce travail.

Dédicace

A mes chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour, soutient et leur prières tout au long de mes études. Veuillez trouver dans ce travail

Le fruit de vos sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

A mon grand-père et ma grand-mère je vous remercie pour tout le soutient et amour que vous me portez depuis mon enfance

Et j'espère que votre bénédiction m'accompagnera toujours. Ce travail est l'expression de mon respect le plus profond et mon affection la plus sincère.

A mes frères : khalil, houssam, bilal, tark, zakí sans votre aide encouragement et vos conseil ce travail n'aurait vu le jour.

A mes adorable tantes Je vous dédie ce modeste travail et je prie Dieu qu'il vous garde.

A mes petits cousins

A mes meilleurs amis

Résumé

La propagation du COVID-19 dans le monde a causé une énorme menace pour la santé publique, cette situation imprévisible et dramatique a nécessité la mise en place d'un test de diagnostic rapide, lors de la pandémie.; La détection du SARS-CoV-2 repose principalement sur des tests d'amplification quantitative par polymérase en temps réel (qRT-PCR) effectués dans des laboratoires certifiés. Certes, ces tests qRT-PCR sont très sensibles et spécifiques, néanmoins ils nécessitent des analyseurs coûteux et complexes manipulés par des laborantins hautement qualifiés, de plus ils exigent généralement un délai d'exécution allant de 4h jusqu'à 6h qui peut entraîner un retard d'application des mesures sanitaires.

D'autres tests rapides ont été développés parmi lesquels l'amplification isotherme à médiation par boucle (LAMP) a fourni un outil innovant pour établir une technique de diagnostic rapide basée sur l'amplification moléculaire de l'ARN ou de l'ADN d'un agent pathogène. Dans cette étude, nous explorons les applications, l'efficacité diagnostique du test LAMP pour le diagnostic moléculaire et la surveillance du coronavirus. Les résultats montrent que LAMP peut être considéré comme un test efficace au point de servir pour le diagnostic de Covid-19 dans les zones endémiques, en particulier pour les pays à revenu faible et intermédiaire.

Mots clés : SARS-CoV-2, LAMP, PCR, diagnostic *moléculaire*.

Abstract

The spread of COVID-19 in the world has caused huge threat to public health, this situation requires rapid diagnostic test, during pandemic; detection of SARS-CoV-2 relies primarily on quantitative real-time polymerase amplification (qRT-PCR) testing performed in certified laboratories. Admittedly, these qRT-PCR tests are very sensitive and specific, nevertheless they require expensive and complex analyzers handled by highly qualified laboratory workers, moreover they generally require a turnaround time ranging from 4h to 6h which can lead to a delay. application of health measures.

Other rapid tests have been developed such as loop-mediated isothermal amplification (LAMP) which has provided an innovative tool to establish a rapid diagnostic technique based on the molecular amplification of RNA or DNA from a pathogen. In this study, we explore the applications, diagnostic efficacy of the LAMP test for the diagnosis molecular and coronavirus surveillance. The results show that LAMP can be considered an effective point-of-care test for the diagnosis of Covid-19 in endemic areas, especially for low- and middle-income countries.

Keywords: SARS-CoV-2, LAMP, PCR, molecular diagnostics

تسبب انتشار COVID-19 في تهديد كبير للصحة العامة ، في جميع أنحاء العالم ، تطلب هذا الوضع اختبارًا تشخيصيًا سريعًا ، حيث اعتمد الكشف عن SARS-CoV-2 بشكل أساسي على تقنية الاستنساخ العكسي في الوقت الحقيقي-التفاعل البوليميري المتسلسل (qRT-PCR) التي يتم إجراؤها في المعامل المعتمدة . من المسلم به أن اختبارات qRT-PCR هذه حساسة ومحددة للغاية ، ومع ذلك فهي تتطلب محلات باهظة الثمن ومعقدة يتم التعامل معها من قبل عمال مختبرات مؤهلين تأهيلا عاليا ، علاوة على ذلك فهي تتطلب عموما وقت استجابة يتراوح من 4 ساعات إلى 6 ساعات مما قد يؤدي إلى تأخير تطبيق التدابير الصحية .

تم تطوير اختبارات سريعة أخرى مثل (LAMP) التي تعتبر أداة مبتكرة لإنشاء تقنية تشخيص سريعة تعتمد على التضخيم الجزيئي للحمض النووي الريبي أو الحمض النووي الفيروسي . في هذه الدراسة ، نستكشف التطبيقات والفعالية التشخيصية لاختبار LAMP للتشخيص المراقبة الجزيئية وفيروس كورونا. تظهر النتائج أن LAMP يمكن أن يعتبر اختبارًا فعالًا في نقطة الرعاية لتشخيص Covid - 19 في المناطق الموبوءة ، وخاصة بالنسبة للبلدان المنخفضة والمتوسطة الدخل.

الكلمات المفتاحية: SARS-CoV-2 ، LAMP ، PCR ، التشخيص الجزيئي .

Liste des abréviations

ACE2	Angiotensine Converting Enzyme 2
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN	Acide Ribonucléique
ARNg	Acide ribonucléique génomique
BIP	Backward Inner Primer
BET	bromure d'éthidium
CLIA	<i>ChemiLuminescence Immuno-Assay</i>
CTD	Domaine C-terminal
DMV	Vésicules à double membrane
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FDA	Food and Drug Administration
FIP	Forward Inner Primer
HAT	Human Airway Trypsin
HCOV	Coronavirus humains
Ig	Immunoglobuline.
IgM	immunoglobuline M.
IgG	immunoglobuline G
ME	Microscopie électronique
MERS-CoV	Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus
Mpro	Main protease
OMS	Organisation mondiale de la santé
ORF	Open Reading Frame
Protéine E	Protéine d'enveloppe
PF	Peptide de fusion
Protéine M	Protéine de membrane
Protéine nsp	Protéines non structurales
Protéine S	Protéine Spike
qRT PCR	Quantitative Real time Polymerase Chain Reaction.
RdRP	ARN polymérase ARN-dépendante.
RE	Réticulum endoplasmique
RTC	Complexe réplacase-transcriptase
RT-LAMP	Real Time Loop-Mediated isothermal amplification
SARS-CoV	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus
TMPRSS2	Tansembrane Protease, Serine Subfamily Member 2.
TM	<i>melting temperature</i>
UTR	Untranslated region
UV	Ultra-violet

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 :L'ASPECT D'UN CORONAVIRUS EN ME	22
FIGURE 2: LES CELLULES ALVEOLAIRES HUMAINES DE TYPE II INFECTEES PAR LE SARS- COV-2	22
FIGURE 3: GENOME DE SARS-COV	22
FIGURE 4: L'ORGANISATION GENOMIQUE DU SARS-COV-2	23
FIGURE 5 : : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA STRUCTURE TRIDIMENSIONNEL (3D) DE LA PROTEINE S	26
FIGURE 6: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA PROTEINE (1D)	26
FIGURE 7 : GENOME VIRALE ET PROTEINE NON STRUCTURALE	27
FIGURE 8: SCHEMA REPRESENTE CYCLE DE VIE DU SARS-COV DANS LA CELLULE HOTE	29
FIGURE 9 : L'ENTREE DU SARS-COV-2 VIA LES ENDOSOMES	30
FIGURE 10 : CYCLE VIRAL DU SARS-COV-2	32
FIGURE 11 : TEST IMMUNOCHROMATOGRAPHIQUE COVID-19 SUR BANDELETTE DE NITROCELLULOSE	35
FIGURE 12 : D'EMPLOI DU TEST D'IMMUNO-CHROMATOGRAPHIE	36
FIGURE 13 : PRINCIPE DE LA RT –Q PCR	39
FIGURE 14 : REPRESENTATION GRAPHIQUE DU RESULTAT DE LA RT-QPCR	40
FIGURE 15 : PRINCIPE DE LA TECHNIQUE RT-LAMP.	42
FIGURE 16 :VARIANTS PREOCCUPANTS	45
FIGURE 17 : LA SIMILARITE DE GENOME DE SARS-COV 2 AVEC D'AUTRE ESPECES	48
FIGURE 18 : LA FENETRE APPARUE QUAND ACCEDE A PRIMER EXPLORER.....	51
FIGURE 19 : FENETRE S'OUVRIRA POUR AFFICHER LES DETAILS DE L'ENSEMBLE.	52
FIGURE 20 : NOUVELLE FENETRE AFFICHER DETAILS DE L'ENSEMBLE D'AMORCE SELECTIONNEE.....	52
FIGURE 21 : RECUPERATION DE L'ARN PAR LA METHODE DES BULLES MAGNETIQUE.....	54
FIGURE 22 : LE VOLUME REACTIONNEL	56
FIGURE 23 : LES TUBES AVANT L'INCUBATION.....	61
FIGURE 24 : LE PROFILE D'ELECTROPHORESE.....	63
FIGURE 25 : RESULTAT DE PREMIER ESSAI DE PCR	64
FIGURE 26 : RESULTAT D'ELECTROPHORESE DE PREMIER ESSAI DE PCR	64
FIGURE 27 : RESULTAT DE DEUXIEME ESSAI DE PCR	65
FIGURE 28 : LE PROFILE D'ELECTROPHORESE DE TEST DES AMORCES.....	66
FIGURE 29 : LA BASE DE DONNEES GSAID.....	78
FIGURE 30 : LA BASE DE DONNE CLUSTALW	78
FIGURE 31 : LES RESULTATS DE L'ALIGNEMENT PAR LE LOGICIEL GRATUIT CLUSTALW	79
FIGURE 32 :L'HYBRIDATION DE GENE N PAR LES AMORCES VIRALE	80
FIGURE 33 : LES PARAMETRE DE QPCR	81
FIGURE 34 : TABLEAU AFFICHE SUR L'ECRAN.....	81
FIGURE 35 : LES PUIITS DES ECHANTILLONS	82

Liste des tableaux

TABLEAU 1: CLASSIFICATION DES CORONAVIRUS RESPONSABLES D'INFECTIONS HUMAINES.....	20
TABLEAU 2 : PROTEINE DE GENOME VIRALE (26).....	24
TABLEAU 3: LES FONCTIONS DES PROTEINES NON STRUCTURALES (33).....	28
TABLEAU 4 : RESULTATS IDENTIFIES A PARTIR DES DETECTIONS DE L'ARN VIRAL ET DES ANTICORPS SEROLOGIQUES (IGM ET IGG) (.....)	37
TABLEAU 5 : LES MUTATIONS DES VARIANTS DE SARS –COV 2 (85).....	47
TABLEAU 6 : LES VOLUMES PRELEVES POUR PREPARER LA DILUTION POUR LE MELANGE DES AMORCES.....	55
TABLEAU 7 : LES VOLUMES PRELEVE POUR LA 2 EME PREPARATION.	55
TABLEAU 8 : PROTOCOLE DE LA LAMP SELON FABRIQUANT.....	56
TABLEAU 9 : PREPARATION DE LA DILUTION DE 5 AMORCES.....	58
TABLEAU 10 : LES AMORCES REGULIERES F3, B3, FIP ET BIP CONÇUES PAR LE LOGICIEL PRIMER EXPLORER 5.	60
TABLEAU 11 : LES AMORCES DE BOUCLE CONÇUE PAR DE LOGICIEL PRIMER EXPLORER 5.....	61

INTRODUCTION	4
---------------------------	---

<u>PARTIE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</u>	6
--	---

chapitre 01 :SARS-COV 2

1. HISTORIQUE :	8
2. CLASSIFICATION :	10
3. PARTICULE CIRCULANTE DU SARS-COV :	11
4. STRUCTURE DU SARS-CoV-2 :	12
4.1 GENOME VIRAL :	12
4.2 ORGANISATION DU GENOME :	13
4.3 PROTEINES STRUCTURALES:	15
LA PROTEINE N :	15
LA PROTEINE S :	15
LA PROTEINE M :	16
LA PROTEINE E :	16
4.4. LES PROTEINES NON STRUCTURELLES :	17
5. CYCLE VIRAL :	18
5.1 L'ENTREE DE VIRUS SARS –COV DANS LA CELLULE HOTE :	18
5.2 LA VOIE D'ENTREE VIA LES ENDOSOMES:	19
5.3 LA VOIE D'ENTREE VIA LA SURFACE CELLULAIRE :	20
5.4 LA REPLICATION DU GENOME VIRAL ET SYNTHÈSE DES PROTEINES VIRALES :	21

Chapitre 02 : diagnostic de SARS-COV 2

INTRODUCTION :	24
1 DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE :	25
2 DIAGNOSTIC DIRECT :	28
2.1 <u>LA PCR EN TEMPS REEL :</u>	28
2.1.1 PRINCIPE :.....	28
2.1.2 LA DETECTION DU GENOME VIRAL SARS-CoV-2 PAR QRT-PCR :.....	29
2.2 <u>TECHNIQUE LAMP :</u>	31
2.2.1 La détection du génome viral SARS-CoV-2 par lamp per :.....	31
3 LA VARIABILITE GENETIQUE :	33
3.1 LA DENOMINATION DES VARIANTS DU SARS-CoV-2 ;.....	34

PARTIE II : PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre 03: matériel et méthode

TYPE ET LIEU <i>D'ETUDE</i> :.....	40
MATERIEL:	40
METHODE :	41
CONCEPTION DES AMORCES LAMP PCR:.....	41
DILUTION DES AMORCES :.....	45
PROTOCOLES EXPERIMENTAUX LAMP-PCR: (PREMIERE DETECTION).....	46
PROTOCOLES EXPERIMENTAUX DE NOS ESSAIS DE PCR : (DEUXIEME DETECTION).....	47

Chapitre 04 : résultats et discussion

RESULTATS :	50
CONCEPTION DES AMORCES	50

RESULTAT DE LAMP PCR : (PREMIERE DETECTION)	51
RESULTATS DE PCR : (DEUXIEME DETECTION)	53
DISCUSSION :	57
REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE :	61
ANNEXES	67

INTRODUCTION

Les coronavirus sont des virus à ARN enveloppés qui sont courants chez les humains, les autres mammifères et les oiseaux et provoquent des maladies respiratoires, entériques, hépatiques et neurologiques. Sept espèces de coronavirus sont connues pour provoquer des maladies chez l'homme. Les autres souches – coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS-CoV), coronavirus du syndrome respiratoire ont été liées à des maladies parfois mortelles

L'OMS a nommé, le 11 février 2020, la maladie respiratoire provoquée par le Sars-CoV-2 : le Covid-19. Elle est considérée comme urgence de santé publique à portée internationale. La vitesse de propagation du Sars-CoV-2 a conduit les scientifiques partout dans le monde à mener de nombreuses recherches pour mieux connaître et affronter ce virus redoutable

A la fin de l'année 2019, la détection de la première infection par un nouveau virus SARS-COV-2 (*Sévère Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*) Corona Virus appartenant de la famille de *Coronaviridae*, est signalée dans la ville de Wuhan en Chine, ce virus provoque une série d'infections respiratoires aiguës.

La maladie causée par ce virus est caractérisée par de la fièvre, une toux sèche, de la fatigue, des myalgies, un essoufflement et une dyspnée. (1) Appelée Coronavirus, abrégé COVID-19 (Corona Virus Disease 2019). Le virus se propage dans le monde entier de façon alarmante et touche plus de [120 000] cas diagnostiqués et plus de [4000] décès dans 110 pays. L'Organisation Mondiale de Santé (OMS), déclare le statut de pandémie le 11/03/2020. (2)

Malgré toutes les précautions et les mesures préventives précoces prises partout dans le monde le chiffre des cas confirmés et des décès augmente à un rythme rapide.

Afin d'atténuer la morbidité et la mortalité, il est nécessaire d'identifier rapidement et précisément les personnes infectées, en mettant en œuvre les techniques de diagnostic virologique rapide et spécifique. Le choix est porté sur la RT-PCR qui est une technique enzymatique d'amplification du matériel viral à très haute performance. Cette méthode nécessite des réactifs et des équipements dédiés coûteux et une formation spécialisée des opérateurs. De plus, la durée de l'analyse s'étale de 3h à 5h ce qui n'est pas adapté avec les conditions sanitaires actuelles et les services des urgences. (3)

Aussi, des tests antigéniques ont été proposés pour le diagnostic mais ils manquent de sensibilité et leurs résultats doivent être interprétés avec une très grande prudence. (4)

En revanche, une autre approche de RT –PCR a été développée pour l'identification rapide du COVID19. Cette méthode est basée sur une technologie dite «isotherme» qui permet de s'affranchir de l'utilisation du thermocycleur, de réduire les couts et d'étaler ainsi l'identification du virus vers le dépistage en plus du diagnostic pour donner des résultats en 30 minutes.

Objectif :

L'objectif de ce travail est la validation d'une nouvelle technique dite LAMP-PCR, basée sur la PCR isotherme pour le dépistage de SARS-COV-2.médiée par boucle pour le dépistage de SARS-COV ou la détection direct de SARS-COV 2 à partir d'échantillons cliniques (prélèvement naso-pharyngé) en seulement 30 minutes.la sensibilité et la spécificité de la technique basée sur le principe de l'amplification isotherme de l'acide nucléique RT-LAMP (*Real Time Loop-Mediated isothermal amplification*) en comparaison avec la technique de référence qRT-PCR

Dans ce manuscrit, une partie théorique sera consacrée à l'étude de l'infection par le virus SARS-COV-2, ses aspects virologiques et épidémiologiques. expérimentale, nous validerons et l'interprétation et la discussion des résultats composera la dernière partie..

PARTIE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 01 : SARS-COV 2

1. HISTORIQUE :

Les coronavirus forment une immense famille de Virus, il a été regroupé à partir de critères essentiellement morphologiques des virus animaux connus depuis les années 1930 (virus de la bronchite infectieuse ou IBV, virus de l'hépatite murine ou MHV, virus de la gastroentérite porcine ou TGEV), et parfois infecter l'homme (5). Le genre de coronavirus a été proposé en 1967. (6).

Ces virus sont connus depuis 1930 chez les animaux où une bronchite infectieuse aviaire (IBV) est enregistrée en Amérique de nord. C'est une nouvelle maladie respiratoire aigue chez les poussin qui se caractérise par une détresse respiratoire et un contagiosité très élevée, une toux et une mortalité sévère chez les jeunes poussin (7). En 1937 deux chercheurs américains de l'université *Rutgers* Fred Robert Beaudette et Charles Bannus Hudson annoncent dans le journal *of the American Veterinary Medical Association* qu'ils avaient réussi à isoler et à cultiver l'agent pathogène responsable de la bronchite infectieuse . (8)

En 1946 Virus de la gastroentérite porcine a été identifié. Quelque années après, entre 1949-1951 un autre Virus provoque une hépatite chez les souris a été découvert c'est le Virus de l'hépatite murine. (8)

Le lien entre ces maladies causées par ces Virus n'a pas été déterminé et il n'a pas été prouvé qu'ils appartiennent à la même famille jusqu'à la découverte du premier coronavirus qui infecte l'être humain (HCOV). En 1966 deux chercheurs de l'université de Chicago ont réussi à cultivé un Virus sur des cultures de cellules rénales embryonnaires humaines inoculées avec des prélèvements respiratoires d'étudiants en médecine atteints de rhumes .Ce Virus désigné HCOV229E est morphologiquement similaire à la bronchite (9)

Par la suite, les chercheurs ont remarqué que les trois virus (IBV, virus de la gastroentérite porcine et l'hépatite murine) qui infectent les animaux et les HCOV apparaissent tous sous le microscope électronique (ME) avec un aspect de couronne. Cela indique qu'ils appartiennent à la même famille, d'où la dénomination de « coronavirus ». (10)

En 2003, un premier coronavirus pathogène provoque une épidémie de pneumonie dans le sud de la chine, se caractérisant généralement par une fièvre élevée et des symptômes respiratoire légers, l'agent responsable du syndromes respiratoire aigue sévère (SARS) est nommé SARS – COV . (11)

Le MERS –COV (*Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus*) apparu en 2012 est un autre coronavirus détecté chez un patient atteint d'une pneumonie sévère à Jiddah en Arabie saoudite. (8)

En décembre 2019 des cas d'une pneumonie sévère signalée à Wuhan se propagent d'une façon alarmante en chine, c'est une nouvelle souche de coronavirus qui va causer une épidémie mondiale. (12) .

