

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE  
LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITÉ SAAD DAHLAB – BLIDA 1



FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Science de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Génétique – Physiologie

Thème

**Étude de la sensibilité d'une technique RT-PCR par  
mesure du titrage viral**

Présenté par : M<sup>elle</sup> HADJAL Baya et M<sup>elle</sup> MEHDI Zahida

Soutenu le 21/09/2016 devant le jury composé de :

M <sup>elle</sup> KEBBAS Salima	Maitre Assistant A,	USDB	<b>Présidente</b>
Mr. GUETARNI Djamel	Professeur	USDB	<b>Examineur</b>
Mr. DERRAR Fawzi	Maitre Assistant A	IPA	<b>Promoteur</b>
Mr. MOHAMED SAID Ramdane	Maitre de Conference B	USDB	<b>Co-promoteur</b>

Promotion 2015/2016

# REMERCIEMENTS

*Nos premiers remerciements vont pour le dieu puissant qui nous a donné la sagesse et le courage d'élaborer ce modeste travail.*

*Nous tenons à exprimer vivement nos sincères remerciements aux termes de respect et de reconnaissance au **Dr. DERRAR F.**, Maitre Assistant en Microbiologie, Responsable du Laboratoire Grippe et Virus Respiratoires de l'Institut Pasteur d'Algérie, pour sa contribution à l'élaboration de ce mémoire par ses conseils précieux, ses suggestions, ses encouragements et sa disponibilité.*

*Nous adressons nos sincères remerciements à **Mr MOHAMED SAID R.**, Maitre de conférences B au département de Biologie de l'université de Blida, qui a codirigé ce mémoire, pour ces encouragements, sa disponibilité et ses précieux conseils au cours de ce travail.*

*Nous voudrions remercier **M<sup>lle</sup> KEBBAS S.**, Maitre Assistante A au département de Biologie de l'université de Blida, d'avoir accepté de présider le jury de cette soutenance.*

*Nos remerciements et notre profond respect vont à **Mr GUETARNI D.**, Professeur au département de Biologie de l'université de Blida, pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Nos remerciements vont également à tout le personnel du Laboratoire Grippe et Virus Respiratoires de l'Institut Pasteur d'Algérie, en particulier **M<sup>lle</sup> GRADI A** pour sa disponibilité, sa patience, son encouragement, et pour l'aide précieuse qu'elle nous apportée.*

*Merci à tout le personnel du Laboratoire des Entérovirus de L'Institut Pasteur d'Algérie, en particulier **M<sup>me</sup> BOULAHBEL D.**, pour sa disponibilité, ses idées et son sens pratique.*

*Merci à **Mr ADJED B**; Ingénieur en bio-statistique à l'IPA pour sa précieuse aide dans l'analyse statistique des résultats. Une aide qui nous a été utile pour valider nos conclusions de ce travail.*

*Merci à tous les enseignants qui nous ont soutenu durant notre cursus universitaire.*

*A toute la section 2<sup>ème</sup> année MASTER option : Génétique et Physiologie, avec lesquels on a partagé de bons moments.*

*Merci à nos famille **HADJAL** et **MEHDI** respectivement, sur lesquelles on a toujours compté.*

*On remercie enfin toutes les personnes qui ont collaboré de près ou de loin à la finalisation de ce mémoire et qui se reconnaîtront.*

**Résumé :**

Le Centre National de Référence OMS pour la Grippe de l'Institut Pasteur d'Algérie a mis en point la technique du titrage du virus de la grippe en dilutions limites (DICT<sub>50</sub>), qui permet non seulement de tester la sensibilité des cellules MDCK utilisées lors de l'isolement du virus Influenza, mais aussi pour déterminer la concentration du virus qui permet d'inhiber 50% de cellules en culture.

Un total de 68 souches virales A/H3N2 a été testé. Ces souches ont été isolées au CNR Grippe de l'Institut Pasteur d'Algérie, durant la période allant de 2009 au Avril 2016.