Le virus a été isolé, analysé par séquençage et son génome est comparé avec d'autres Virus pour établir la source d'infection. Cela a indiqué que 2019-nCOV partage 79,5 % et 55% de similarité de l'enchaînement des nucléotides avec SARS-COV et MERS-COV respectivement. Le virus est appelé n-COV19 puis SARS –COV 2 par le comité international de taxonomie des virus et l'OMS attribua le nom de COVID 19 pour désigner la maladie causée par ce virus. (13)

2. CLASSIFICATION :

Selon la classification du comité international de nomenclature des Virus (ICTV), le SARS-Cov-2 appartient à la famille des *coronaviridea* membre de l'ordre *Nidovirale* qui comprend la sous famille des *coronavirnea* comprenant quatre genres alpha, beta, gamma, delta coronavirus. (14) .

Le genre *alphacoronaverus* comprend deux sous genres : *Duvinacovirus* et *Setracovirus* , le genre *betacoronaverus* comprend quatre sous genre : *Embecovirus*, *Hibecovirus*, *Merbecovirus* et *Sarbecovirus*. (15)

Le SARS – COV considéré comme un des sept membres des familles qui infectent l'homme COV229E (HCoV-229 E) ,COV-NL63, appartiennent au genre *alphacoronaverus* et HCoV-OC43, HCoV-HKU1 appartiennent au genre *betacoronaverus* clade A , et SARS –COV1 et SARS –COV 2 ou clade B MERS-COV clade C. (Tableau 01) (16) (17)

Genre	Sous genre	Clades	Espèce
Alphacoronavirus	- <i>Duvinacovirus</i> - <i>Setracovirus</i>	/	<i>HCoV-229 E</i> (1996) <i>HCoV-NL63</i> (2004)
Betacoronavirus	- <i>Embecovirus</i> , - <i>Merbecovirus</i> - <i>Sarbecovirus</i> .	Clade A Clade B Clade C	<i>HCoV-OC43</i> (1967) <i>HCoV-HKU1</i> (2005) <i>SARS-CoV-1</i> (2003) <i>SARS-CoV-2</i> (2019) <i>MERS-CoV</i> (2012)

Tableau 1: Classification des coronavirus responsables d'infections humaines

3. Particule Circulante du SARS-COV :

L'aspect en couronne visible en microscopes électronique est dû à la présence sur l'enveloppe virale de spicules en forme de massue de 20 nm de hauteur et constitués de la protéine de surface S (Fig. 1). (18)

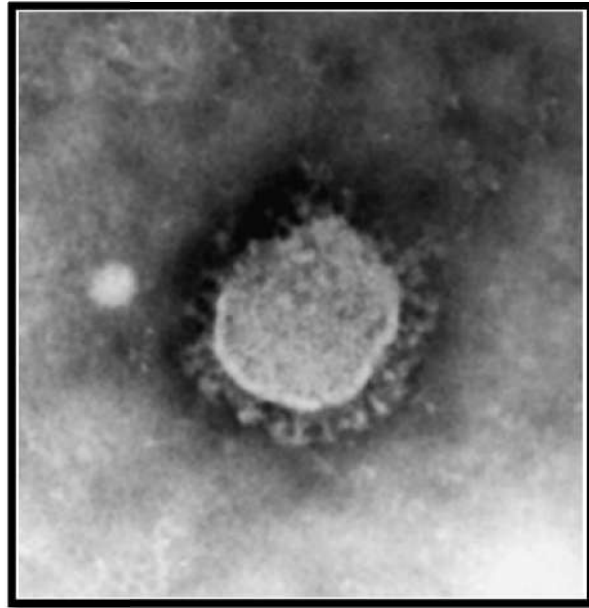


Figure 1 :L'aspect d'un coronavirus en ME (18).

Les cellules cibles du SARS-CoV-2 sont les cellules épithéliales :

Épithélium cilié de la muqueuse nasale, de la trachée, des bronches ou des alvéoles pulmonaires. De plus, le virus infecte préférentiellement les cellules alvéolaires de type II que les cellules de type I. Pour cette raison, les cellules alvéolaires humaines de type II ont été isolées, cultivées in vitro, puis infectées par le SARS-CoV-2 (Fig. 2). Les particules virales sont visibles dans des vésicules à double membrane dans les cellules de type II et le long des microvillosités apicales. (19)

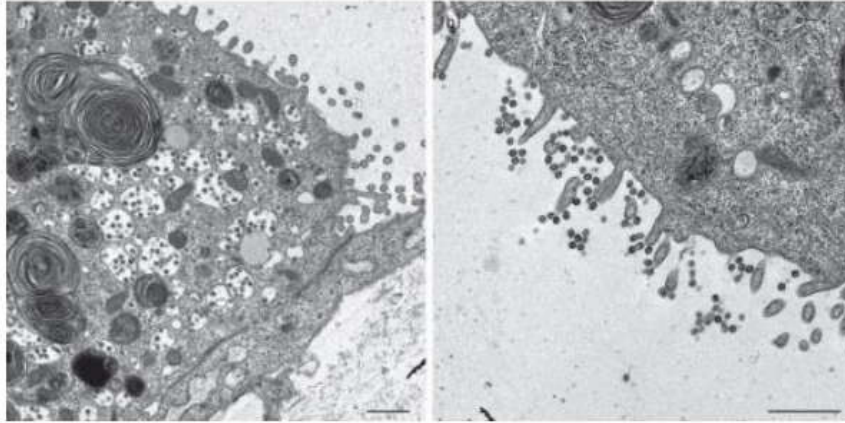


Figure 2: Les cellules alvéolaires humaines de type II infectées par le SARS-CoV-2 (19)

4. STRUCTURE DU SARS-CoV-2 :

4.1 GENOME VIRAL :

Le génome du coronavirus est composé d'environ 30 000 Nucléotides (20) , Les coronavirus présentent une enveloppe virale sont des virus enveloppés à ARN. Il s'agit d'ARN monocaténaire non segmenté à polarité positive, cette très grande taille de génome permet l'émergence des variants. (21).

Le génome code pour quatre protéines structurales : La nucléocapside de symétrie hélicoïdale formée par la nucléoprotéine (N). La protéine membranaire (M) qui donne la forme de l'enveloppe virale , La protéine d'enveloppe (E) et La protéine Spike (S) qui donne au virus l'aspect de couronne et aussi la dénomination de cette famille. Le génome code également pour d'autres protéines non structurales. (22) (Fig. 3)

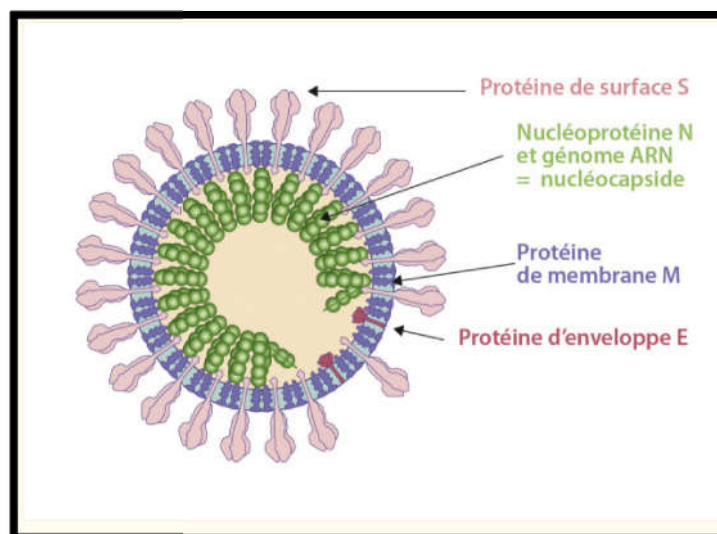


Figure 3: Genome de SARS-COV (23)

Le génome de SARS-COV-2 comprend deux régions non codantes 5' (séquence leader) et 3' (queue poly A), et une partie codante divisé en 6 à 7 ORF selon les espèces les 1^{er}ORF :OFR1 a et OFR1 b, sont chevauchantes et correspondant au 2/3 du génome, elle code deux polyprotéines appelé pp1a et pp1ab qui sont rapidement clivée en 16 protéines non structurales. Entrent dans le complexe de réplication/ transcription.

Le tiers restant du génome situé en 3' comporte les gènes codent pour les protéines de structure (N, M, E, S). (24)

4.2 ORGANISATION DU GENOME :

Le génome de SARS-COV-2 à une taille de 29.891 Pb, Avec 38% C+G. Une extrémité 5' coiffée et une queue polyadénylée (poly A) en 3'. (25).

Les extrémités 5' et 3' se composent de deux régions non traduites UTR qui contient plusieurs structures nécessaires à la réplication et la transcription. (10)

L'ordre des gènes est le même dans tous les membres de la famille des coronavirus : 5' réplicase-structurel gène -S-E-M-N (Fig 4). Chaque gène est précédé d'une séquence régulatrice de la transcription TRS nécessaire à l'expression de chaque gène. (10)(Fig. 4)

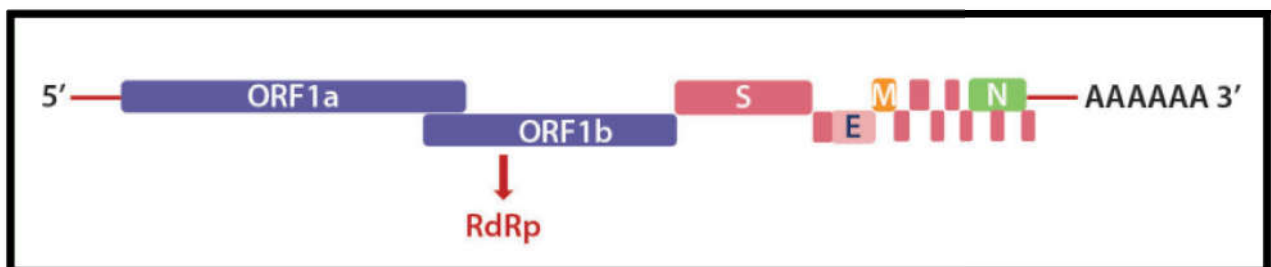


Figure 4: L'organisation génomique du SARS-CoV-2 (10)

ORF	Locus	Taille (aa)	Protéine
L'ORF1a	<i>YP_009725295.1</i>	4405	<ul style="list-style-type: none"> - Polypeptide pp1a . - en 11 protéines non structurales (nsp) . Le décalage de cadre par -1 ribosome (trois nucléotides) produit en amont du codon stop de l'ORF1a, permettant la poursuite de la traduction de l'ORF1b.
L'ORF1b	<i>BCA87361.1</i>	2691	<ul style="list-style-type: none"> - Produit un grand polypeptide (Pp1ab), coupé en 5 nsps. - ce clivage protéolytique est médié par les protéases virales nsp3 et nsp5 qui abritent respectivement un domaine protéase de type papaïne et un domaine protéase de type 3C. D'ailleurs, l'ORF1b code le complexe de réplication-transcription qui est médié par nsp12, possédant une activité ARN polymérase ARN-dépendante (RdRP).
L'ORF1ab	<i>BCB15089.1/BCB97900.1</i>	7096	<ul style="list-style-type: none"> - La plus grande protéine, c'est la fusion d'ORF1a et ORF1b et permet la traduction de la polyprotéine pp1ab grâce à un nœud de phase efficace à 25%. - Cette polyprotéine est ensuite clivée par des protéases virales en 16 nsp nommées nsp1 à nsp16 impliquées dans le complexe de réplication et de transcription des coronavirus.

Tableau 2 : protéine de génome virale (26)

D'une autre part, le reste du génome est constitué par au moins quatre cadres de lecture ouverts :

- **L'ORF2, ORF4, ORF5, ORF9** : codent respectivement les gènes des protéines structurales (S, E, M et N).
- **L'ORF3, ORF6, ORF7, ORF8 et ORF10** : codent les gènes des protéines accessoires du SARS-CoV-2 .

4.3 PROTEINES STRUCTURALES:

LA PROTEINE N :

La protéine N complexée à l'ARN viral génomique (ARNg) forme la nucléocapside du SARS –COV, elle a une taille de 419 acides aminés et 45.63 kDa. Elle a un rôle dans la stabilisation de la forme en hélice de l'ARNg et également impliquée dans le processus de la réplication d'ARN g.

La protéine N aussi facilite l'interaction de la protéine M, elle est fortement phosphorylée, cela augmente l'affinité pour l'ARN virale, elle contient trois domaines hautement conservés NTD un domaine de liaison à l'ARN (LKR) et CTD.

La nucléocapside est entourée d'une bicouche lipidique dérivée de la cellule hôte, dans laquelle sont enchâssées les trois protéines d'enveloppe S, M et E (10), et on note l'absence de l'hémagglutinine-estérase (HE) qui est une caractéristique commune des *Betacoronavirus* du clade A.

LA PROTEINE S :

La protéine S (spike) est une glycoprotéine transmembranaire de type I, de grande taille, elle est organisée en trimère et composée en deux sous-unités S1 et S2. Elle donne au virus l'aspect de couronne grâce à ces extensions à la surface de la particule virale . (27).

La protéine S est multifonctionnelle. Elle joue un rôle important dans la première étape du cycle virale permettant d'une part la liaison du récepteur cellulaire (S1) et d'autre part la fusion de l'enveloppe virale avec les membranes des cellules cibles (S2) et la pénétration de Virus dans la cellule hôte. (27)(Fig. 5)

Elle est la cible principale de la réponse immunitaire cellulaire et humorale et induit la formation d'anticorps neutralisants.

- **La sous-unité S1** ou sous-unité d'attachement (partie globulaire) est composée d'un domaine Nterminal (NTD) impliqué dans la fixation des sucres, et d'un domaine C-terminal (CTD) contenant le domaine de liaison au récepteur cellulaire RBD (*Receptor Binding Domain*). (28)

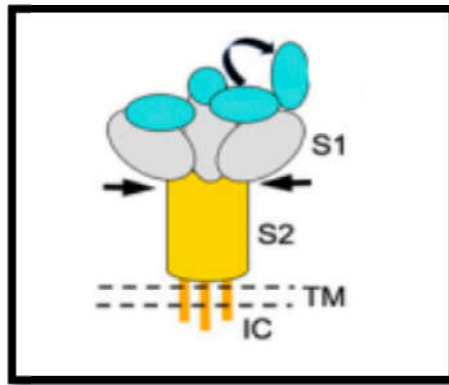


Figure 5 : : Représentation schématique de la structure tridimensionnel (3D) de la protéine S (29)

- **La sous-unité S2** (partie en forme de tige) contient les quatre éléments requis pour la fusion membranaire virale ; un peptide de fusion (PF), deux répétitions heptadique HR1 (*heptad repeat 1*) et HR2 (*heptad repeat 2*) et un domaine TM.



Figure 6: représentation schématique de la protéine (1D)

LA PROTEINE M :

La protéine M ou la protéine de membrane est la plus abondante dans l'enveloppe, doit son nom à son rôle dans les interactions entre l'enveloppe et la ribonucléoprotéine , elle joue un rôle majeur dans l'assemblage des virions et définit la forme de l'enveloppe virale. C'est une protéine matricielle et doit son nom à son rôle dans les interactions entre l'enveloppe et la ribonucléoprotéine (10) (30).

Elle a trois domaines transmembranaire avec une extrémité amino-terminale à l'extérieur (ectodomaine) de la particule virale et une extrémité carboxy-terminale qui constitue environ la moitié de la protéine. Elle se situe à l'intérieur (endodomaine) de la particule virale. (10).

LA PROTEINE E :

La plus petite protéine et la moins abondante. Elle joue un rôle structural et forme les canaux ioniques. Elle n'est pas obligatoire pour la réplication virale mais joue un rôle majeur dans la pathogénie du virus. (31)

Elle possède une extrémité N-terminale courte, a un domaine transmembranaire puis d'une extrémité C-terminale constituant la majorité de la protéine. La protéine E ne possède pas de

peptide signal clivable ce qui indique que c'est une protéine transmembranaire de type II.
L'inactivation de la protéine E ou son absence totale diminue la sévérité du coronavirus. (10)

4.4 LES PROTEINES NON STRUCTURELLES :

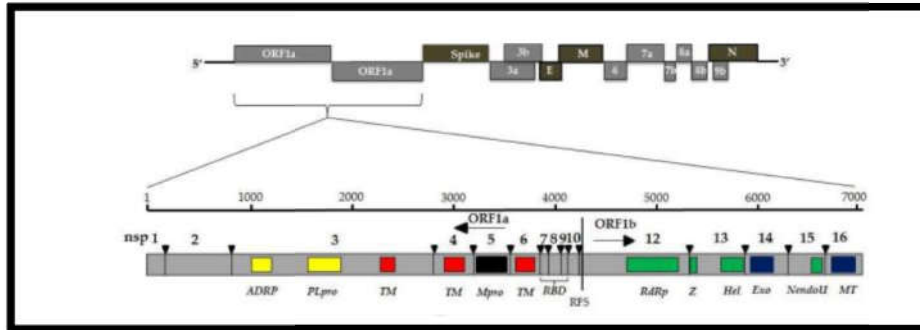


Figure 7 : Génome virale et protéine non structurale (32)

Les protéines non structurales sont composées des ORF1a et ORF1b chevauchantes, la traduction de ces derniers sont traduits en deux polyprotéines (pp1a et pp1ab) (Figure7) (10) qui vont être clivées par des protéases pour former le complexe ARN répliqueuse-transcriptase, constitué de 16 nsp (ORF1a : nsp1 à 11, ORF1b: nsp12 à 16) (33)

Protéine non structurale nsp	Fonction
Nsp 1 et nsp 3	- Inhibition de la signalisation de l'interféron et blocage de la réponse immunitaire innée de l'hôte par la promotion de la dégradation cellulaire, et aussi blocage de la traduction de l'ARN de l'hôte.
Nsp2	- Liaison à la protéine de pro-inhibition.
nsp 3 et nsp 5	- Favorise l'expression des cytokines et le clivage de la polyprotéine virale.
Nsp4 et nsp 6	- Contribue à la structure des vésicules à double membrane (DMV) en tant que protéine d'échafaudage transmembranaire
Complexe nsp7/nsp8 Nsp9	- Pince de processivité pour l'ARN polymérase par le complexe hexadécamérique des bras. - Protéine phosphatase liant l'ARN.
nsp 10, nsp 16 et nsp 14	- Stimulation de l'activité de l'exoribonucléase (l'ExoN) et du 2'O méthyltransférase (2'-O-MT)

nsp 12	- Enzyme de réplication (ARN polymérase ARN-dépendante).
nsp 13	- ARN hélicase, 5' triphosphatase
nsp 14	- Correction d'épreuves du génome viral
nsp 15	- Endoribonucléase virale et protéase de type chymotrypsine.

Tableau 3: Les fonctions des protéines non structurales (33)

5. CYCLE VIRAL :

Le cycle du virus dans la cellule hôte se répartit en trois grandes étapes :

5.1 L'ENTREE DE VIRUS SARS –COV DANS LA CELLULE HOTE :

L'entrée de Virus dans la cellule hôte est définie par les interactions entre les particules virale « la protéine S » et les récepteurs à la surface cellulaire. Et comme déjà cité, le SARS-COV-2 est un Virus enveloppé donc après sa liaison initiale avec le récepteur de la cellule hôte, l'enveloppe virale doit fusionner avec la membrane de la cellule hôte pour libérer la nucléocapside virale dans la cellule cible. (34)

La capacité d'un Virus à entrer dans la cellule hôte repose sur l'attachement et la reconnaissance spécifique du récepteur exprimé à la surface de la cellule cible c'est la récepteur ACE2 (Angiotensine Converting Enzyme 2). Grâce à une interaction de haute affinité environs ~10 fois plus grande par rapport au SARSCoV-1, Il s'agit d'une protéine très fréquemment présente dans la membrane cellulaire on la retrouve dans des cellules des alvéoles pulmonaires, de l'œsophage, des intestins, du pancréas, des parois artérielles et du cœur. C'est une métalloprotéinase composée de 805 acides aminés, qui dégrade l'angiotensine II et angiotensine 1-7. (35)

Récemment, une équipe internationale de chercheurs a trouvé que les cellules épithéliales nasales en particulier les cellules gobelets (sécrétrices) et les cellules ciliées présentent le taux le plus élevé d'ACE2 dans l'ensemble des voies respiratoires. (36)

La pénétration de SARS –COV 2 dans la cellule hôte se fait par deux voix distinctes : (Fig. 8)

- la voie de la surface cellulaire.
- la voie endocytyque dans les compartiments endosomal-lysosomal.

D'ailleurs, la contribution de chaque voie dans un type de cellule donné dépend largement de l'expression de certaines protéases.

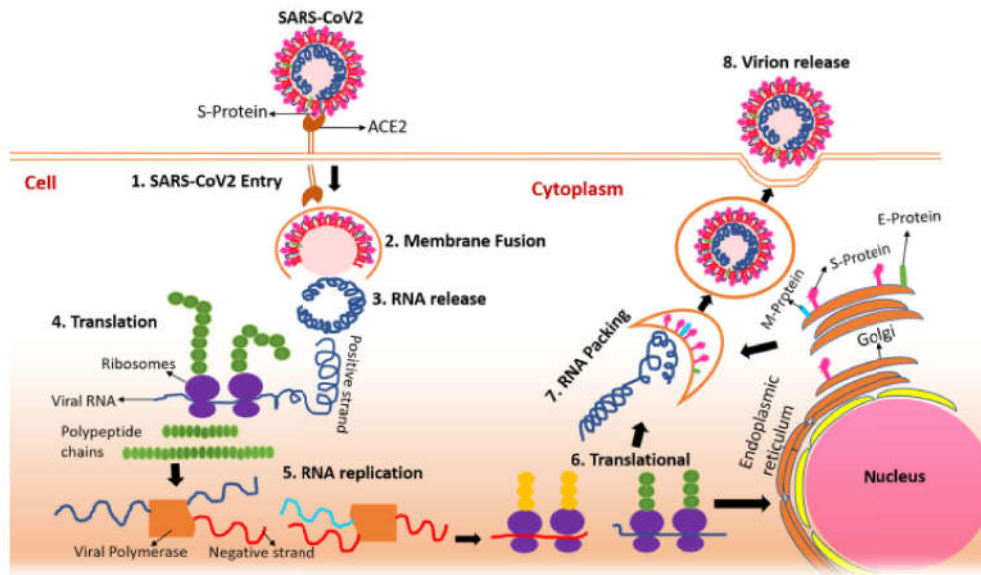


Figure 8: schéma représenté cycle de vie du SARS-COV dans la cellule hôte (37)

5.2 LA VOIE D'ENTREE VIA LES ENDOSOMES:

Après la liaison de la protéine *spike* de SARS-COV avec le récepteur cellulaire l'ACE2 dans la cellule hôte, le virus peut également entrer dans la cellule via les endosomes c'est à dire de vésicule intracellulaires dont l'activité dépend du PH interne (38), tout d'abord, la partie S1 de la protéine S se lie à l'ACE2 au niveau de la membrane cellulaire, puis la partie S2 sert de médiateur à la fusion. Cette fusion se produit après que la protéine S est activée par la protéase endosomale cathepsine là travers un clivage de la frontière S1 / S2 et de la position de la S2 (39) (Fig. 9)

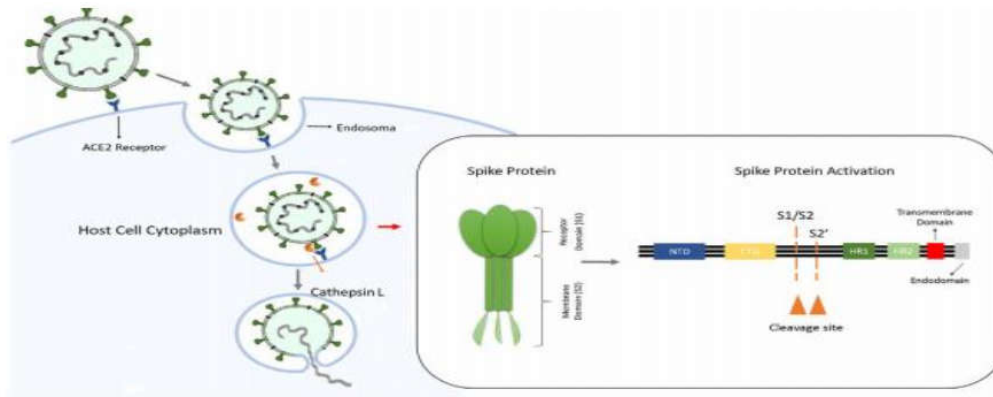


Figure 9 : L'entrée du SARS-CoV-2 via les endosomes (40)

La protéine *spike* de SARS-CoV-2 comprend un site de clivage compatible avec l'action de la furine une pro-protéine convertase qui permet aux sous-unités S1/S2 d'être clivée dès la biosynthèse virale et avant la libération des nouveaux virus dans l'environnement extracellulaire ce qui pourrait majorer le potentiel infectant du virus. (41) (42)

Enfin, l'ARN viral libéré par l'entrée médiée soit par TMPRSS2 ou par les protéases endosomales est répliqué sous forme de copies partielles ou complètes du génome et traduit dans le réticulum endoplasmique (RE) pour former de nouveaux virions SARS-CoV-2. (41).

5.3 LA VOIE D'ENTREE VIA LA SURFACE CELLULAIRE :

La S1 (partie globulaire) de la protéine S lie au récepteur ACE2 et entraîne un changement de conformation sur la sous unité S2 (partie en forme de tige) et permet la fusion membranaire qui nécessite l'activation de la protéine S (42) par le clivage protéolytique réalisée à la surface cellulaire grâce à la protéase membranaire TMPRSS2 (*Transmembrane Protease, Serine Subfamily Member 2*) au niveau de deux sites (43) : au niveau de l'arginine 797 entre S1/S2 et au niveau de l'arginine 797 de site de clivage S2 (44). En plus d'autre protéase peuvent également activer la protéine *spike* comme la trypsine et la HAT (*Human Airway Trypsin*) pour favoriser la fusion à travers la voie cellulaire.

Seule la protéase qui est capable d'induire l'infection des virus à la surface cellulaire tandis que la HAT pourrait jouer un rôle dans la propagation du virus. Cette protéase protège la protéine S également contre l'inhibition par les IFITM (*Interferon-Inducible Transmembrane Proteins*), des protéines cellulaires induites par l'interféron qui inhibent l'entrée cellulaire de plusieurs virus enveloppés (10).

5.4 LA REPLICATION DU GENOME VIRAL ET SYNTHÈSE DES PROTÉINES VIRALES :

Le cycle de réplication des coronavirus se déroule en 8 à 10h, par plusieurs étapes (transcription de l'ARN, synthèse des protéines virales et assemblage des virions), elle est strictement cytoplasmique. (24)

Le génome viral a polarité positif fait la réplication par l'intermédiaire de synthèse d'un brin d'ARN à polarité négatif par l'utilisation de la machinerie cellulaire de la cellule hôte, (24) après la pénétration du virus et le largage de la nucléocapside dans le cytosol. Par conséquent, pour la réplication du génome du SARS-COV et la transcription de ses gènes, il est utilisée un large complexe réplicase-transcriptase (RTC) formée dans des vésicules à double membrane (DMV) Ce complexe est principalement composé d'un assemblage de sous-unités contenant une ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp) ou nsp12, nsp7 et nsp8, ces deux dernières augmentent la liaison et la processivité du RdRp. (10) .

Le complexe (RTC) est assemblé et un ARN virale à polarité négative (-) est synthétisé comme matrice pour la synthèse de nouveaux ARN génomiques de polarité positive (+) et d'ARN subgénomiques messagers. Ainsi, au cours du processus de la transcription, 7 à 9 ARNs subgénomiques sont produits, incluant ceux des protéines structurales (fig 10) (45).

Donc le RTC permet de répliquer l'ARN viral, d'autre part, en formation d'ARN sous – génomique, production de nouvelles protéines structurales et nouveau virion. (46) Une fois que le génome viral est répliqué et que les ARNs subgénomiques sont synthétisés, ils sont par la suite traduits en protéines structurelles telles que les protéines S, M, et E. Ces protéines sont insérées dans la membrane du RE (Réticulum endoplasmique) puis déplacées vers le compartiment intermédiaire réticulum endoplasmique-Golgi où les particules virales sont assemblées. Pendant ce temps, le programme génomique préalablement répliqué peut directement joindre la protéine N à la forme de la nucléocapside et se déplacer dans l'ERGIC. Dans ce compartiment, la nucléocapside va s'assembler avec les glycoprotéines d'enveloppe ce qui permet aux nouvelles particules virales de bourgeonner et de former de petites vésicules qui sont expulsées hors de la cellule par exocytose (Fig. 10) (47)

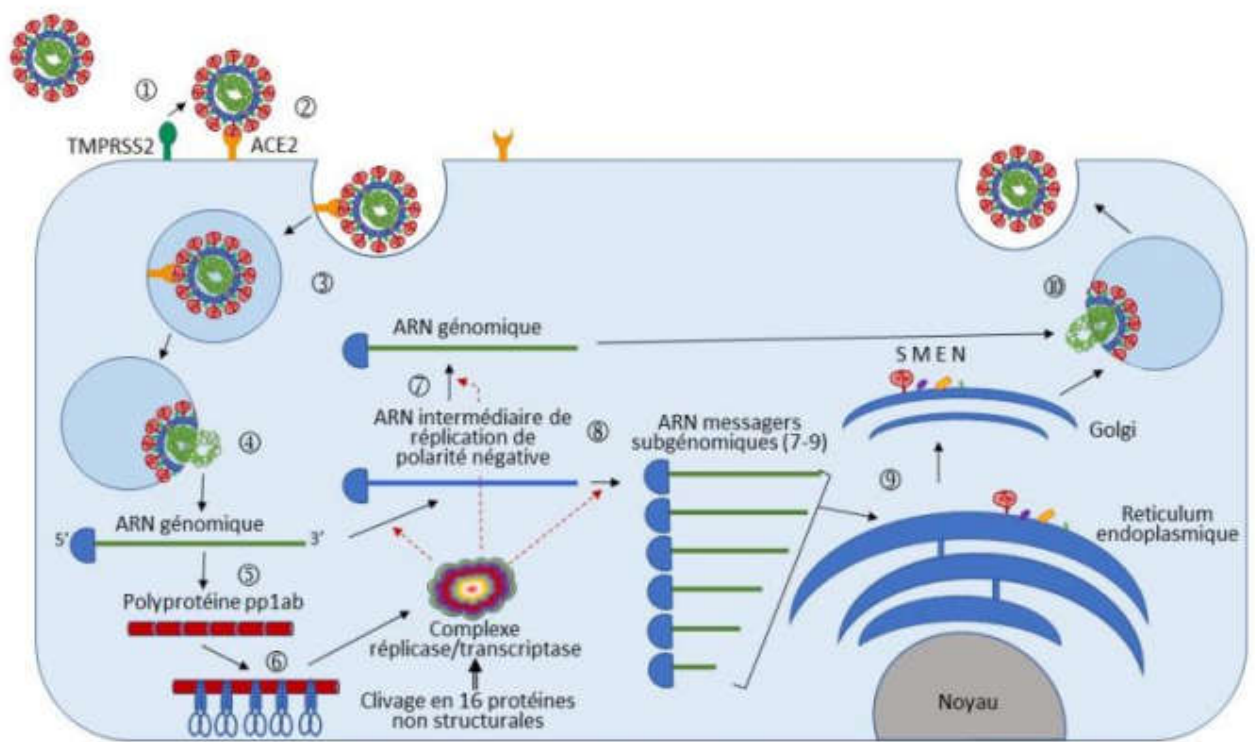


Figure 10 : Cycle viral du SARS-CoV-2 (48)

Chapitre 02 : diagnostic de SARS-COV 2

Introduction :

La pneumonie causée par le nouveau virus coronavirus (SARS-COV-2) en chine, pose une grande menace pour la santé publique mondiale, il est important d'établir un test de diagnostic standard rapide pour la détection des maladies infectieuses (COVID-19), pour prévenir la propagation secondaire ultérieure.

Deux types de tests sont proposés pour le diagnostic de COVID-19. La détection du génome viral du SARS-CoV-2 dans les voies aériennes supérieures désigné diagnostic moléculaire et la recherche de la réponse des anticorps dans un prélèvement sanguin désigné diagnostic sérologique.

La PCR en temps réel sur prélèvement nasopharyngé est considérée comme un test de référence pour gérer la pandémie. C'est l'une des méthodes de laboratoire les plus rapides et les plus précises qui soient pour détecter, suivre et étudier le virus à l'origine de cette maladie. C'est une technique utilisée pour la détection d'ARN et l'ADN virale à partir d'une simple copie d'une séquence d'acide nucléique.

La confirmation du diagnostic doit répondre à l'urgence de la situation tout en respectant les règles de bonnes pratiques au laboratoire. En effet, plusieurs indications sont présentes pour les tests de diagnostic virologique.

- Confirmer l'infection chez toutes les personnes qui répondent à la définition du cas suspect.
- Proposer la levée de la quarantaine chez les cas confirmés et cliniquement guéris.
- Dépister les personnes qui ont été en contact avec un cas confirmé.
- Effectuer un diagnostic différentiel notamment chez les personnes vulnérables.

1 Diagnostic sérologique :

La personne infectée par le coronavirus développe une réponse immunitaire adaptative humorale, la sérologie sur prélèvement sanguin permet de détecter l'anti – SARS COV (IgG et IgM) et faire un dépistage initial de l'infection pour les patients n'ayant pas bénéficiés précocement d'un test PCR. (49)

La sérologie considéré comme un test de rattrapage pour les patients ayant les symptômes et le résultat de PCR négatif, défèrent types de tests automatisable sont proposé sont les plupart ciblent les protéines de structures. (50)

Des tests quantitatifs : réaliser en laboratoire sur un prélèvement sanguin tels que les tests de diagnostique rapide le dosage d'immunoabsorption par enzyme liée désigné ELISA repose principalement sur la détection des anticorps dans le sang, plasma ou sérum (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) ou chimiluminescence désigné CLIA (*ChemiLuminescence ImmunoAssay*) de le dosage immunologique des IgG spécifiques anti-S1 et S2 de SARS-CoV2. (51)

Des tests qualitatifs : appelés communément dosage à flux latéral ou LFA (*Lateral Flow Assay*) pouvant être réalisés sans passer par un laboratoire sur un prélèvement sanguin à travers une piqûre au doigt et sont basé sur l'immunochromatographie appliqué sur bandelette de nitrocellulose, et permettent d'établir un diagnostic rapide en quelques minutes (<15 minutes) (Figure 24). (52)

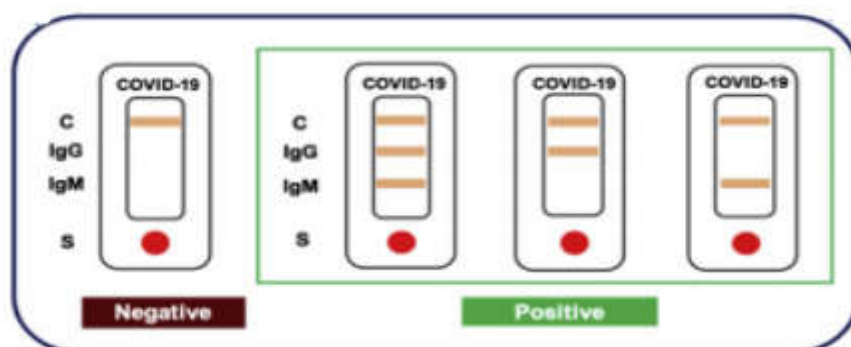


Figure 11 : Test immunochromatographique COVID-19 sur bandelette de nitrocellulose (53)

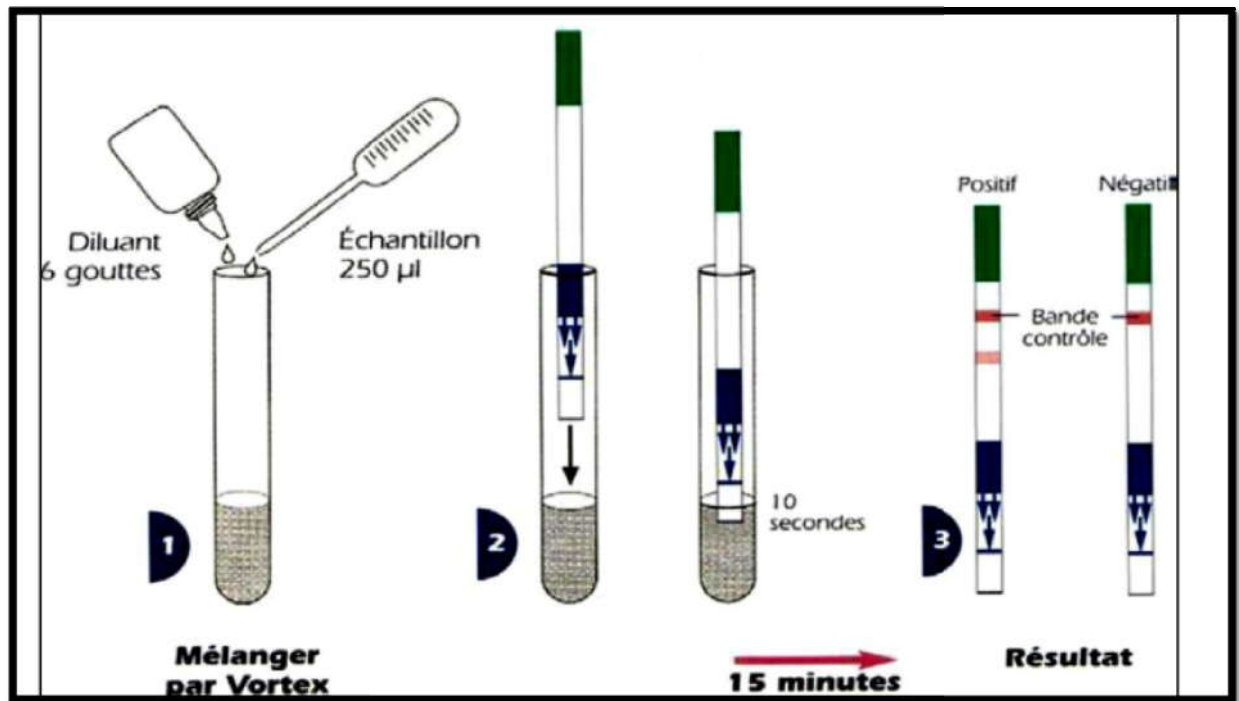


Figure 12 : d'emploi du test d'immuno-chromatographie.

Le résultat de la sérologie de SARS–COV ne donne pas des informations sur l'état d'infectieux ou la gravité d'infection de patient mais prouve qu'une personne a été exposée antérieurement au SARS-CoV-2, qu'elle ait eu des symptômes ou non. (54).