Cet échantillon a été choisi du faite de la fréquente modification antigénique des souches A/H3N2, qui sont responsables chaque année d'épidémies.

A fin d'étudier l'apport de la sensibilité cellulaire dans la validation d'une méthode moléculaire « la RT-PCR » en temps réel pour la détection du virus de la grippe, nous avons eu recours a deux techniques : Le titrage du virus de la grippe en dilutions limites (Détermination de la DICT<sub>50</sub>) et la technique de la RT-PCR en temps réel pour la quantification de l'ARN virale.

Pour cela, nous avons testé une souche de référence, fournis de l'Institut Pasteur Paris.

Les résultats obtenus par la technique de dilution limites comparés à ceux obtenus par la technique RT-PCR montrent qu'il n'ya pas une corrélation entre les valeurs de la DICT<sub>50</sub> et le nombre de cycle Ct des 68 souches A/H3N2 Algérienne.

**Mots Clés :** Grippe, titrage du virus de la grippe en dilutions limites, RT-PCR en temps réel, validation de méthode PCR, limite de détection.

## **Abstract**

The National Reference Centre (NRC) approved by the World Health Organization (WHO) and specialized in Influenza, has as head office the Pasteur's Institute of Algeria (IPA). This center had developed the titration technique of influenza virus called limiting dilution (TCID<sub>50</sub>), which allowed not only the sensitivity test of the MDCK cells used in the isolation of the influenza viruses, but also the determination of the virus concentration which can inhibit 50% cells growth.

Sixty eight virus A / H3N2 strains had been tested. These strains were isolated from Influenza NRC from 2009 to 2016. These samples were used and selected according the antigenic changes of strains A / H3N2 which is responsible of epidemics cases each year.

For this study, we used at the first time the RT-PCR real time to quantify virus RNA and in second time an influenza virus titration by TCID<sub>50</sub>, for both methods we used a reference strain provided from Pasteur's Institute Paris.

The obtained result shows that any correlation between titrations by TCID<sub>50</sub> and cycle number of RT-PCR used for A / H3N2strains of 68 Algerian samples

**Keywords:** Flu, influenza virus titration, TCID<sub>50</sub>, RT-PCR in real time, method validation, detection limit time.

## ملخص:

قام المركز الوطني المرجعي لمنظمة الصحة العالمية لمكافحة الأنفلونزا بمعهد باستور بالجزائر بوضع تقنية المعايرة لفيروس الأنفلونزا عن طريق الحد من التخفيف ، والذي يسمح من جهة باختبار حساسية الخلايا MDCK المستخدمة في عزل فيروسات الأنفلونزا ومن جهة اخرى بتحديد تركيز الفيروس الذي يمكن أن يصيب 50٪ من الخلايا المزروعة.

قمنا باختيار مجموعه 68 سلالة من فيروس H3N2 / A. وقد تم عزل هذه السلالات في المخبر المرجعي لمعهد باستور بالجزائر خلال الفترة من 2009 إلى أبريل 2016. وقد تم اختيار هذه العينة بسبب التغيرات الجينية المتكررة لسلالات A / H3N2 المسؤولة عن الأوبئة سنويا.

لغرض دراسة مساهمة حساسية الخلية في التحقق من صحة طريقة "RT-PCR" من اجل الكشف عن فيروس الأنفلونزا ، قمنا باستعمال اثنين من التقنيات : معايرة فيروسات الأنفلونزا بالحد من التخفيف (تحديد TCID50) وتقنية RT-PCR لتقدير حجم RNA الفيروسي. لهذا قمنا باختيار سلالة مرجعية لمعهد باستور في باريس.

أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها في إطار تقنية التخفيف مقارنة بتلك التي حصلت عليها RT-PCR أن ليس هناك علاقة بين قيم TCID 50 وعدد الدورات (Ct) ل 68 سلالات A / H3N2 التي تم عزلها بالجزائر.