Bien que les tests sérologique permettent de détecter les anticorps (IgM , IgG) à partir de la deuxième semaine depuis le début des symptômes, ils ne sont cependant pas recommandés par l'OMS (55) dans le diagnostic de l'infection aiguë, Le rôle de la sérologie réside beaucoup plus dans la surveillance épidémiologique et la détermination de la proportion de la population ayant déjà contracté la COVID-19 . (56)

Mais en combinaison avec la détection de l'ARN viral, ces tests sérologiques d'anticorps fournissent un spectre de résultats phénotypiques d'un patient vis-à-vis de la maladie. (57)

Détection de l'ARN SARS-CoV-2	IgM	IgG	Phénotypes de COVID-19
<i>Positif</i>	+	+	<i>Patient confirmé COVID-19</i>
<i>Positif</i>	+	-	<i>Patient confirmé COVID-19</i>
<i>Positif</i>	-	+	<i>Patient asymptomatique mais sain</i>
<i>Positif</i>	-	-	<i>Patient diagnostiqué au stade très précoce</i>
<i>Négatif</i>	+	+	<i>Patient COVID-19 convalescent</i>
<i>Négatif</i>	+	-	<i>Patient primo-infection par d'autres virus</i>
<i>Négatif</i>	-	+	<i>Patient COVID-19 rétabli</i>
<i>Négatif</i>	-	-	<i>Patient non infecté</i>

Tableau 4 : Résultats identifiés à partir des détections de l'ARN viral et des anticorps sérologiques (IgM et IgG) (58)

2 Diagnostic direct :

LA PCR EN TEMPS REEL :

1.1 PRINCIPE :

RT –PCR en temps réel est l'une de technique de laboratoire la plus utilisé pour détecté le SARS-COV-2, et d'autres virus comme virus Ebola et virus Zika (59). Basé sur la détection de l'ARN virale par PCR quantitative en temps réel sur prélèvements rhinopharyngés. Cette technique repose sur l'amplification du génome à l'aide d'un appareil appelé « thermocycleur » permettant de faire varier la température au cours du temps Solon trois étapes : dénaturation hybridation et élongation. Avec une étape clé la conversion de l'ARN en ADN Solon un processus appelé « transcriptase inverse ». (59)

Cette technique permet de mesurer la quantité des séquences d'ADN cible au début et la quantité des amplicons (produit d'amplification), par l'utilisation d'un fluorochrome . (60)

Ce système utilise le bromure d'éthidium est un agent intercalant, comme marqueur fixe sur les brins d'ADNc et rend détectable. (60)

Après l'extraction d'ARN virale on traite avec un enzyme spécifique « transcriptase inverse » dans un tube avec des fragments d'ADN et dNTP et ADN polymérase et le marqueur, on place dans un thermocycleur qui stimule l'émission des échantillons par rayonnement UV (ultra violet). L'émission de la fluorescence est mesurée à l'aide d'un détecteur lorsque le bromure d'éthidium se fixe sur l'ADN double brin produit au cours de l'amplification, liée par l'ordinateur de l'appareil, les résultats s'affichent en temps réel à l'écran, et le système produit des courbes d'amplification. (61)

Les cycles d'amplification se répètent de nombreuses fois (30 à 40 fois) et permettent d'obtenir un grand nombre de copies du fragment nucléotidique cible. A chaque cycle la quantité double : on passe de deux copies à quatre, puis de quatre à huit ainsi de suite .

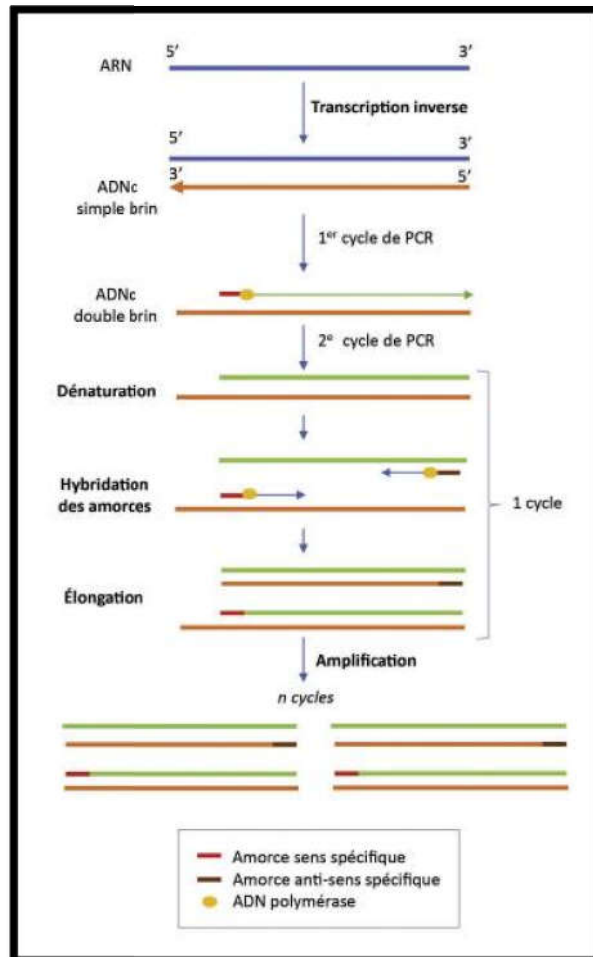


Figure 13 : Principe de la RT –q pcr (62)

LA DETECTION DU GÉNOME VIRAL SARS-CoV-2 PAR QRT-PCR :

Dans le cas de COVID-19, la détection repose sur l'amplification des gènes conservés du SARS-CoV-2, principalement les gènes (N, RdRp, E, S), dans un thermocycleur où il est chauffé et refroidi suivant des cycles cela Selon les trois étapes (63) :

- Etape 1 : Dénaturation (à 95°C) des doubles brins d'ADNc pour obtention des simples brins.
- Etape 2 : Hybridation (environ 55°C) d'un couple d'oligonucléotides amorces qui délimitent la région d'ADNc à amplifier.
- Etape 3 : Elongation (environ 72°C) par une ADN polymérase thermorésistante présente dans le milieu réactionnel dite « *Taq Polymérase* » à partir des extrémités 3'OH des amorces et ainsi la formation de brins en respectant les règles de complémentarités des bases.

Les étapes d'hybridation et d'élongation sont répétées 30 à 40 fois, ce qui permet d'obtenir un grand nombre de copies du fragment nucléotidique cible. Dans chaque cycle

d'amplification, la quantité d'ADN est mesurée grâce à un marqueur fluorescent. L'émission de fluorescence est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits. [En ligne]

La PCR en temps réel fait un suivi de la quantité de la fluorescence émise pendant la réaction avec indicateur de la production des amplicons durant chaque cycle, lorsque la fluorescence dépasse un certain seuil ou l'ARN virale amplifié devient détectable, la présence du virus est confirmée, et le nombre de cycle pour atteindre le seuil permet d'estimer la gravité d'infection. Et ils appelé « *Cycle threshold* » ou « Ct ». (64)

Graphiquement le « Ct » est l'intersection entre une courbe d'amplification durant la phase exponentielle et une ligne de base. (fig 15) .

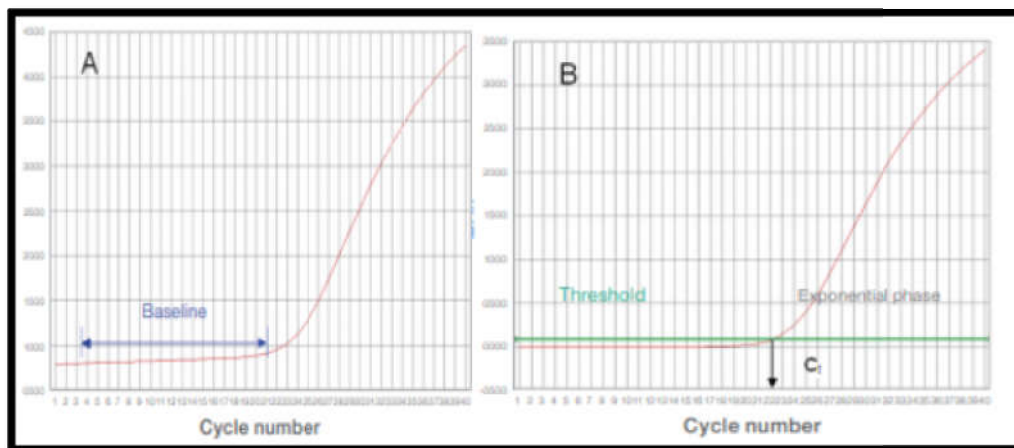


Figure 14 : représentation graphique du résultat de la RT-QPCR (65)

TECHNIQUE LAMP :

1.2 La détection du genome viral SARS-CoV-2 par lamp pcr :

L'amplification isotherme médiée par boucle (LAMP), est une autre méthode diagnostique reposant sur une approche moléculaire demeure disponible pour détecter le virus du SARS-CoV-2 permet d'obtenir des résultat en 30 à 60 min .

Cette technique a été développée par Notomi T et al . en 2000 , elle a été adopté pour la détection de nombreux pathogènes , comme malaria , la grippe, virus de ZIKA (66).

LAMP ne nécessite pas des réactifs et des instruments coûteux, ce qui contribue à réduire les coûts de détection des coronavirus. (67)

La détection LAMP augmente la sensibilité spécifique due à l'amplification exponentielle à l'aide de 6 séquences différentes cibles reconnues par différentes amorces en même temps et dans la même réaction. (68). Cette technique est basée sur l'activité de déplacement de l'ADN polymérase *Bst* de *Geobacillus stearothermophilus* dans des conditions isothermes à 60-65 °C , l'optimum pour l'activité de la polymérase (69) et le dosage nécessitent au total six amorces (FIP , BIP , Loop F , Loop B , F3 , B3) , reconnaissant huit sites distincts de la séquence cible .

La méthode RT-LAMP commence par la liaison de l'amorce interne BIP avec la séquence cible à l'extrémité 3' de la matrice d'ARN et avec l'activité de la transcriptase inverse, une copie du brin d'ADNc est synthétisée. Ensuite, grâce à l'ADN polymérase, les amorces B3 se fixent sur le côté des matrices, génèrent un nouveau brin d'ADNc, tout en libérant simultanément le brin d'ADNc précédemment formé par le BIP. Ce brin unique d'ADNc est ensuite bouclé à son extrémité et se lie à lui-même. Puis, l'amorce interne FIP se lie à l'extrémité 5' du brin et synthétise un brin complémentaire par l'ADN polymérase. Tandis que l'amorce F3 se lie à la région située à l'extérieur du FIP et son extrémité 3' devient le point de départ de la synthèse tout en libérant simultanément le brin d'ADN précédemment formé par la FIP. La boucle continue à fonctionner comme une structure en haltère lorsque l'amorce FIP ou BIP initie la synthèse de l'ADNc à l'emplacement de la séquence cible suivante. Le cycle peut commencer soit du côté avant, soit du côté arrière du brin. Lorsqu'il démarre, le brin

Subit une synthèse d'ADN auto-amorcée pendant l'étape d'élongation du processus d'amplification (Fig.15) (70).

Alors que la situation sanitaire actuelle en a besoin des tests rapides pour contrôler la maladie, et temps que la RT-pcr nécessite un personnel de laboratoire hautement qualifié et peut prendre des jours pour générer des résultats , la méthode de LAMP la solution (71)

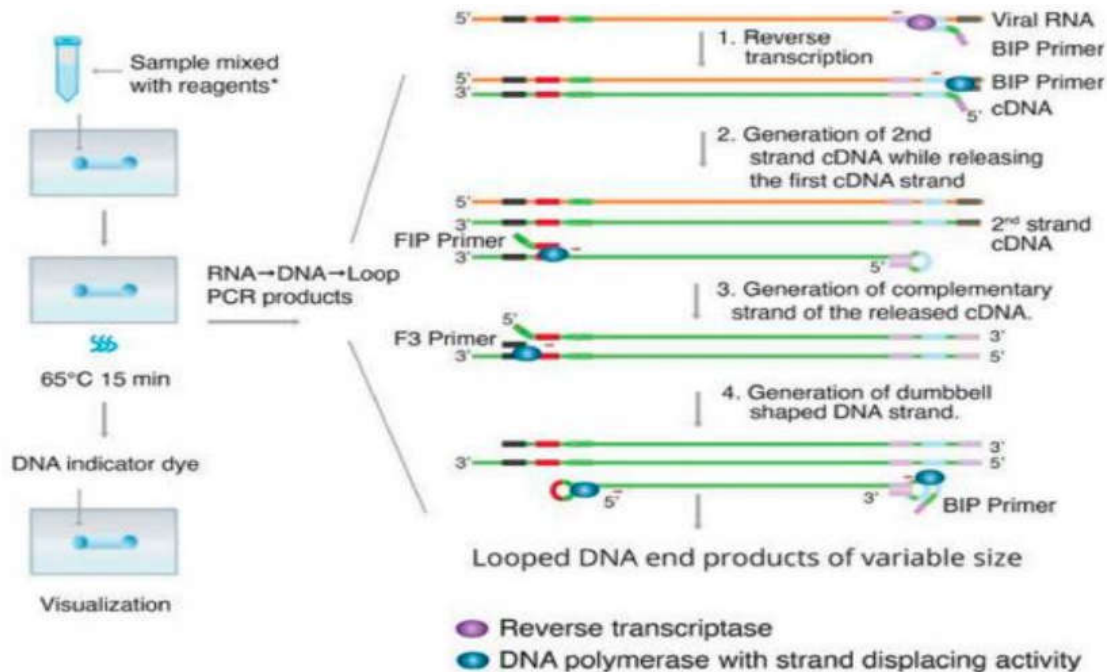


Figure 15 : Principe de la technique RT-LAMP. (72)

La conception de six morces de LAMP est basée sur le choix des régions du gene ciblé dans le sens 5' vers 3'. L'amorce FIP (Forward Inner Primer) contient 2 régions : la région F1c de l'extrémité 5' est complémentaire de la région F1 de l'ADN cible et la région F2 de l'extrémité 3' est complémentaire à la région F2c de la cible, également le BIP (Backward Inner Primer) se compose de la séquence B2 (à son extrémité 3') qui est complémentaire de la région B2c, et de la même séquence que la région B1c à son extrémité 5'. Les amorces LPF et LPB quant à elles contiennent des séquences complémentaires de la région simple brin en boucle (single-stranded loop region) , F1 F2 , B1 B2 . Les amorces B3 F3 est complémentaire aux les régions B3c F3c respectivement. (73)

3 La variabilité génétique :

La diversité génétique des virus présente une difficulté sur le plan médicale et biologique, car elle a un impact important sur le diagnostic et le dépistage et surtout la thérapie. (74).

La grande taille du génome de SARS-COV présente une grande variabilité génétique causée par des mutations ponctuelle, des délétions, des recombinaisons, ces modifications nucléotidiques dans le génome du virus peuvent codent des protéines enrichissant leur potentiel d'adaptation (24). Les virus à ARN sont particulièrement vulnérables aux taux de mutation élevés lors de la réplication de génome. Parfois ces taux élevés n'a aucun effet significative et parfois sont corrélés à une transmissibilité et/ou un échappement immunitaire accrue, des caractéristiques qui sont considérées comme bénéfiques pour les virus. (75)

L'ARN génomique est répliqué par une ARN polymérase ARN dépendante (RdRp), dépourvue de système de correction d'erreur , et générant de nombreux mutants (76). Dans le génome de coronavirus, la recombinaison génomique est un événement courant du processus de réplication et peut jouer un rôle important dans la génération de la diversité ; c'est un échange de matériel génétique, elle peut être homologue si elle a lieu entre deux génomes de coronavirus, ou hétérologue si elle intéresse d'autres gènes viraux ou cellulaires (77) (78). De nombreuses formes recombinantes ont été décrites in vitro et in vivo chez les coronavirus. Il a été prouvé in vitro que l'inactivation génétique de protéine non structurale nsp14 3-5' exoribonuclease (Nsp14-ExoN) diminue le taux de recombinaison dans la cellule infectée des varions libérée. On peut conclure que la protéine non structurelle nsp14 3-5' exoribonuclease (Nsp14-ExoN) est impliquée dans la recombinaison (77) , Le traitement antivirale et la réponse immunitaires peut entraîner des erreurs et provoque des mutations. Aussi, l'accumulation des mutations peut conduire à l'extinction de l'espèce virale. (79)

Depuis le début de la pandémie de nombreuse mutation ont été décrites dans la littérature ayant un effet sur : la transmissibilité des souches. L'efficacité des vaccins et le diagnostic virologique (80)

L'impact des variant de SARS –COV 2 sur les performances des tests PCR n'est pas significatif à ce jour car la plupart des tests PCR utilisés dans le monde continuent de détecter l'infection.

LA DENOMINATION DES VARIANTS DU SARS-COV-2 :

Il existe plusieurs dénominations des variant en fonction des instances : GISAID, Nextstrain, Pango et l'OMS (Lettres alphabet grec) pour nommer et suivre les lignées génétiques du SARS-CoV-2 avec une évolution et changement rapide même pour un même variant.

Les variant sont classé en trois catégorie selon leur risque par l'OMS (VOC, VOI et VUM) :

- **Variant Préoccupants (Voc) Ex: Delta :**

Un variant préoccupant du SARS-CoV-2 ou variant à suivre **présente les changements:**

- Augmentation de la transmissibilité
- Augmentation de la virulence, d'une maladie plus grave (par exemple, augmentation des hospitalisations ou des décès)

- **Variants A Suivre (Voi) Ex: Mu :**

Variant qui présente des **modifications génétiques connues pour affecter ou susceptibles d'affecter les caractéristiques du virus**, telles que la gravité de la maladie, la transmissibilité; le diagnostic, les traitements ou l'échappement immunitaire; et qui cause une transmission communautaire majeure ou de multiples foyers de COVID-19, entraînant une augmentation de la prévalence relative ainsi qu'une augmentation du nombre de cas au fil du temps, ou d'autres conséquences épidémiologiques exposant ainsi les personnes à des risques émergents et représente une Inquiétude sur la santé publique mondiale.

- **Variants Sous Surveillance (Vum) :**

Variant qui présente des **modifications génétiques soupçonnées d'affecter les caractéristiques** du virus, et il y a des signes qu'elle peut présenter un risque futur, mais la preuve de l'impact phénotypique ou épidémiologique n'est pas encore claire, donc qui devrait recevoir une surveillance renforcée et des évaluations répétées et attendre d'autres preuves.

Dénomination de l'OMS	Lignée PANGO	Clade GISAID	Clade Nextstrain	Premiers échantillons répertoriés	Date de désignation
Alpha	B.1.1.7	GRY	20I (V1)	Royaume-Uni, septembre 2020	Variant préoccupant : 18 décembre 2020 Variant anciennement préoccupant : 9 mars 2022
Bêta	B.1.351	GH/501Y.V2	20H (V2)	Afrique du Sud, mai 2020	Variant préoccupant : 18 décembre 2020 Variant anciennement préoccupant : 9 mars 2022
Gamma	P.1	GR/501Y.V3	20J (V3)	Brésil, novembre 2020	Variant préoccupant : 11 janvier 2021 Variant anciennement préoccupant : 9 mars 2022

Figure 16 : Variants préoccupants (81)

Depuis le premier cas en Wuhan en Chine plusieurs lignées de variants ont émergés (le variant britannique, brésilien..) et posant un grand risque sur la santé publique. L'organisation mondiale de la santé (OMS) a déclaré le 24 novembre 2021 qu'un nouveau variant du SRAS-CoV-2 (B.1.1.529) a été signalé au Botswana et en Afrique du Sud, nommé « omicron » le 26 novembre 2021, l'OMS le classe dans la catégorie des variants préoccupants (VOC).

Après le séquençage du génome de ce variant, des chercheurs en Afrique du sud, indiquent que le variant Omicron présentait 50 mutations et que la plupart d'entre elles (plus de 30 mutations) avaient été signalées dans la protéine Spike (protéine S) du SRAS-CoV-2, les vaccins et traitements par anticorps monoclonaux approuvés par les agences réglementaires ont été signalés comme moins efficaces contre ce variant que contre les variants communs, notamment le vaccin d'Oxford Astra Zeneca. De plus, ce variant est considéré comme moins sensible aux anticorps neutralisants du plasma de convalescence pour la COVID-19 (ou évasion immunitaire), ce qui soulève des inquiétudes quant aux risques accrus de réinfection et de résistance à la vaccination pour ce variant.

La très grande taille de génome de SARS-COV 2 permet l'émergence des variants à cause de la mutation dans leurs protéine structurale et surtout la protéine « S » qui provoque des souches deviennent plus virulentes et résistantes à la neutralisation les anticorps. (82)

Le diagnostique de SARS-COV par les testes PCR ou les nouveau testes telle que LAMP PCR peut être influencé par ces mutations, , (83)

Les amorces cibler les séquences les plus conservé de SARS-COV ORF1ab et le gène N (84) .

Variant	La première détection	Lignée	La protéine	Mutation
Omicron	Botswana /Hongkong /Afrique du sud.	B.1.1.529+BA	S E M N	- Spike D614G, Spike D796Y, Spike E484K, Spike L452R, Spike L455F, Spike L981F, Spike N679K, Spike N764K, Spike N856K, Spike N969K, Spike P681H, Spike Q954H, Spike T478K - E T9I - M A63T, M D3G, M Q19E. -N E31del, N G204R, N P13L, N R32del, N R203K, N S33del, NSP3 A1006V, NSP3 K38R, NSP4 T60I, NSP4 T492I, NSP4 V167L, NSP6 I189V, NSP12 P323L, NSP14 I42V
Delta GK	Inde	B.1.617.2+AY.	S M N	-Spike D614G, Spike D950N, Spike E484K, Spike G142D, Spike L452R, Spike P681R, Spike T19R, Spike T95I, Spike T478K, Spike V159del, Spike Y160del, Spike Y266del. - M I82T -N D377Y, N G215C, N R203M, NS3 S26L, NS7a T120I, NS7a V82A, NS7b E3stop, NS7b T40I, NSP2 G339S, NSP3 A488S, NSP3 P1228L, NSP3 P1469S, NSP3 P1867T, NSP4 T492I, NSP4 V167L, NSP6 T77A, NSP12 G671S, NSP12 P323L, NSP13 P77L, NSP14 A394V
Alpha	UK	B.1.1.7	S N	-Spike A570D, Spike D614G, Spike D1118H, Spike E484K, Spike H69del, Spike N501Y, Spike P681H, Spike S982A, Spike T716I, Spike V70del, Spike Y144del. - N D3L, N G204R, N R203K, N S235F, NS7a A55S, NS8 K68stop, NS8 Q27stop, NS8 R52I, NS8 Y73C, NSP3 A890D, NSP3 A1796V, NSP3 I1412T, NSP3

				P679S, NSP3 T183I, NSP5 P241L, NSP6 F108del, NSP6 G107del, NSP6 S106del, NSP12 P323L
BETA	sud Afrique	GH/501Y.V2	S E N	-Spike A243del, Spike A701V, Spike D80A, Spike D215G, Spike D614G, Spike E484K, Spike H1159P, Spike K417N, Spike L242del, Spike L244del, Spike N501Y - E P71L. -NS3 S171L, NS3 T151I, NSP2 G220C, NSP2 T85I, NSP5 K90R, NSP6 F108del, NSP6 G107del, NSP6 S106del.
GAMMA	Brazil / Japon	GR/501Y.V3	S N	-Spike D138Y, Spike D614G, Spike E484K, Spike H655Y, Spike K417T, Spike L18F, Spike N501Y, Spike P26S, Spike R190S, Spike T20N, Spike T1027I, Spike V1176F. -N G204R, N P80R, N R203K
Lambda	Piero sud Amérique	C.37	S N	-Spike D614G, Spike E309del, Spike F490S, Spike G75V, Spike G311del, Spike I312del, Spike K310del, Spike L242F, Spike L452Q, Spike Q314del, Spike T76I, Spike T859N, Spike V308del, Spike Y313del. -N G204R, N G214C, N P13L, N R203K, NSP3 F1569V, NSP3 K1771R, NSP3 P1469S, NSP3 S40F, NSP3 T428I, NSP4 G208S, NSP4 L438P, NSP4 T492I, NSP5 G15S, NSP6 F108del, NSP6 G107del, NSP6 S106del, NSP12 H725R, NSP12 P323L
MU	Colombie	B.1.61	S N	-Spike D614G, Spike E484K, Spike ins143T, Spike K417N, Spike N501Y, Spike P681H, Spike R346K, Spike T95I, Spike Y144S, Spike Y145N. -N R14C, N T205I, NS3 Q57H, NS3 V256I, NS8 P38S, NS8 T11K, NSP2 A294S, NSP2 S543F, NSP3 T237A, NSP3 T720I, NSP4 T492I, NSP6 Q160R, NSP12 P323L, NSP13 P172H, NSP13 P419S, NSP14 V125F, NSP16 R216S

Tableau 5 : les mutations des variants de SARS –COV 2 (85)

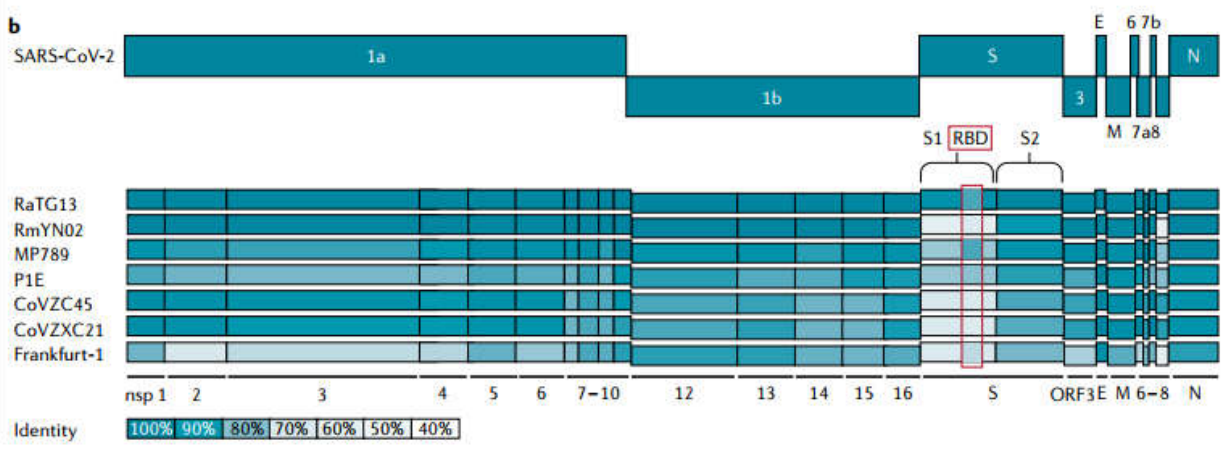


Figure 17 : la similarité de génome de SARS-COV 2 avec d'autre espèces (86)

PARTIE II : PARTIE EXPERIMENTALE

TYPE ET LIEU D'ETUDE:

Il s'agit d'une étude expérimentale et comparative avec la technique de référence RT-PCR effectués sur plusieurs échantillons d'ARN et ADN de patients anonymes, positifs au COVID-19 obtenue à partir d'une plateforme d'un laboratoire privé. La partie expérimentale a été effectuée au laboratoire de biologie moléculaire de l'Ecole Nationale Supérieure de Biotechnologie « Toufik Khaznadar ».

Matériel:

Matériel biologique :

L'ARN et l'ADNc proviennent d'extraits de prélèvements *nasopharyngé* réalisés sur des patients Covid-19 positifs dans un laboratoire d'analyse médicale privée. Les échantillons sont anonymes. Toutes les préparations ont été conservés à -20°C.

Equipements de laboratoire :

- Thermocycleur Eppendorf mastrecycler Nexus (USA). 96 puits
- Thermocycleur RT-qPCR qTOWER3, Analytik Jena (Germany) (Fig. 20) équipé d'un bloc d'échantillons SBS à 96 puits.

Méthode :

CONCEPTION DES AMORCES LAMP PCR:

La conception a été réalisée à l'aide du logiciel : <https://primerexplorer.jp/e/>.

- Sur la base de données de nucléotides NCBI, télécharger le génome de SARS-COV 2 (GenBank : MN908947.3) sous format FASTA .(copier dans un fichier Bloc Note).
- Accéder a la base de donné GISAID télécharger le génome des variant.
- Accéder gratuitement a la plateforme CLUSTALW faire un copier coller des génomes et clique sur execute multiple alignement (Annexe).
- Choisi une séquence conservé.
- Enregistré la séquence dans un fichier Bloc Note.
- Importer le fichier « choose file ».

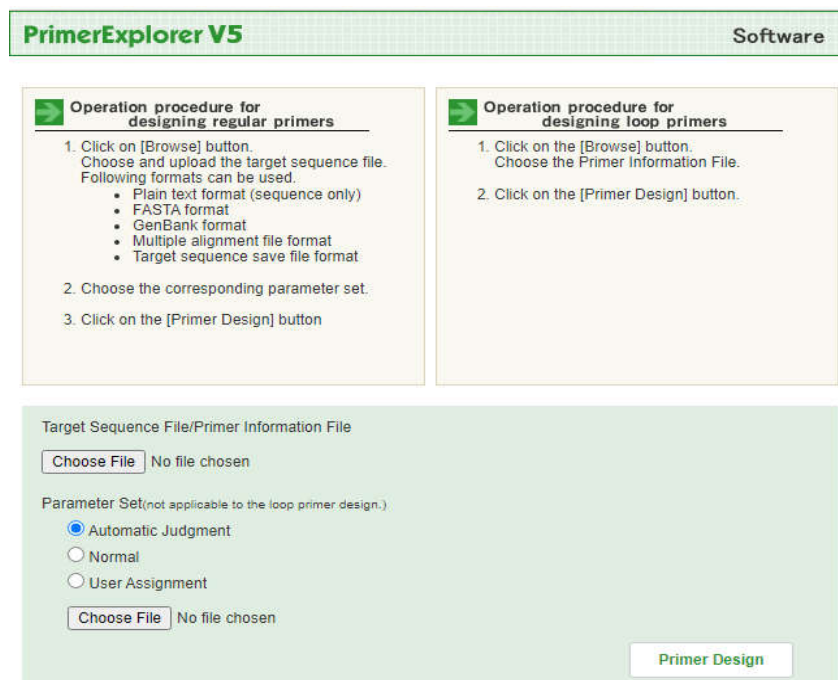


Figure 18 : la fenêtre apparue quand accédé à PRIMER EXPLORER

← → ↻ Not secure | primerexplorer.jp/lampv5e/servlet/ListPage

PrimerExplorer V5 Software

1. Turn on the check box to make an order.
2. Push "Confirm" button in order to transfer to page "Order".
3. Push "Save List" button to download Excel format file.

Confirm Save List DesignId 220612023828

Primer set: sorting rule [Easy]

Target DNA ATGTCTGATAATGGACCCCAAAATCAGCGAAATGCACCCCGCATTACGTTTGGTGGACCCCTCAGATTCAACCTGGCAGTAAACAGAAATGGAAGACGCAGTGGGGGCGGATCAAAACAACGTCGGCCCCAAGSTTTACCCAAATAACTT
 (Complement) taacagactat taacctgggggttttagtgcgttttaactgggggcgtaatgcaaacacacctgggagtcctaaagttagcagcgaatgggtcttaccctcttgcgtcaacccggcgctagttttgtgcaagcgggggttccaaatgggttatatgat
 CONSENSUS(*)

Primer ID(dimer)	1	11	21	31	41	51	61	71	81	91	101	111	121	131	141
<input type="checkbox"/> [7]	-2.36														
<input type="checkbox"/> [15]	-2.46														
<input type="checkbox"/> [21]	-1.57														
<input type="checkbox"/> [1]	-1.87 [1]		TGGACCCCAAAATCAGCGAAATGCACCCCGCATTACG						ttggtcttaccctcttgcgtcaac	CGCGATCAAAACAACGTCGGC					
<input type="checkbox"/> [5]	-2.46							[5]	CCAGAAATGGAAGACGCAGTGGGGGCGGATCAAAACAACGTCGGC						gac

[outputs: 5 sets] Displayed 1 - 5 . DesignId 220612023828

Figure 19 : fenêtre s'ouvrira pour afficher les détails de l'ensemble.

- Une nouvelle fenêtre s'ouvrira pour afficher les détails de l'ensemble d'amorces sélectionnées.

← → ↻ Not secure | primerexplorer.jp/lampv5e/servlet/ConfirmPage

PrimerExplorer V5 Software

1. Push "Primer Information" button to download Primer Information format file for loop primer designing.
2. Push "Save" button to download the primer information in the screen display layout.

DesignId 220612023828

Primer Information Save

1	ID:1	dimer(minimum)dG=-1.87						
label	5'pos	3'pos	len	Tm	5'dG	3'dG	GCrate	Sequence
F3	12	29	18	59.28	-5.86	-6.43	0.56	TGGACCCCAAAATCAGCG
B3	195	213	19	60.89	-5.85	-4.85	0.58	GCCTTGTCTCTCGAGGGAAT
FIP			41					CCACTGCGTTCTCCATTCTGGT-AAATGCACCCCGCATTACG
BIP			41					CGCGATCAAAACAACGTCGGC-CCTTGCCATGTTGAGTGAGA
F2	30	48	19	60.72	-4.56	-4.06	0.53	AAATGCACCCCGCATTACG
F1c	80	101	22	64.59	-5.50	-5.25	0.55	CCACTGCGTTCTCCATTCTGGT
B2	165	184	20	59.51	-5.85	-4.76	0.50	CCTTGCCATGTTGAGTGAGA
B1c	104	124	21	64.69	-6.75	-7.03	0.57	CGCGATCAAAACAACGTCGGC

Figure 20 : nouvelle fenêtre afficher détails de l'ensemble d'amorce sélectionnée.

- Cliquez sur "primer information " pour enregistrer le fichier. Ce fichier est Requis pour concevoir des amorces de boucle. Ne fermez pas Copier la fenêtre avant les amorces F3, B3, FIP et BIP ; (mettre Vert) enregistrer la séquence dans un fichier séparé (Word ou Excel) amorces. Si vous fermez la première fenêtre (Figure 10), vous ne pourrez pas récupérer.
- assurez-vous de garder le Tm de F1c/B1c à environ 3-4 degrés supérieurs à celui des amorces F2/B2 et F3/B3.
- Modifier la longueur minimale des amorces F2/B2 et F3/B3 à 15 au lieu de 18.

Conception des amorces de boucle :

Les étapes de conception des amorces de boucle sont les mêmes de conception des amorces LAMP.

Sur le logiciel de la conception des amorces : <http://primerexplorer.jp/elamp4.0.0/index.html>

- Importer le fichier qui déjà enregistré dans l'étape précédent et cliqué sur « primer Design »
- Cliquer sur "Générer" et il affichera le nombre d'amorces conçues.
- Assurez-vous que la fenêtre de résultat indique « X ensembles ont été générés » et non « X pièces ont été générées ». Si l'écran de résultat indique les ensembles d'amorces, puis les amorces de boucle avant et arrière (FL et BL) ont été générés ; s'il indique des morceaux d'amorce, alors une amorce FL ou BL a été générée. Pour une bonne réaction LAMP, FL et BL sont nécessaires.
- Cliquer sur « Afficher » pour afficher la liste des amorces dans une nouvelle fenêtre. Cette page répertorie un maximum de 100 ensembles d'amorces.

Protocole d'extraction d'ARN virale :

L'extraction est réalisée par la technique des billes magnétique qui se déroule en 4 étapes

Après un prélèvement nasopharynée.

- Etape 01 : Lyse cellulaire et liaison des acides nucléiques avec les billes magnétiques, ajouter 200 μ L des billes magnétiques. + incubation 10 minutes à température ambiante
- Récupération des billes à l'aide d'un aimant magnétique
- Etape 02 : ajouter 300 μ L de la solution de lavage WASH 1 + incubation 2 min à TA
- Récupération des billes à l'aide d'un aimant magnétique
- Etape 03 : 325 μ L de la solution de lavage WASH 2. + incubation 2 min à TA
- Récupération des billes à l'aide d'un aimant magnétique
- Etape 04 : 50 μ L de la solution d'élution + incubation 5min à 60°C
- Libération des acides nucléiques à l'aide d'un aimant magnétique



Figure 21 : récupération de l'ARN par la méthode des billes magnétique.

DILUTION DES AMORCES :

préparation 1:

tableau 5 dilution des amorces spécifique qui cible la différente région de SARS-COV.(WarmStart® LAMP Kit (DNA & RNA), BioLabs

LAMP PRIMERS	10X CONCENTRATION	1X CONCENTRATION
FIP	16 µM	1.6 µM
BIP	16 µM	1.6 µM
F3	2 µM	0.2 µM
B3	2 µM	0.2 µM
Loop F	4 µM	0.4 µM
Loop B	4 µM	0.4 µM

Préparer 50 µL de mix des amorces.

Tableau 6 : les volumes prélevés pour préparer la dilution pour le mélange des amorces.

Amorce	Volume (µl)	L'eau ultra pure
FIP	8	+ 28 Eau ultra – pure
BIP	8	
F3	1	
B3	1	
LF	2	
LB	2	

Préparation 2 :

Tableau 7 : les volumes prélevé pour la 2 ème préparation.

Amorce	Volume	L'eau ultra pure
FIP	8	+ 18 Eau ultra – pure
BIP	8	
F3	4	
B3	4	
LF	8	
LB	8	

PROTOCOLES EXPERIMENTAUX LAMP-PCR: (PREMIERE DETECTION)

COMPONENT	DNA TARGET DETECTION	RNA TARGET DETECTION	NO TEMPLATE CONTROL (NTC)
WarmStart LAMP 2X Master Mix	12.5 µl	12.5 µl	12.5 µl
Fluorescent dye (50X)	0.5 µl	0.5 µl	0.5 µl
LAMP Primer Mix (10X)	2.5 µl	2.5 µl	2.5 µl
Target DNA	1 µl	–	–
Target RNA	–	1 µl	–
dH ₂ O	8.5 µl	8.5 µl	9.5 µl
Total Volume	25 µl	25 µl	25 µl

Figure 22 : le volume réactionnel .

Tableau 8 : Protocole de la LAMP selon fabricant.

<i>Réactif</i>	<i>Volume</i>
<i>Primer mix</i>	<i>2.5 µL</i>
<i>Warm Start®</i>	<i>12.5 µL</i>
<i>Eau ultra pure</i>	<i>Jusqu'à 25 µL</i>
<i>ADN/ARN</i>	<i>1-4 µL</i>

Vortexer et centrifuger brièvement les tubes de l'enzyme et de mix et conservé dans la glace pendant l'utilisation.

Contrôle positif :

Dans un tube eppendorf de 0.5 ml ajouter 7 µl de l'eau ultra pure, 2.5 de mélange des amorces, avec une micropipette P100 additionner 12.5 µl d'enzyme, enfin ajouter 3 µl d'échantillon (ADN , ARN) .

Contrôle négatif :

Ajouter 10 µl d'eau ultra pure, 2.5 de mix, 12.5 enzyme.

Incubation dans le thermocycleur eppendorf à 65 ° pendant 45 min.

PROTOCOLES EXPERIMENTAUX DE NOS ESSAIS DE PCR : (DEUXIEME DETECTION)

Essais 1 :

Vortexer et centrifuger les tube brièvement.

Contrôle positif :

Ajouter 7 de l'eau ultra pure dans un tube eppendorf de 1.5 ml, 1 μ l de Lamp fluorescent Dye , 2.5 mix des amorces , 12.5 enzyme , 2 μ l d'échantillon (ADN/ ARN) .

Contrôle négatif :

Ajouter 9 μ l de l'eau ultra-pure , 1 μ l Lamp fluorescent Dye , 2.5 mix des amorce 12.5 enzyme .

Essais 2 :

Contrôle positif :

Ajouter 7 de l'eau ultra pure dans un tube eppendorf de 1.5 ml, 1 μ l siber green , 2.5 mix des amorces , 12.5 enzyme , 2 μ l d'échantillon (ARN extrait) .

Contrôle négatif :

Ajouter 9 μ l de l'eau ultra pure, 1 μ l Lamp siber green , 2.5 mix des amorce 12.5 enzyme .

Régler le programme de Thermocycleur qTOWER (ANNEX) sur 65°.

Tester les amorces nécessaire et optionnelle :

Protocole :

Préparer six mix des amorces de 25 µl, dans chaque tube de dilution enlève une amorce :

Tableau 9 : préparation de la dilution de 5 amorces.

Tube	Amorce enlève	Le mix
1	LF	16 µl eau ultra pure + 4 µl LB + 4 µl FIP + 4 µl BIP + 2 µl B3 + 2µl F3.
2	LB	16 µl eau pure +4 µl LF +4 µl FIP + 4 µl BIP + 2µl B3 +2µl F3
3	FIP	16 µl eau ultra pure + 4µl LF +4µl BIP +4µl LB +2µl B3+ 2µl F3.
4	BIP	16 µl eau ultra pure +4µl LF +4µl LB + 4µl FIP+ 2µl F3 + 2µl B3.
5	B3	16 µl eau ultra pure +4µl LF +4µl LB + 4µl FIP+4 µl BIP + 2µl F3.
6	F3	16 µl eau ultra pure +4µl LF +4µl LB + 4µl FIP+4 µl BIP + 2µl B3.

Electrophorèse sur gel d'agarose :

Préparer le gel en mélangeant 1,2 g d'agarose avec 100ml de TAE 1X et chauffer le mélange jusqu'à ébullition. Ajouter 7 µl de bromure d'éthidium dans l'agarose fondu. Enfin, déposer le gel avec son plateau dans la cuve d'électrophorèse contenant le tampon TAE 1X.

Ajouté 3µL de bleu de charge dans chaque produit PCR.