**كلمات البحث** أنفلونزا المعايرة فيروس الأنفلونزا في التخفيف الحد، RT-PCR, التحقق من صحة طريقة PCR، والحد من الكشف.

## ABREVIATIONS

**A:** Absorbance  
**ARN:** Acide RiboNucléique  
**ARNc:** ARN complémentaire  
**ARNm:** Acide RiboNucléique messenger  
**ARN<sub>v</sub>:** Acide Ribonucléique Virale  
**AVL:** Viral Lysis buffer (Tampon de lyse virale)  
**AVE:** Elution buffer (Tampon d'éluion)  
**AW1:** Wash buffer 1 (Tampon de lavage 1)  
**AW2:** Wash buffer 2 (Tampon de lavage 2)  
**°C :** degré Celsius  
**CDC :** Center Deasys Control (Centre de control des maladies)  
**Cm<sup>2</sup> :** Centimètre carré  
**CNR :** Centre National de Référence  
**Ct:** Cycle threshold  
**dNTP:** désoxyribo-nucléotides Tri phosphates  
**DMEM:** Dulbecco's modified Eagle's medium  
**DO:** Densité Optique  
**DICT<sub>50</sub> :** Tissue Culture Infectious Dose 50 (Dose Infectieuse en Culture Cellulaire 50%)  
**ECP :** Effet cytopathique  
**g :** gravité  
**HA :** Hémagglutinine  
**HA1 :** première sous-unité de l'hémagglutinine  
**HA2:** deuxième sous-unité de l'hémagglutinine  
**M1, M2, M42 :** Protéine de la matrice  
**MDCK:** Madin Darby Canine Kidney.  
**mL:** millilitre  
**mn:** minute  
**MTV:** Milieu du Transport Viral  
**NA:** neuraminidase  
**NP:** Nucléoprotéine  
**Neu5Ac :** Acide N- acétylneuraminique  
**NS1, NS2 :** Protéine non structurale  
**OMS :** Organisation Mondial de la Santé  
**PA :** polymérase Acide  
**PB1 :** polymérase basique 1  
**PB2 :** polymérase basique 2  
**PBS :** Phosphate Buffer Saline (Tampon phosphate salin)  
**PCR :** Polymerase Chain Reaction (Réaction de polymérisation en chaine)  
**RNP :** ribonucléoprotéine  
**RNP<sub>v</sub> :** ribonucléoprotéine virale  
**rpm :** rotation per minute  
**RT-PCR :** Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (Transcription réverse Réaction de polymérisation en chaine)  
**SG :** Syndrome Grippal  
**Sec :** Seconde  
**SVF :** sérum de veau fœtal  
**TPCK:** Trypsin L-1-tosylamide-2-phenylethyl chloromethyl ketone  
**ul:** microlitre  
**IHA :** Inhibition de l'Hémagglutination  
**INA :** Inhibiteurs de la Neuraminidase  
**INSP :** Institut Nationale de Santé Publique  
**IPA:** Institut Pasteur d'Algérie  
**VGM:** Viral Growth Medium (Milieu de croissance viral)