Déposer 10 µl de marqueur de poids moléculaire 100pb DNA Ladder dans un puits, puis les produits PCR dans les puits suivant .

Visualiser les fragments d'ADN amplifiés sous lumière ultraviolette (d'un dispositif d'éclairage par transillumination) et vérifier par rapport au marqueur de poids moléculaire que la taille du produit de PCR en pb est bien celle attendue.

Résultats et discussion

Résultats :

CONCEPTION DES AMORCES :

Les résultats obtenus en utilisant le logiciel gratuit en ligne Primer Explorer 5 sont montrés dans les tableaux suivants :

Nous avons commandé les amorces, que nous avons utilisées dans notre étude.

Tableau 10 : Les amorces régulières F3, B3, FIP et BIP conçues par le logiciel Primer Explorer 5.

1	ID=1	dimer (minimum)dG=-1.87						
Lab el	5'pos	3'pos	long	Tm	5'dG	3'dG	GC %	Séquence :
F3	12	29	18	59.28	-5.86	-6.43	0.56	TGGACCCCAAAATCAGCG
B3	195	213	19	60.89	-5.85	-4.85	0.58	GCCTTGTCTCGAGGGAAT
FIP			41					CCACTGCGTTCTCCATTCTGGT- AAATGCACCCCGCATTACG
BIP			41					CGCGATCAAACAACGTCGGC- CCTTGCCATGTTGAGTGAGA
F2	30	48	19	60.72	-4.56	-4.06	0.53	AAATGCACCCCGCATTACG
F1c	80	101	22	64.59	-5.50	-5.25	0.55	CCACTGCGTTCTCCATTCTGGT
B2	165	184	20	59.51	-5.85	-4.76	0.50	CCTTGCCATGTTGAGTGAGA
B1c	104	48	18	59.28	-5.86	-6.43	0.56	TGGACCCCAAAATCAGCG

Les amorces de boucles LF /LB :

Tableau 11 : les amorces de boucle conçue par de logiciel Primer Explorer 5.

1	ID=1		dimer (minimum)dG=-1.87					
Labe l	5'pos	3'pos	long	Tm	5'dG	3'dG	GC %	Séquence :
LF	300	324	20	64.68	-4.74	-4,57	0.4	CCATCTTGGACTGAGATCTTTCATT
LB	403	424	22	65.6	-4.74	-4.78	0.5	ACTGAGGGAGCCTTGAATACAC

RESULTAT DE LAMP PCR : (PREMIERE DETECTION)

Par la préparation 1 :

Nous avons préparé 3 tubes

- Tube 01 : avec échantillon d'ADN.
- Tube 02 : avec l'ARN extrait.
- Tube 03 : control négatif.



Figure 23 : les tubes avant l'incubation.

Après une incubation de 45 min nous avons remarque que la couleur blanche n'est pas claire , en a prolongé la durée d'incubation jusqa 1 h .

Tube 01 : ADN .

Tube 02 : ARN .

Tube 03 : contrôle négatif.

Afin d'amélioré l'amplification et la turbidité dans les tube nous avons réalisé un deuxième essai avec une deuxième préparation d'amorces.

Préparation 2 :

En a préparer quatre tubes :

- Tube 01 : avec l'échantillon d'ADN .
- Tube 02 : avec l'échantillon d'ARN extrait.
- Tube 03 : avec échantillon ARN.
- Tube 04 : contrôle négatif.

Les résultats obtenus par la deuxième préparation montrent la différence entre le contrôle négatif et positif

Profile d'électrophorèse :

Pour vérifier les résultats des deux préparations nous avons procédé à une observation sur gel d'agarose, par comparaison avec DNA Ladder.

En a remarque que les tubes qui ont une couleur blanche dans les tubes eppendorf (turbidité), ont une migration sur le gel d'agarose indique que en a une amplification.

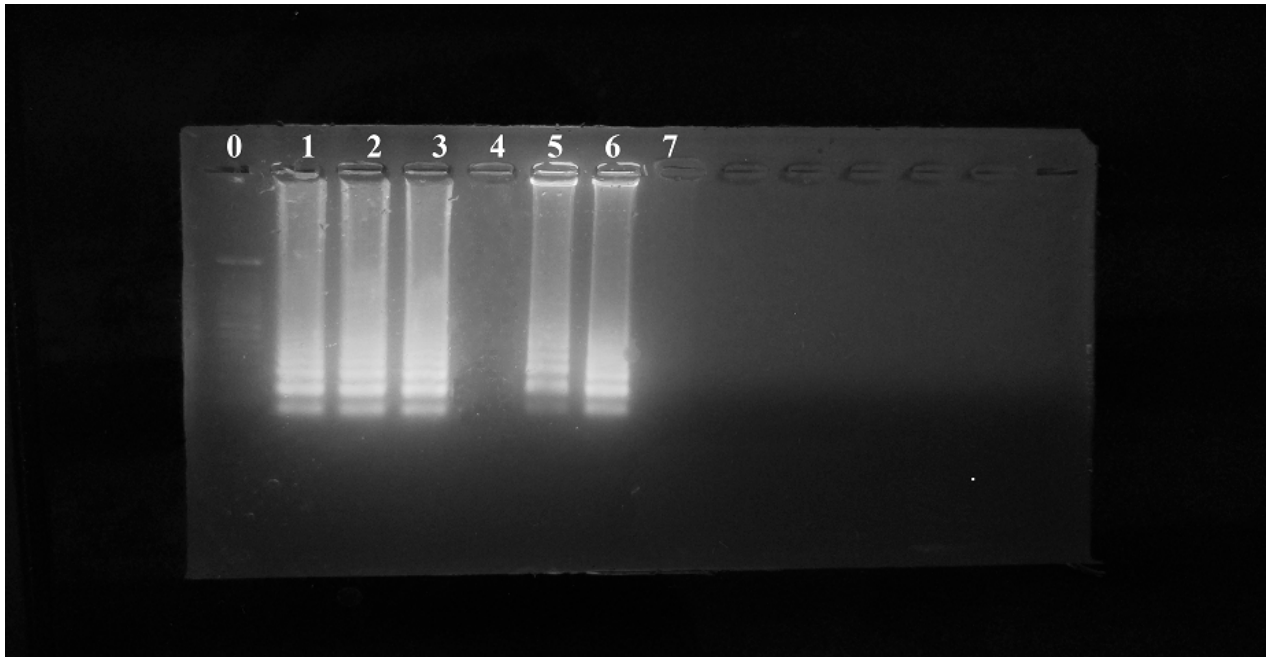


Figure 24 : le profile d'électrophorèse

- Puits 0 : marqueur de taille de 100 pb .

Préparation 2 :

- Puits 1 : ADN .
- Puits 2 : ARN extrait .
- Puits 3 : ARN .
- Puits 4 : Contrôle négatif .

Préparation 1 :

- Puits 5 : ADN .
- Puits 6 : ARN .
- Puits 7 : contrôle négatif

La migration sur le gel montre que la couleur blanche (la turbidité) est liée le produit d'une réelle amplification

RESULTATS DE PCR : (DEUXIEME DETECTION)

Essais 01 :

Après 15 min de lancer le programme de thermocycleur , nous pouvons lire les résultats et stabilisé jusqu'à 30 min

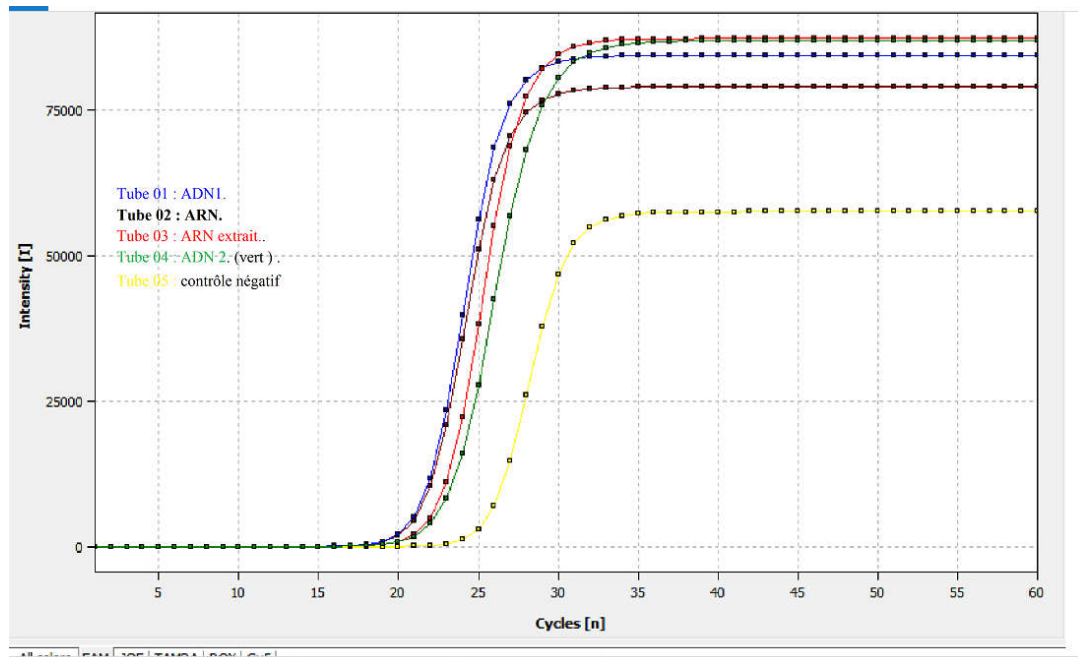


Figure 25 : résultat de premier essai de PCR .

Les résultats obtenus après 30 min montrent des courbes d'amplification exponentielles.

Profile d'électrophorèse :

Pour vérifier les résultats obtenue, nous avons réalisé une électrophorèse sur gel d'agarose .

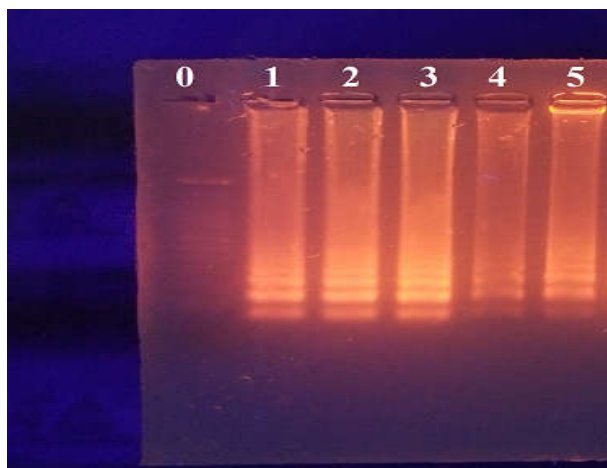


Figure 26 : résultat d'électrophorèse de premier essai de PCR .

- Puits 0 : marqueur de taille .
- Puits 1 : ADN .

- Puits 2 : ARN extrait .
- Puits 3 : ARN .
- Puits 4 : ADN échantillon 2.
- Puits 5 : contrôle négatif.

L'amplification observée dans le tube du contrôle négatif, indique la présence d'une contamination de l'un de nos réactifs par du matériel génétique. Nous allons donc renouvelé nos préparations en remplaçant les différent constituants de notre PCR par un : commençant par l'enzyme, sinon l'eau ultra-pure ou nos préparations d'amorces, et refait une expérience avec un control positif et un control négatif.

Essais 02 :

Nous avons préparé 2 tubes :

- Tube 01 : contrôle positif.
- Tube : contrôle négatif.

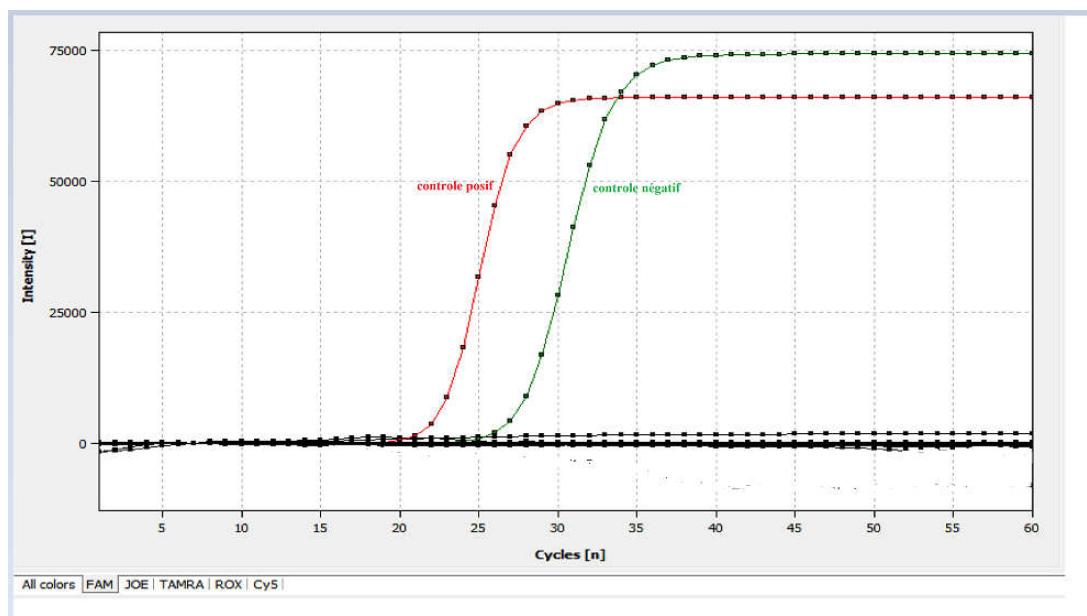


Figure 27 : résultat de deuxième essai de PCR .

Cette expérience montre que la contamination persiste et semble provenir de l'une de nos préparations d'amorces.

Nous avons donc réalisé une série d'amplifications avec à chaque fois une amorces en moins pour essayer de comprendre l'origine de la contamination.

Test des amorces :

Les résultats testés par une migration sur un gel électrophorèse.

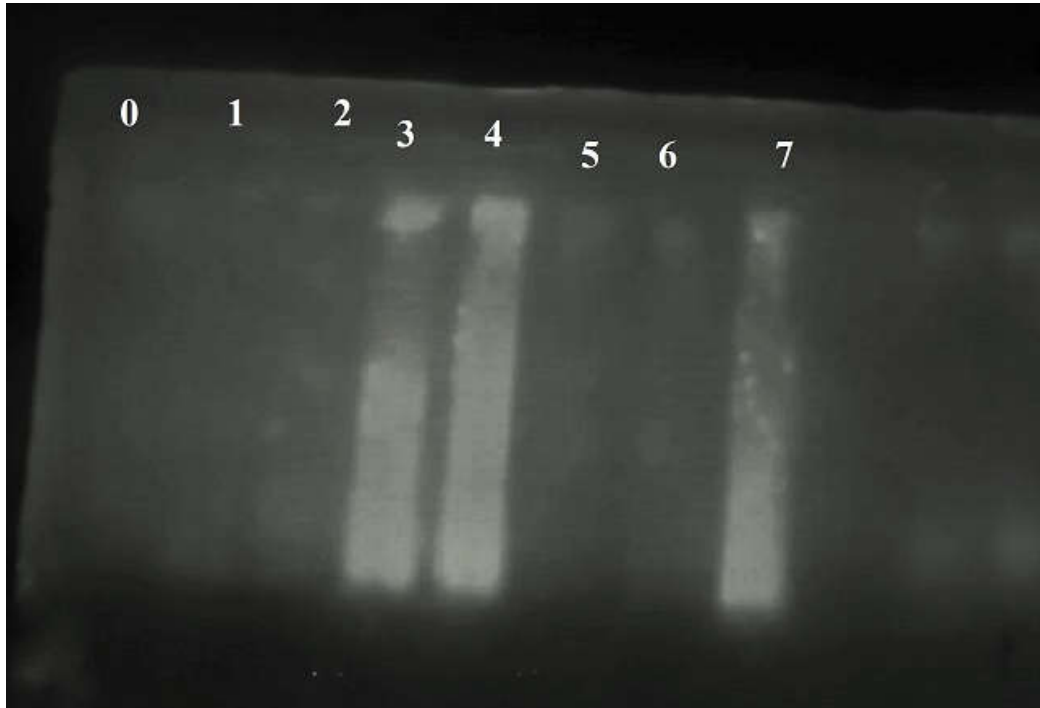


Figure 28 : le profile d'électrophorèse de test des amorces.

Puits 0 : marqueur de taille.

Puits 1 : sans l'amorce LF / le résultat négatif

Puits 2 : sans LB / le résultat négatif

Puits 3 : sans B3 / le résultat positif

Puits 4 : sans F3 / le résultat positif

Puits 5 : sans FIP / le résultat négatif

Puits 6 : sans BIP / le résultat négatif

Puits 7 : contrôle positif.

L'origine de la contamination quant lui n'a pas été localisée par cette expérience. Une autre expérience avec une mesure de fluorescence a été lancée dont les résultats, par manque de temps, ne sont pas montrés dans ce manuscrit.

Discussion :

Cette étude s'est déroulée au niveau du laboratoire de biologie moléculaire de l'Ecole National Supérieur de Biotechnologie (ENSB), son but est la validation d'une technique d'amplification isotherme pour le dépistage de SARS-COV2 ou la détection direct de SARS-COV 2 à partir d'échantillons cliniques (prélèvement naso-pharyngé) en seulement 30 minutes. Le seul équipement nécessaire est un bloc thermique chauffant. La méthode consiste en une transcription inverse (reverse transcription) suivie d'une amplification à température fixe.

Le choix des amorces est conditionné par la nature de génome de SARS-COV2 qui est susceptible facilement aux mutations, et la condition principale c'est que amorces ciblent les régions conservé pour garantir une détection de la majorité des variants. Après analyse du génome du COVID-19 avec ces variants (ANNEXE), nous avons choisis le gène N comme cible d'amplification pour sa grande conservation. Les résultats des amplifications montrent que les amorces conçues reconnaissent bien leur cible.

Le kits WarmStart LAMP est Bst 2.0 il contient une ADN polymérase et une transcriptase inverse nécessaires pour la rétrotranscription et l'amplification de l'ARN viral.

Ce kits est compatible avec plusieurs méthodes de détection ; mesure de la fluorescence avec « Lamp fluorescent Dye », détection visuelle (la turbidité) ou détection colométrique. Les conditions optimales sont : une température à 65°C avec une durée d'incubation de 30-45 min, Nous avons exploré plusieurs méthodes de détection dans notre étude.

La première approche de détection est la turbidité. Nous avons a réalisé deux préparation d'amorces de concentrations différentes. La première étant la moins concentrée. Après incubation de 45 min en a remarqué que la turbidité n'est pas très claire et la différence n'est pas visible entre le contrôle négatif et positif (fig.24) . Nous avons donc prolongé la durée d'incubation jusqu'à 60 min. Le résultat à l'œil nu reste toujours confus. Par contre sur le gel, on voit bien le smear caractéristique d'une amplification LAMP, montrant clairement qu'une amplification spécifique a eu lieu avec un vrai contrôle négatif.

Afin d'améliorer la qualité de la turbidité et l'intensité de l'aspect blanchâtre des mixes réactionnels, nous avons augmenté la concentration des amorces. La figure 26 représentent les résultats obtenue après une incubation de 45 min , les tube 1 ,2 et 3 contenant échantillon d'ADN et échantillon d'ARN qu'on a pu observé à l'œil nu une couleur blanche (turbidité) , la

vérification ont été faites par observation sur gel d'agarose et coloration au bromure d'éthidium (BET), par comparaison à la fluorescence d'un autre ADN de concentration connue, et on a observé l'apparition des fragments de différent taille donc en a un amplification. (fig.27) Aucune bande a été apparu dans le puits 4 et 7 de tube négatif qui reste transparent.

Dans la troisième détection par la q PCR les essais nos donne des courbes d'amplification (fig.30) ce qui indique la spécificité de la réaction pour le COVID 19. Les résultats ont été vérifiés par une électrophorèse sur gel d'agarose 1.2% .

Nous remarqueront que le contrôle négatif n'est pas vraiment négatif indiquant une contamination de l'un des réactifs utilisés pour l'expérience.

Afin de localiser l'origine de la contamination, nous avons refait différentes expériences avec de nouvelles préparations de réactifs (amorces, enzyme, eau). Malheureusement, les résultats ne changent pas et la contamination persiste. (fig.31) Nous pensons que la contamination touche les tubes initiaux des amorces.