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1 :</b> Le virus grippal.....	2
<b>Figure 2 :</b> Organisation Schématique d'un segment de gène (ARNv).....	3
<b>Figure 3 :</b> Représentation de la structure de l'HA et de la NA d'un virus influenza de type A.....	4
<b>Figure 4 :</b> Schéma du changement de structure tridimensionnelle d'un monomère de l'HA lors de l'abaissement du pH dans les endosomes.....	5
<b>Figure 5 :</b> Représentation schématique du cycle de réplication du virus influenza.....	6
<b>Figure 6 :</b> Représentation schématique de l'organisation des RNPv.....	7
<b>Figure 7 :</b> mécanismes d'émergence d'un nouveau sous-type de virus influenza par réassortiment génétique (A) ou transmission directe (B).....	8
<b>Figure 8 :</b> Hôtes des virus influenza.....	10
<b>Figure 9 :</b> Isolement des virus grippaux. Tapis cellulaire de cellules MDCK avant (gauche) et après l'apparition d'un effet cytopathique (droite). (Grossissement X 40).....	11
<b>Figure 10 :</b> Courbe dose-réponse hypothétique. La dose létale est indiquée en pointillés.....	13
<b>Figure 11 :</b> Principe de détection du produit amplifié par amplification génique.....	15
<b>Figure 12:</b> Modèle graphique de la PCR en temps réel où l'intensité de la fluorescence est exprimée en fonction du nombre de cycles.....	15
<b>Figure 13 :</b> Schéma du traitement des prélèvements par des antibiotiques.....	16
<b>Figure 14 :</b> Titrage des contrôles antigènes (OMS) par le test d'hémagglutination.....	18
<b>Figure 15 :</b> Titrage des isolats par le test d'hémagglutination.....	19
<b>Figure 16 :</b> Schéma représentant le test de détection des agglutinines non spécifiques.....	21
<b>Figure 17:</b> Schéma représentant le test d'inhibition de l'hémagglutination.....	21
<b>Figure 18 :</b> Principe de la sonde d'hydrolyse TaqMan.....	24
<b>Figure 19 :</b> Les étapes de l'extraction.....	26
<b>Figure 20:</b> Le Thermocycleur Applied Biosystems.....	28
<b>Figure 21 :</b> Répartition des cas autochtones par wilaya.....	29
<b>Figure 22 :</b> Répartition des souches selon le nombre de passage.....	30
<b>Figure 23 :</b> Répartition des IHA selon le nombre de passage.....	30
<b>Figure 24 :</b> Répartition des DICT <sub>50</sub> selon le nombre de passage.....	31
<b>Figure 25 :</b> Répartition des DICT <sub>50</sub> selon IHA.....	32
<b>Figure 26 :</b> lecture de la plaque du titrage (Titre en DICT <sub>50</sub> /ml= $10^{5,42}$ ).....	33
<b>Figure 27 :</b> Représentation de nombre de puits infectés et non infectés .....	33
<b>Figure 28 :</b> Représentation schématique des puits positifs et négatifs en Ct.....	34
<b>Figure 29 :</b> Représentation des valeurs Ct des puits positifs (Présence d'ECP) et les puits négatifs (Absence d'ECP).....	35

<b>Figure 30</b> : Répartition des valeurs moyennes en Ct des différentes dilutions correspondant au titre $10^{5,17}$ DICT50/ml.....	36
<b>Figure 31</b> : Le kit QIAamp <sup>®</sup> viral RNA mini kit 250.....	48

## **LISTE DES TABLEAUX**

**Tableau I** : l'hémagglutination avec différent types de globules rouge

**Tableau II** : Préparation du mélange réactionnel PCR

**Tableau III** : Exemple de configuration du test

**Tableau IV** : Exemple de la répartition des échantillons

**Tableau V** : Programmation de l'automate Applied Biosystems

**Tableau VI** : Représentation du nombre de puits positif (Présence d'ECP) et négatif (Absence d'ECP) en fonction du titre en  $DICT_{50}$

**Tableau VII** : Répartition du nombre de copie par RT-PCR

**Tableau VIII** : Valeurs de Ct des puits infectés et non infectés

**Tableau IX** : Représentation des valeurs moyennes de Ct des différentes dilutions en fonction des titres en  $DICT_{50}$

**Tableau X** : Préparation du tampon de lyse AVL/ARNc

**Tableau XI** : Valeurs de la  $DICT_{50}$  et du Ct de toutes les souches testées

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION</b> .....	1
<b>CHAPITRE I : GENERALITES</b> .....	2
I.1 Description des virus grippaux.....	2
I.1.1 Classification.....	2
I.1.2 Structure du virus de la grippe.....	2
I.1.2.1 L'enveloppe virale.....	3
I.1.2.2 Génome du virus de la grippe.....	4
I.1.2.3 La protéine de matrice M1.....	4
I.1.3 Mode d'infection du virus influenza.....	5
I.2 Mécanismes d'évolution des virus influenza.....	7
1.2.1 Le glissement ou dérive antigénique.....	7
1.2.2 La cassure antigénique.....	8
I.3 Epidémiologie de la grippe.....	9
I.3.1 Clinique chez l'homme.....	9
I.3.2 Modes de transmission .....	9
I.3.2.1 La transmission inter- humaine.....	9
I.3.2.2 Transmission inter- espèce.....	9
I.4 Diagnostic de la grippe.....	10
I.4.1 Le prélèvement.....	10
I.4.2 Méthodes de diagnostic.....	10
I.4.2.1 Isolement des virus grippaux sur œuf embryonné de poulet.....	10
I.4.2.2 Isolement des virus grippaux sur cellules en culture.....	11
I.4.2.3 Titrage et identification des virus grippaux par les tests d'héماغglutination et d'inhibition de l'héماغglutination (IHA).....	12
I.4.2.4 Titrage des suspensions virales en dilutions limites.....	12
1.4.2.5 Détection du génome des virus grippaux par RT-PCR.....	14
A- Principe de l'amplification génique.....	14

B- Diagnostic moléculaire de la grippe.....	15
<b>CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>16</b>
II.1 Isolement du virus de la grippe sur cellule MDCK.....	16
II.1.1 Principe.....	16
II.1.2 Méthode.....	16
II.2 Titrage du virus de la grippe en dilutions limites.....	22
II.2.1 Principe.....	22
II.2.2 Méthode.....	22
II.3 Détection de l'ARN viral par RT-PCR en temps réel.....	20
II.3.1 Principe.....	24
II.3.2 Méthode.....	25
<b>CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION.....</b>	<b>29</b>
III.1 Résultats.....	29
III.2 DISCUSSION.....	38
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>40</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>41</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>44</b>

## Introduction

Les infections virales des voies respiratoires représentent un problème majeur de santé publique en raison de leur présence dans le monde entier, de leur facilité de propagation ainsi que de leur morbidité et mortalité considérables. Elles sont causées par des virus de la famille des *Orthomyxoviridae* qui comprend trois espèces pathogènes pour l'homme, appartenant chacune à un genre différent. Il s'agit des *influenza A virus*, *influenza B virus*, et *influenza C virus*, communément appelés virus de la grippe A, B et C. (SALAZ, 2013)

Les influenza virus A comprennent des virus humains et des virus animaux voisins responsables des gripes équine, porcine, aviaire, eux seuls peuvent provoquer des pandémies. Ils sont classés en sous types en fonction des caractères antigéniques des glycoprotéines de surface : Hémagglutinine (H) et Neuraminidase (N). A ce jour, 17 H (H1 a H17) et 10N (N1 a N10) ont été identifiées chez les oiseaux migrateurs. Chez l'homme seuls les 3H (H1 a H3) et 2N (N1 a N2) sont connus et responsables d'épidémies de grippe. (SALAZ, 2013)

Les virus A se caractérisent par leurs fréquentes modifications. On parle alors de :

- ✓ Glissement (« shift ») : modifications mineures lors des épidémies saisonnières, ce qui explique la nécessité de revacciner tous les ans.
- ✓ Cassure (« drift ») : apparition d'une nouvelle souche virale contre laquelle la population n'est pas protégée et qui engendre des pandémies grippales.

Les virus humains de sous types H1N1 et H3N2 sont responsables chaque année d'épidémies touchant 5 a 15% de la population. D'autre part, la transmission et l'adaptation a l'homme d'un virus influenza A aviaire de sous type nouveau se produit épisodiquement et peut donner lieu a des épidémies exceptionnelles par leur extension et leur gravité telles que les pandémies de 1918,1957, et 1968. (Marie-Anne et al, 2008)

L'objectif de notre travail est de :

- ✓ Mettre au point une technique qui permet le titrage du virus de la grippe en dilution limite (DICT<sub>50</sub>)
- ✓ Connaitre le titre en DICT<sub>50</sub> qui va nous donner une valeur de Ct(Cycle seuil) négative en RT-PCR.