Dans une dernière expérience, nous avons essayé de déterminer les amorces nécessaires vs optionnelles pour notre réaction d'amplification. Les résultats obtenue montrent que les amorces nécessaires sont : FIP BIP LF LB alors que B3 et F3 restent non indispensables pour une amplification LAMP ce qui concorde avec la littérature.

Conclusion et perspective :

L'émergence rapide du COVID-19 et ses conséquences sur la santé publique implique le développement de nouvelles techniques de diagnostic qui doivent être moins coûteuses, rapides et faciles.

La RT-PCR conventionnelle, bien que spécifique et sensible, doit être effectuée par du personnel formé sur un équipement lourd spécialisé dans un laboratoire qualifié. Étant donné que cette maladie se propage rapidement, les laboratoires centralisés peuvent avoir du mal à répondre aux demandes de tests ou peuvent avoir besoin d'une approche alternative si les kits RT-PCR ne sont pas disponibles.

Cette étude est pour tester et valider que la LAMP PCR permet la détection rapide de SARS-COV 2, avec un processus facile, nécessitant uniquement un corps chauffant à température isotherme (bain marie , bain sec , thermocycleur)

Notre étude, nous avons exploité des échantillons provenant de prélèvements nasopharyngé, mais la LAMP PCR permet la détection rapide de COVID-19 dans une variété d'échantillons humains : sérum, urine, salive, et même la matière fécale.

Il est nécessaire de noter que la technologie LAMP n'est pas exclusive pour la détection du SARS-COV2 seulement, c'est une technologie qui peut détecter chaque entité ayant un matériel génétique ADN ou ARN . Il suffirait juste d'adapter la conception des amorces pour détecter d'autres cibles, grâce à sa grande sélectivité et spécificité ainsi que ça manipulation facile et peu coûteuse

Compte tenu de sa facilité d'exécution et de son cout faible comparé à la qPCR classique, la LAMP PCR pourrait servir dans des processus de dépistage massif et de surveillance microbiologique de grandes échelles. Permettant ainsi un meilleur contrôle des épidémies et des maladies nosocomiales.

Référence bibliographique :

1. <https://www.who.int/fr/health-topics/coronavirus> (consulté le 16/01/2022).
2. <https://www.who.int/fr/director-general/speeches/detail/11-february-2020> (consulté 16/01/2022).
3. **J. Iqbal, and T. O’leary , et al .** Sensitivity of id now and rt–pcr for detection of sarscov-2 in an ambulatory population. *Elife*. 2021, Vol. vol. 10, pp. pp. 1–33.
4. **Farfour, E.** The ID NOW COVID-1. *a high-speed high-performance assay*. 2021.
5. *traité de virologie midicale* . 2004, chapitre 38:coronavirus , p 1-16 .
6. **Almeida JD, Tyrrell DA.** The morphology of three previously uncharacterized human respiratory viruses. *Pathologie Biologie*. 2009, p. P 150.
7. **Tyrrell DAJ, Bynoe ML.** Cultivation of Novel Type of Common-cold Virus in Organ. 1965, pp. (June):1467–70.
8. **L. P. Colvero, B. Villarreal, C. Torres, and P. E. Brandão.** Assessing the economic burden of avian infectious bronchitis on poultry farms in Brazil. *OIE Rev Sci. Tech*. 2015, Vol. vol. 34, pp. pp. 993–999.
9. **Hamre D, Procknow JJ.** A New Virus Isolated from the Human Respiratory Tract. 1966, pp. (30734):190–3.
10. **Bonnin, A.** *Caractérisation de la protéine S du coronavirus humain 229E*. 2018.
11. **Zhong NS, Zheng BJ, Li YM, Poon LLM, Xie ZH, Chan KH, et al.** Epidemiology and *People ’ s Republic of*. in February 2003, 362, pp. 1353–8.
12. AFPA Association Française de Pédiatrie Ambulatoire. *Historique des coronavirus*. [En ligne] [https://afpa.org/coronavirus/..](https://afpa.org/coronavirus/)
13. **V. Bonny, A. Maillard, C. Mousseaux, L. Plaçais, and Q. Richier,.** “COVID-19:Pathogenesis of a multi-faceted disease,”. *Rev. Med. Interne*. 2020, Vol. 41, pp. 375–389.
14. International Committee of Viruses (ICTV). *Actualités pharmaceutiques*. octobre 2020, 599.
15. **A. Vabret, J. Dina, E. Brison, J. Brouard, and F. Freymuth.** Coronavirus humains. *Pathol. Biol*. 2009, Vol. vol. 57, 2, pp. 149-160.
16. *Traité de virologie médicale*. 2019.
17. **C. Lefeuvre, É. Przyrowski, and V. Apaire-Marchais.** Virological aspects and diagnosis. *Actual. Pharm*. 2020, Vol. 59, 599, pp. 18–23.

18. **A. Vabret, J. Dina, E. Brison, J. Brouard, and F. Freymuth.** Coronavirus humains(HCoV). *Pathol. Biol.* 2007, Vol. vol. 57, 2, pp. 149–160.
19. **Mason, R. J.** Pathogenesis of COVID-19 from a cell biology perspective. *Eur. Respir.* 2020, Vol. 55, 04, pp. 9–11.
20. **Sarma et al.** 9, 2021, JOURNAL OF BIOMOLECULAR STRUCTURE AND DYNAMICS, Vol. 39, pp. 3409–3418. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1758788>.
21. **kovski, P. et al.** Coronavirus biology and replication: implications for. *MICROBIOLOGY AUSTRALIA.* 2021, Vol. 12, pp. 10-12.
22. **Bonny, V., Maillard, A., Mousseaux, C., Plaçais, L., & Richier, Q.** COVID-19: Pathogenesis of a multi-faceted disease. *La Revue de Médecine.* 2020. doi:10.1016/j.revmed.2020.05.003.
23. *Aspects virologiques et diagnostic du coronavirus Sars-CoV-2.*, no. January, p. 2020.
24. traité de virologie médicale. *coronavirus.* 2004, p. chapitr 38.
25. **Fehr AR, Perlman S. et al.** Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. Methods Mol Biol ;characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Clinical Microbiology Reviews.* octobre 2020, Vol. 33.
26. **D. Kim, J. Y. Lee, J. S. Yang, J. W. Kim, V. N. Kim, & H. Chang.** “The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome,”. *Cell.* 10, 2020, Vol. vol. 18, 4, pp. pp. 914-92.
27. . **Beniac DR, Andonov A, Grudeski E, Booth TF.** Architecture of the SARS coronavirus prefusion spike. *Clinical Microbiology Reviews.* octobre 2020, Vol. 33.
28. **J. Shang et al .,** Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2,. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A.* 2020, Vol. 117, 21.
29. **Tratner, I.** “SRAS : 1 . Le virus,”. 2003.
30. **Wu A, Peng Y, Huang B, Ding X et al.** Genome composition and divergence of the novel coronavirus (2019- nCoV) originating in China). *Clinical Microbiology Reviews.* e00028-20, octobre 2020, Vol. 33, pp. 1 -48.
31. **Nieto-Torres JL, DeDiego ML ,et al.** Severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein ion channel activity promotes. *Clinical Microbiology Reviews.* octobre 2020, Vol. 33.
32. **Ysrafil, I. Astutiand .** Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2):An overview of viral structure and host response,. *Diabetes Metab. Syndr. Clin. Res.Rev.* 2020, Vol. 14, pp. 407–412.
33. **S Jean-Daniel Lelièvre, Agnès Gautheret-Dejean, Karine Petitprez .** Aspects immunologiques et virologiques de l’infection par le SARS-CoV-2. 2020.

34. **Rice, G.I., Thomas, D.A., Grant, P.J., Turner, A.J., Hooper, N.M.** Evaluation of angiotensin-converting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin. *Biochem. J.* 2004, pp. 45-51.
35. **Bonny V, Maillard A, Mousseaux C, Plaçais L.** COVID-19 : physiopathologie d'une maladie à plusieurs visages. *Rev Médecine Interne.* juin 2020, Vol. 41(6), pp. 375-89.
36. **Ysrafil, I. Astutiand .** Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *An overview of viral structure and host response,* " *Diabetes Metab. Syndr. Clin. Res.Rev.* 2020, Vol. 14, 4, pp. 407–412.
37. 2021, JOURNAL OF BIOMOLECULAR STRUCTURE AND DYNAMICS.
38. **Van Hemert, M. J., Van Den Worm et al.** 2021. *SARS-coronavirus replication/transcription complexes are membrane-protected and need a host factor for activity in vitro.*, JOURNAL OF BIOMOLECULAR STRUCTURE AND DYNAMICS, pp. 1-9.
39. **M Hoffmann, H Kleine-Weber , S Schroeder , et al.** SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *cell* 181. 8, 2020, pp. 271–280.
40. **S. Nimesh, S. Bharat, M. Abhay, N. Neeti, and P. Archna.** Corona Virus: An Immunological Perspective Review. *Int. J. Immunol. Immunother.* may 2020, Vol. 7.
41. **N. Murgolo et al.** SARS-CoV-2 tropism, entry, replication, and propagation: Considerations for drug discovery and development. *PLoS Pathog.* 2021, Vol. 17, pp. 1-17.
42. **Simmons, G., Gosalia, D. N., Rennekamp et al.** *Inhibitors of cathepsin L prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus entry(2005).* 9, 2021, JOURNAL OF BIOMOLECULAR STRUCTURE AND DYNAMICS, Vol. 39, pp. 1-11.
43. **Ysrafil, I. Astutiand.** Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): An overview of viral structure and host response. *Diabetes Metab. Syndr. Clin. Res.Rev.* 2020, Vol. 14, 4, pp. 407–412.
44. **N. Murgolo, N et al.** SARS-CoV-2 tropism, entry, replication, and propagation: Considerations for drug discovery and development. *PLoS Pathog.* 2021, Vol. 17, 2, pp. 1-18.
45. **S. T. Jean-Daniel Lelièvre, Agnès Gautheret-Dejean et al .** *Aspects immunologiques et virologiques de l'infection par le SARS-CoV-2.* 2020.
46. **V. Bonny, A. Maillard, C. Mousseaux, et al.** COVID-19: Pathogenesis of a multi-faceted disease. *Rev. Med. Interne.* 2020, Vol. 41, pp. 375–389.
47. **Ysrafil, I. Astutiand.** Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): An overview of viral structure and host response., *Diabetes Metab. Syndr. Clin. Res .Rev.* 2020, Vol. 14, pp. 407–412.

48. **J. Shang et al.**, Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A.* 2020, Vol. 117, pp. 1-8.
49. **Sethuraman N, Jeremiah SS.** Interpreting diagnostic tests for SARS-COV 2. *Elsevier Masson SAS :Covid-19, faire face à une crise sanitaire inédite.* octobre 2020, 599.
50. *Aspects Virologiques Et Diagnostiques.*,. january 2020, no.
51. **Vashist, S.K.** In Vitro Diagnostic Assays for COVID-19. *COVID-19 Serological Tests: How Well Do They ;Diagnostics.* 2020, pp. 2-14.
52. *Aspects Virologiques Et Diagnostiques.*,. janury 2020, no.
53. **N. Vabret et al.**, Immunology of COVID-19: Current State of the Science. *Immunity.* 2020, Vol. 52, 6, pp. 910–941.
54. **S. M. Lamia Thabet, Selma Mhalla, Neila Hannachi, Hla Karray Hakim, Abdelhalim.** Stratégie du Diagnostic virologique du SARS-CoV-2. 2020, pp. 1–7.
55. **[Internet]**. Advice on the use of point-of-care. . *Disponible sur:https://www.who.int/newsroom/commentaries/detail/advice-on-the-use-ofpoint-of-care-immunodiagnostic-tests-for-covid-19.* [En ligne]
56. **Xiao AT, Gao C, Zhang S.** *Profile of specific antibodies to SARS-CoV-2.* s.l. : the first report. *J Infect*, 2020. Published online March 21, 2020. 2020;S0163-4453(20)30138-9.
57. **Guo, L. Zhang .** Biomarkers of COVID-19 and technologies to combat SARS-COV 2. *Adv. Biomark. Sci. Technol.* 2020, Vol. 2, pp. 1-23.
58. **Vabret N. et al .**, Immunology of COVID-19: Current State of the Science. *Immunity.* 2020, Vol. 56, 6, pp. 910–941.
59. **Jawerth, Nicole.***Les maladies infectieuses.* 2020, Bulletin de l’AIEA.
60. **Higuchi et al.** *Reviews in Biology and Biotechnology By The Moroccan Society of Biology in Canada.* décembre 2002, Vol. 2, 2, pp. 2-11.
61. **Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S. and Griffith, R.** Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Rev. Biol. Biotech.* décembre 2002, Vol. 2, pp. 2-11.
62. “Nucleic Acid.” . [En ligne]. [En ligne] <http://www.genrui-bio.com/productsdetail.php?ProId=62>. .
63. [En ligne]. *Amplification génique par PCR en temps réel.* [En ligne] [Disponible: 11-Jun-2021]. <https://microbiologiemedicale.fr/biologie-moleculaire-amplification-genique-pcr-temps-reel/>.
64. **Pcr, R.** Real-time PCR : Understanding C t. *no. C.* 2000.
65. **Mustapha, C. H.** *Diagnostic virologique de COVID-19.* 2020, pp. pp. 1–3.

66. **Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al.** Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Developing RT-LAMP assays for rapid diagnosis of SARS-CoV-2 in saliva*. January 2022.
67. **Shen, M., Y. Zhou et al.** Recent advances and perspectives of nucleic acid detection for coronavirus. *J Pharm Anal.* 2020, Vol. 10, 02, pp. 97-101.
68. **Notomi, T., H. Okayama, et al.** Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic acids research.* 63, 2000, Vol. 28, 12.
69. **Panno S. et al.,** Loop mediated isothermal amplification: Principles and applications in plant virology. *Plants.* 2020, Vol. 9, 4, pp. . 1–28.
70. **T. Nguyen, C. McCarthy, D. Lantigua, and G. Camci-Unal.** Development of Diagnostic Tests for Detection of SARS-CoV-2. *Diagnostics.* 2020, Vol. 10, 11, p. 905.
71. **Binnicker, M. J.** Emergence of a Novel Coronavirus Disease (COVID-19) and the Importance of Diagnostic Testing: Why Partnership between Clinical Laboratories, Public Health Agencies, and Industry Is Essential to Control the Outbreak. *Clinical Chemistry.* 2020, Vol. 66(5), pp. 664-666.
72. **Panno S. et al.,** “Loop mediated isothermal amplification: Principles and applications in plant virology,”. *Plants.* 2020, Vol. 9, pp. pp. 1–28.
73. **Notomi, T., H. Okayama, et al.** Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000, Vol. 28(12).
74. **Baer, C.F.** Does mutation rate depend on itself. 2, 2008, PLoS Biol, Vol. 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060052>..
75. **Sanjuan, R., Nebot, M.R., Chirico, N., Mansky, L.M.** virale mutation rate . *J. Virol.* 2010.
76. **Adami C, Pooley J, Glomb J, Stecker E, Fazal F, Fleming JO, et al.** Evolution of mouse hepatitis virus (MHV) during chronic infection: quasispecies nature of the persisting MHV RNA. *Pathologie Biologie.* 2009, Vol. 57, pp. 1-13.
77. **J. Gribble, et al.** The Coronavirus Proofreading Exoribonuclease Mediates Extensive Viral Recombination. *Preprint at bioRxiv.* 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.04.23.057786>.
78. **Herrewegh AA, Smeenk I, Horzinek MC ,et al .** coronavirus type II strains 79-1683 and 79-1146 originate from a double recombination between feline coronavirus type I and canine coronavirus. *Pathologie Biologie.* 2009, Vol. 57.
79. **Drake, J.W** Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. 1993, Proc. Natl. Acad.Sci. U. S. A., pp. 4171–4175.
80. **OMS.** 2020.
81. **l'OMS.** 2021, Organisation mondiale de santé.
82. **Burki, T.** Understanding variants of SARS-CoV-2. *MICROBIOLOGY AUSTRALIA.* avril 2021, Vol. 42, pp. 10-18.

83. Variant Covid : en france , Omicron, Delta, Mu, liste. *varaint covid* . [En ligne] [http//https://sante.journaldesfemmes.fr/fiches-maladies/2685453-variant-covid-nouveau-afrique-france-delta-mu-liste-danger-contagion/](http://https://sante.journaldesfemmes.fr/fiches-maladies/2685453-variant-covid-nouveau-afrique-france-delta-mu-liste-danger-contagion/).
84. **El-Tholoth, M., Bau, H.H. et Song, J.** Molecular Test for the 2019 Novel Coronavirus (COVID-19) at home. *A Simple, Affordable, Rapid, Stabilized, Colorimetric, Versatile RT-LAMP Assay to Detect SARS-CoV-2*. 2021, p. 1_18. <https://www.mdpi.com/journal/diagnostics>.
85. **GSAID**.
86. **GSAID**. *Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2 R e v i e w s*. 2021, Vol. 19, pp. 155-170.
87. **Wei X, Li X, Cui J.** Evolutionary perspectives on novel coronaviruses identified in pneumonia cases in China. *Clinical Microbiology Reviews*. octobre 2020, pp. 239–242.
88. **R. B. N. Lepelletier.D, Grandbastien B, Michael J. Smart,.** has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin. *Since January 2020 Elsevier*. January 2020, pp. pp. 19–21.
89. **W. Feng et al.**, Molecular Diagnosis of COVID-19: Challenges and Research Needs. *Anal. Chem.* 2020, Vol. vol. 92, 15, pp. 10196–10209.
90. **Arndt AL, Larson BJ, Hogue BG.** A conserved domain in the coronavirus membrane protein tail is important for virus assembly. *Clinical Microbiology Reviews*. octobre 2020, Vol. 33.
91. **Collomb, J.** Approche moléculaire et physico-chimique de la détection du coronavirus entérique bovin dans l ’ environnement To cite this version : HAL.
92. **A. Rousseau, J. R. Fenolland, and M. Labetoulle.** SARS-CoV-2, COVID-19 and the eye An update on published data. *J. Fr. Ophtalmol.* 2020, Vol. 43, 07, pp. 642–652.
93. **Ysrafil, I. Astutiand.** Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): An overview of viral structure and host response. *Diabetes Metab. Syndr. Clin. Res. Rev.* 12, 2020, Vol. 14, pp. 407–412.
94. —. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2):An overview of viral structure and host response,. *Diabetes Metab. Syndr. Clin. Res.Rev.* 2020, Vol. 14, pp. 407–412.
95. **Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ.** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting. *Microbiology Resource Announcement*. 2022, Vol. 9. Downloaded from <https://journals.asm.org/journal/mra> on 15 June 2022 by 129.45.103.224..

Annexes

Protocole d'alignement :

- Accéder a la base de donnée Gen Bank nucléotide :MN908947.3 .
- Copier le génome sous forme FASTA dans un fichier Bloc Note .
- Accéder à la base de donnée GSAID .
- Cliquez sur variant.
- Enregistré le génome sous FASTA .

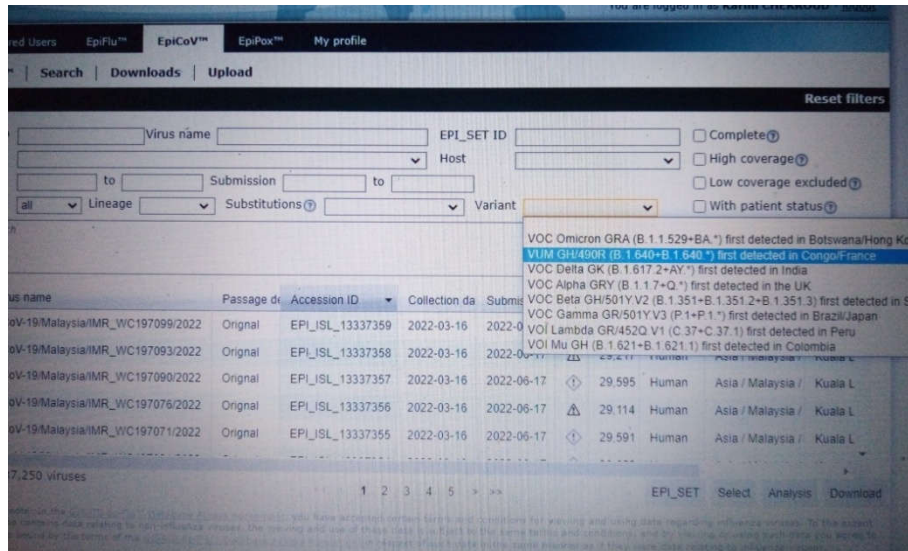


Figure 29 : la base de données GSAID

- Accéder gratuitement a la plateforme CLUSTALW faire un copier coller des génomes et clique sur execute multiple alignement.