## CHAPITRE I : GENERALITES

### I.1 Description des virus influenza

#### I.1.1 Classification

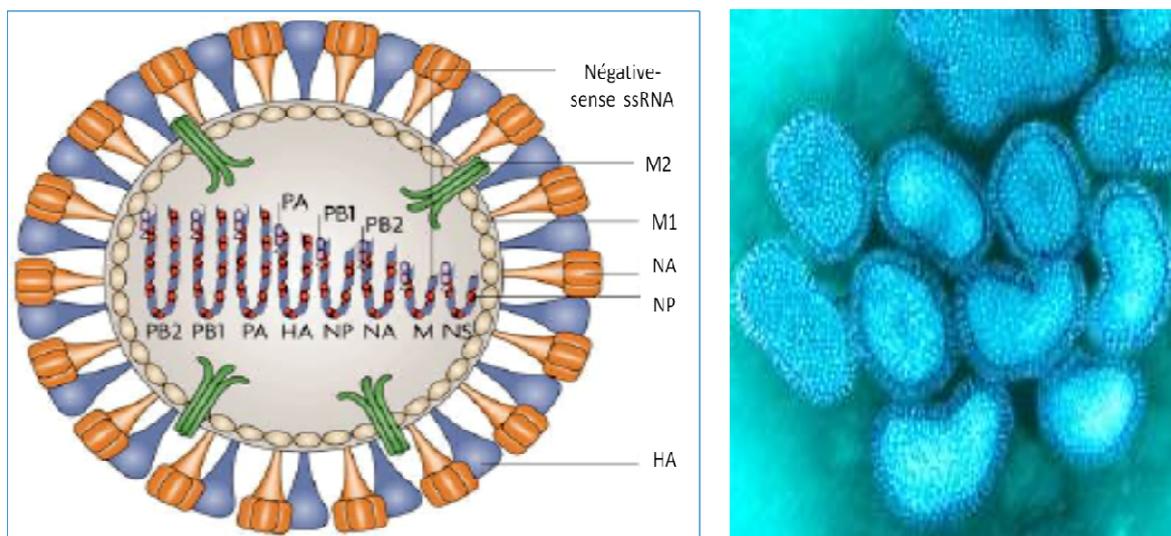
Les virus influenza appartiennent à la famille des *Orthomyxoviridae* et sont répartis en trois genres : virus influenza A, B, C. La classification des virus influenza repose sur la nature de leurs protéines de matrice, de leurs glycoprotéines de surface et de la taille de leur génome. Les virus influenza de type A sont eux-mêmes classés en sous-types en fonction des propriétés antigéniques des deux glycoprotéines de surface : l'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA).

Dix-huit sous-types de HA et onze de NA ont été identifiés. Selon la nomenclature actuelle, un virus influenza est désigné par son type, son hôte d'origine (sauf pour les virus humains), son lieu d'isolement, son numéro de souche et son année d'isolement. Le sous-type antigénique peut être précisé à la suite, entre parenthèses. Par exemple, la souche A/quail/Italy/1117/1965 (H10N8) est la 1117ème souche de type A, sous-type (H10N8) isolée en Italie chez la caille en 1965. (Picard, 2014)

Dans ce travail nous ne décrivons pas des virus influenza de type C qui ne représentent que des cas isolés.