Multiple Sequence Alignment by CLUSTALW

The screenshot shows the CLUSTALW web interface. At the top, there are tabs for 'ETE3', 'MAFFT', 'CLUSTALW', and 'PRRN'. The 'CLUSTALW' tab is selected. Below the tabs, there are 'General Setting Parameters' including 'Output Format' (set to CLUSTAL) and 'Pairwise Alignment' (set to FAST/APPROXIMATE). There are radio buttons for 'PROTEIN' (selected) and 'DNA'. A text area for entering sequences is present, along with a 'Choose File' button. At the bottom, there are 'Execute Multiple Alignment' and 'Reset' buttons, and a link for 'More Detail Parameters...'. A 'Help' link is also visible in the top right corner.

Figure 30 : la base de donné CLUSTALW .

- une fenêtre s'ouvrira montre le résultat d'alignement.

CLUSTALW RESULT

WARNING: possibly wrong combination

Selected type : PROTEIN
Query sequence: DNA

[clustalw.aln][clustalw.dnd][readme]

Select tree menu

CLUSTAL 2.1 Multiple Sequence Alignments

Sequence type explicitly set to Protein
Sequence format is Pearson
Sequence 1: MN908947.3 29903 aa
Sequence 2: hCoV-19/Botswana/R50807_BHP_362183914/2021|EPI_ISL_7548905|2021-12-05 29684 aa
Sequence 3: hCoV-19/India/JK-621398499/2021|EPI_ISL_13209352|2021-12-30 29784 aa
Sequence 4: hCoV-19/Peru/LIM-UPCH-2030/2021|EPI_ISL_8889852|2021-03-15 29787 aa
Start of Pairwise alignments
Aligning...

(Partial alignment)
Sequences (1:2) Aligned. Score: 41.1467
(Partial alignment)
Sequences (1:3) Aligned. Score: 32.2388
(Partial alignment)
Sequences (1:4) Aligned. Score: 33.6422
(Partial alignment)
Sequences (2:3) Aligned. Score: 41.0794
(Partial alignment)
Sequences (2:4) Aligned. Score: 38.893
(Partial alignment)
Sequences (3:4) Aligned. Score: 33.6221
Guide tree file created: [clustalw.dnd]

There are 3 groups
Start of Multiple Alignment

Aligning...
Group 1: Sequences: 2 Score:346278
Group 2: Sequences: 3 Score:341284
Group 3: Sequences: 4 Score:345660
Alignment Score 1173900

CLUSTAL-Alignment file created [clustalw.aln]

clustalw.aln

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```
hCoV-19/India/JK-621398499/2021
hCoV-19/Peru/LIM-UPCH-2030/2021
hCoV-19/Botswana/R50807_BHP_36
MN908947.3
-----AACITTCGATCTC
ATTAAGAGTTTATACCTTCCCAGGTAACAACCAACCAACTTCGATCTC

hCoV-19/India/JK-621398499/2021
hCoV-19/Peru/LIM-UPCH-2030/2021
hCoV-19/Botswana/R50807_BHP_36
MN908947.3
-----CTGTTCTCTAAACGAACITTTAAAATCTGTGTGGCTGTCACTC
TTGTAGATCTGTTCTCTAAACGAACITTTAAAATCTGTGTGGCTGTCACTC
---AGATCTGTTCTCTAAACGAACITTTAAAATCTGTGTGGCTGTCACTC
TTGTAGATCTGTTCTCTAAACGAACITTTAAAATCTGTGTGGCTGTCACTC
*****

hCoV-19/India/JK-621398499/2021
hCoV-19/Peru/LIM-UPCH-2030/2021
hCoV-19/Botswana/R50807_BHP_36
MN908947.3
GGCTGCATGCTTAGTGCACTCACGCGATATAATCAATAACTAATTAAGTGT
GGCTGCATGCTTAGTGCACTCACGCGATATAATCAATAACTAATTAAGTGT
GGCTGCATGCTTAGTGCACTCACGCGATATAATCAATAACTAATTAAGTGT
GGCTGCATGCTTAGTGCACTCACGCGATATAATCAATAACTAATTAAGTGT
*****

hCoV-19/India/JK-621398499/2021
hCoV-19/Peru/LIM-UPCH-2030/2021
hCoV-19/Botswana/R50807_BHP_36
MN908947.3
CGTTGACAGSACACGAGTAACCTCGTCTATCTTCTGCAGGCTGTCTACGGT
CGTTGACAGSACACGAGTAACCTCGTCTATCTTCTGCAGGCTGTCTACGGT
CGTTGACAGSACACGAGTAACCTCGTCTATCTTCTGCAGGCTGTCTACGGT
CGTTGACAGSACACGAGTAACCTCGTCTATCTTCTGCAGGCTGTCTACGGT
*****

hCoV-19/India/JK-621398499/2021
hCoV-19/Peru/LIM-UPCH-2030/2021
hCoV-19/Botswana/R50807_BHP_36
MN908947.3
TTCTGTCCTGTTTGCAGCCGATCATCAGCACACTAGGTTTTGTCGGGGTG
TTCTGTCCTGTTTGCAGCCGATCATCAGCACACTAGGTTTTGTCGGGGTG
TTCTGTCCTGTTTGCAGCCGATCATCAGCACACTAGGTTTTGTCGGGGTG
TTCTGTCCTGTTTGCAGCCGATCATCAGCACACTAGGTTTTGTCGGGGTG
*****
```

l'alignement par le logiciel gratuit CLUSTALW

Figure 31 : les résultats de

```
hCoV-19/India/JK-621398499/2021
hCoV-19/Peru/LIM-UPCH-2030/2021
hCoV-19/Botswana/R50807_BHP_36
MN908947.3
-----TGCACGAAAGGTAAAGTGGAGGCTTGTCCCTGGTTTCAACGAGAAAAC
TGACCGAAAGGTAAAGTGGAGGCTTGTCCCTGGTTTCAACGAGAAAAC
TGACCGAAAGGTAAAGTGGAGGCTTGTCCCTGGTTTCAACGAGAAAAC
*****

hCoV-19/India/JK-621398499/2021
hCoV-19/Peru/LIM-UPCH-2030/2021
hCoV-19/Botswana/R50807_BHP_36
MN908947.3
ACACGCTCAACTCAGTTTGCCTGTTTTACAGGTTCCGCGACGTGCTGTAC
ACACGCTCAACTCAGTTTGCCTGTTTTACAGGTTCCGCGACGTGCTGTAC
ACACGCTCAACTCAGTTTGCCTGTTTTACAGGTTCCGCGACGTGCTGTAC
*****

hCoV-19/India/JK-621398499/2021
hCoV-19/Peru/LIM-UPCH-2030/2021
hCoV-19/Botswana/R50807_BHP_36
MN908947.3
GTGGCTTTGGAGACTCCGTGGAGGTTTATCAGAGSACGTCACACT
GTGGCTTTGGAGACTCCGTGGAGGTTTATCAGAGSACGTCACACT
GTGGCTTTGGAGACTCCGTGGAGGTTTATCAGAGSACGTCACACT
*****

hCoV-19/India/JK-621398499/2021
hCoV-19/Peru/LIM-UPCH-2030/2021
hCoV-19/Botswana/R50807_BHP_36
MN908947.3
CTTAAGAATGGCACTGTGGCTTAGTAAAGTTGAAAAGGGCTTTTGCC
CTTAAGAATGGCACTGTGGCTTAGTAAAGTTGAAAAGGGCTTTTGCC
CTTAAGAATGGCACTGTGGCTTAGTAAAGTTGAAAAGGGCTTTTGCC
*****

hCoV-19/India/JK-621398499/2021
hCoV-19/Peru/LIM-UPCH-2030/2021
hCoV-19/Botswana/R50807_BHP_36
MN908947.3
TCAACTTGAACGCCCTATGTGTCATCAACGTTCCGATGCTGCAACTG
TCAACTTGAACGCCCTATGTGTCATCAACGTTCCGATGCTGCAACTG
TCAACTTGAACGCCCTATGTGTCATCAACGTTCCGATGCTGCAACTG
TCAACTTGAACGCCCTATGTGTCATCAACGTTCCGATGCTGCAACTG
*****

hCoV-19/India/JK-621398499/2021
hCoV-19/Peru/LIM-UPCH-2030/2021
hCoV-19/Botswana/R50807_BHP_36
MN908947.3
CACCTCATGTGATGTTATGTTGAGCTGGTAGCAACTGGAAGGCATT
CACCTCATGTGATGTTATGTTGAGCTGGTAGCAACTGGAAGGCATT
CACCTCATGTGATGTTATGTTGAGCTGGTAGCAACTGGAAGGCATT
CACCTCATGTGATGTTATGTTGAGCTGGTAGCAACTGGAAGGCATT
*****

hCoV-19/India/JK-621398499/2021
hCoV-19/Peru/LIM-UPCH-2030/2021
hCoV-19/Botswana/R50807_BHP_36
MN908947.3
CAGTACGGTCTGATGTTGAGCACTTGGTCTTGTCCCTCATGTGGG
CAGTACGGTCTGATGTTGAGCACTTGGTCTTGTCCCTCATGTGGG
CAGTACGGTCTGATGTTGAGCACTTGGTCTTGTCCCTCATGTGGG
CAGTACGGTCTGATGTTGAGCACTTGGTCTTGTCCCTCATGTGGG
*****

hCoV-19/India/JK-621398499/2021
hCoV-19/Peru/LIM-UPCH-2030/2021
hCoV-19/Botswana/R50807_BHP_36
MN908947.3
CGAAATACCAAGTGGCTTACCAGAGTTCTTCTTCTGTAAGAACGGTAATA
CGAAATACCAAGTGGCTTACCAGAGTTCTTCTTCTGTAAGAACGGTAATA
CGAAATACCAAGTGGCTTACCAGAGTTCTTCTTCTGTAAGAACGGTAATA
CGAAATACCAAGTGGCTTACCAGAGTTCTTCTTCTGTAAGAACGGTAATA
*****
```

La séquence du gène N sous format FASTA téléchargée à partir de GenBank :

>NC_045512.2:28274-29533 Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate Wuhan-Hu-1, complete genome

```

ATGTCGTATAATGGACCCCAAAATCAGCGAAATGCACCCCGCATTACGTTTGGTGGACCCTCAGATTCAACTGGCAGTA
ACCAGAATGGAGAACGCAGTGGGGCGCGATCAAAACAACGTCGGCCCAAGGTTTACCCAATAATACTGCGTCTTGGT
TCACCGCTCTCACTCAACATGGCAAGGAAGACCTTAAATTCCCTCGAGGACAAGGCGTTCCAATTAACACCAATAGCA
GTCCAGATGACCAAATTGGTACTACCGAAGAGCTACCAGACGAATTCGTGGTGGTACGGTAAAATGAAAGATCTCA
GTCCAAGATGGTATTTCTACTACCTAGGAAGTGGGCCAGAAGCTGGACTTCCCTATGGTGTCTAACAAAGACGGCATCAT
ATGGGTTGCAACTGAGGGAGCCTTGAATACACCAAAAAGATCACATTGGCACCCGCAATCCTGCTAACAATGCTGCAAT
CGTGCTACAACCTCCTCAAGGAACAACATTGCCAAAAGGCTTCTACGCAGAAGGGAGCAGAGGCGGCAGTCAAGCCTC
TTCTCGTTTCCTATCACGTAGTCGCAACAGTTCAAGAAATTCACTCCAGGCAGCAGTAGGGAACTTCTCCTGCTAGA
ATGGCTGGCAATGGCGGTGATGCTGCTCTTGGTTGCTGCTGCTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGCAAAAATGCTGTG
GTAAAGGCCAACAAACAAGGCCAACTGTCCTAAGAAATCTGCTGCTGAGGCTTCTAAGAAGCCTCGGCAAAAAC
GTACTGCCACTAAAGCATAACAATGTAACACAAGCTTTCGGCAGACGTGGTCCAGAACAACCAAGGAAATTTGGGG
ACCAGGAACTAATCAGACAAGGAACTGATTACAAACATTGGCCGCAAATTGCACAATTTGCCCCAGCGCTTCAGCGT
TCTTCGGAATGTCGCGCATTGGCATGGAAGTACACCTTCGGGAACGTGGTTGACCTACACAGGTGCCATCAAATTTGA
TGACAAAAGATCCAAATTTCAAAGATCAAGTCATTTTGTGAATAAGCATATTGACGCATACAAAACATTCCCACCAACA
GAGCCTAAAAAGGACAAAAAGAAGAAGGCTGATGAAACTCAAGCCTTACCGCAGAGACAGAAGAAAACAGCAAAGTGT
GACTCTTCTCTGCTGCAGATTGGATGATTCTCAAACAATTGCAACAATCCATGAGCAGTGTGACTCAACTCAG
GCCTAA
  
```

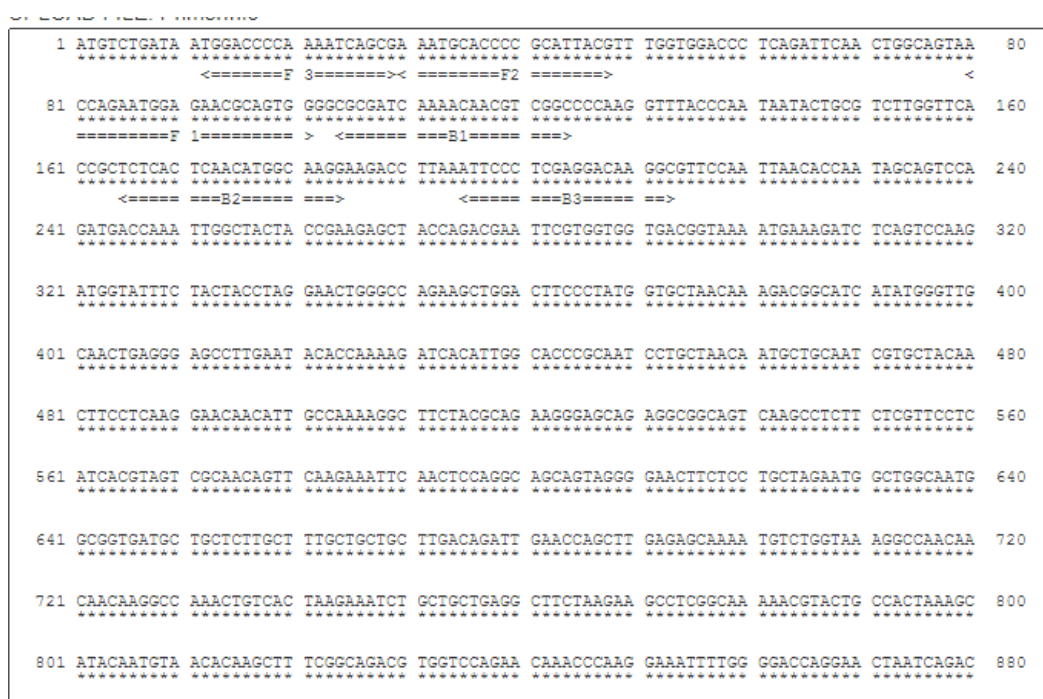


Figure 32 :L'hybridation de gène N par les amorces virale

Protocole de programmation de thermocycleur qTOWER3 :

- Vider les tubes dans les puits de la plaque PCR sombre par ordre (A1 ,A2 ,A3 ,A4,A5).
- Mettre la plaque dans le thermocycleur .
- Régler le programme sur l'ordinateur .
- Le profile de l'amplification régler sur le logiciel est selon les paramètres de LAMP pcr ; une cycle chaque 30 s pour une durée de un heure pour 59 loop(boucle).

Table (Step: 2 of 2)									
Lid temp. °C: 100		<input checked="" type="checkbox"/> Preheat lid	Device: qTOWER 2.2						
2 steps	scan	°C	m:s	goto	loops	ΔT(°C)	Δt(s)	λ(°C/s)	
60x-	1	65,0	00:30	1	59	---	---	5,0	
	2	25,0	20:00	--	--	---	---	5,0	
	3								
	4								
	5								
	6								
	7								
	8								
	9								
	10								

Figure 33 : Les paramètre de Qpcr .

Table (Step: 1 of 2, Plateau time: 25 s, Remaining time: 25 min)				
Lid: 100,3 °C	2 steps	scan	°C	m:s
65,0 °C	55/60	◆	65,0	00:30
	2		25,0	20:00
	3			
	4			
	5			
	6			
	7			
	8			
	9			
	10			

Figure 34 : tableau affiché sur l'écran

- Sélectionner votre échantillon.
- Lancer le programme.

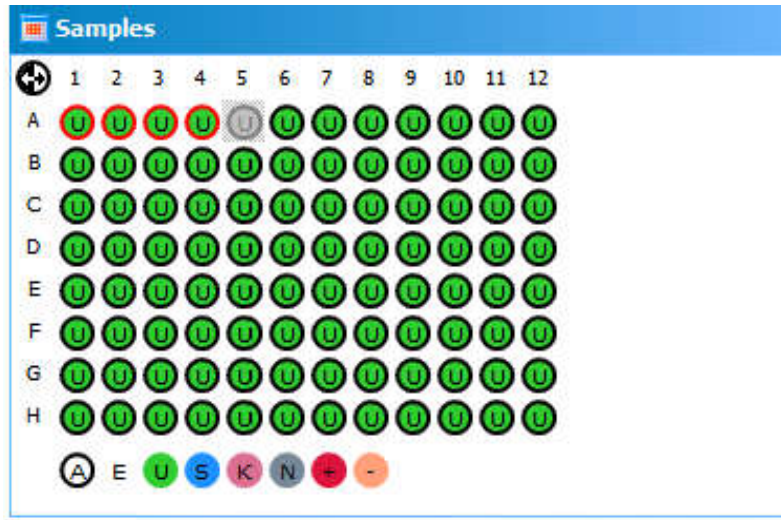


Figure 35 : les puits des échantillons

Année universitaire : 2021 /2022

Présenté par :

Nom prénom : LEGHROUMI Imane

Validation d'une nouvelle technique basée sur la PCR isotherme pour le dépistage du SARS-Cov-2

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en génétique moléculaire

Résumé

La propagation du COVID-19 dans le monde a causé une énorme menace pour la santé publique, cette situation nécessite un test de diagnostic rapide, lors de pandémie ; la détection du SARS-CoV-2 repose principalement sur des tests d'amplification quantitative par polymérase en temps réel (qRT-PCR) effectués dans des laboratoires certifiés. Certes, ces tests qRT-PCR sont très sensibles et spécifiques, néanmoins ils nécessitent des analyseurs coûteux et complexes manipulés par des laborantins hautement qualifiés, de plus ils exigent généralement un délai d'exécution allant de 4h jusqu'à 6h qui peut entraîner un retard d'application des mesures sanitaires.

D'autre test rapide ont été développé telle que d'amplification isotherme à médiation par boucle (LAMP) a fourni un outil innovant pour établir une technique de diagnostic rapide basée sur l'amplification moléculaire de l'ARN ou de l'ADN d'un agent pathogène. Dans cette étude, nous explorons les applications, l'efficacité diagnostique du test LAMP pour le diagnostic moléculaire et la surveillance du coronavirus. Les résultats montrent que LAMP peut être considéré comme un test efficace au point de service pour le diagnostic de Covid- 19 dans les zones endémiques, en particulier pour les pays à revenu faible et intermédiaire.

Mots clés : SARS-CoV-2, LAMP, PCR, diagnostic moléculaire.

Laboratoire de recherche

De biologie moléculaire de l'école supérieure Toufik Kheznadar Université 03 .

Encadreur : Dr CHEKROUD Karim (MCA ENSB).

Examinatrice 1 : Pr SATTA Dalila (Professeur UFM).

Examinatrice 2 : Dr ZIADA Hadia (MCA UFM).