#### I.1.2 Structure du virus de la grippe

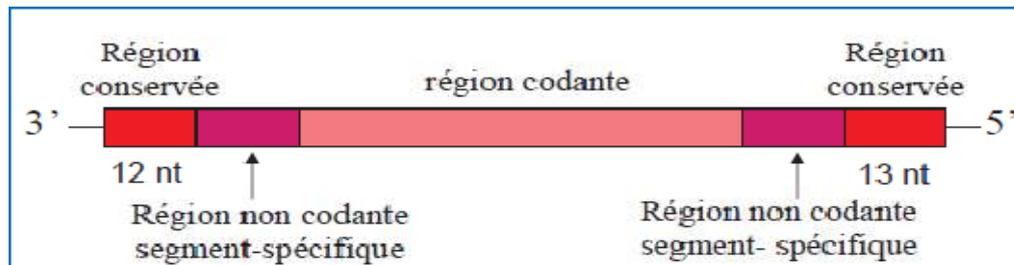
Les virus de la grippe sont des virus enveloppés, de 80 à 120 nm de diamètre, de forme sphérique et plus rarement filamenteuse. Leur génome est constitué d'une molécule d'ARN simple brin de polarité négative segmentée : 8 segments pour les virus influenza de type A. Chaque segment de gènes code pour une ou plusieurs protéines selon le cadre de lecture utilisé. Ainsi, 16 protéines peuvent être synthétisées : HA, NA, nucléoprotéine (NP), protéines de la matrice (M1, M2, M42), protéines non structurales (NS1, NS2), protéines du complexe réplique/transcriptase (PB1, PB1-F2, PB1-N40, PB2, PA, PA-N155, PA-N182) et PA-X.



**Figure 1 : Le virus grippal**

- Représentation schématique du virus influenza A. (Picard, 2014)
- virus influenza A en microscope électronique à transmission. (Leruez-ville, 2006)

Chaque segment d'ARN comporte à ses extrémités 3' et 5' des régions non codantes dont les parties terminales sont conservées pour tous les segments des virus influenza : 12 nucléotides à l'extrémité 3' et 13 à l'extrémité 5'. La surface des virions est recouverte de spicules qui correspondent aux glycoprotéines externes HA et NA ancrées dans la bicouche lipidique de l'enveloppe. **(Bouscambert- Duchamp, 2010)**



**Figure 2 :** Organisation schématique d'un segment de gène (ARNv). **(Essere, 2011)**

### I.1.2.1 L'enveloppe virale

Elle dérive de la membrane plasmique de la cellule infectée, et porte des spicules, visibles en microscopie électronique, formés par des glycoprotéines virales membranaires.

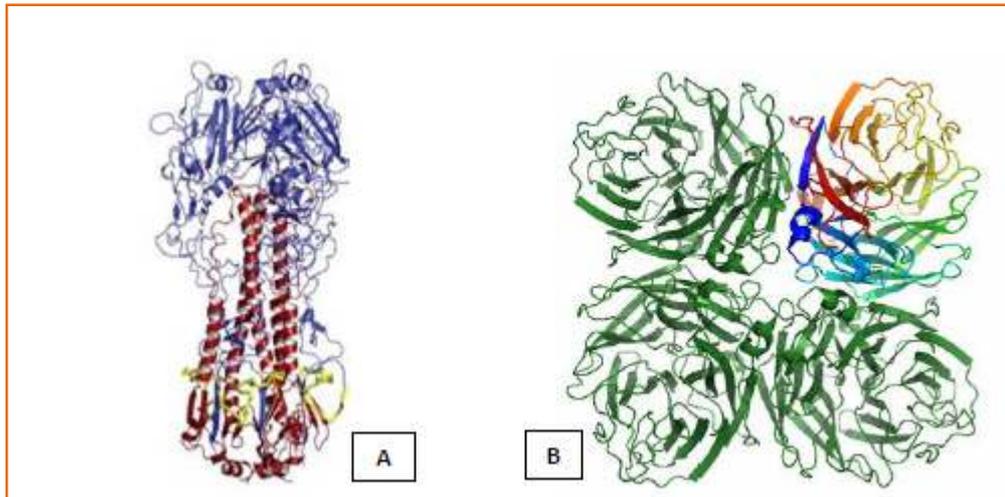
Deux types de spicules, l'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA) sont présents à la surface des virus de type A ou B.

Les virus de type A sont divisés en sous-types sérologiques selon la nature de l'hémagglutinine (H1 à H17) et de la neuraminidase (N1 à N10).

Les molécules de NA se présentent sous la forme d'un tétramère et adopte une structure en forme de champignon.

La partie globulaire a une activité sialidase, qui assure la destruction du récepteur, et porte les sites antigéniques de neutralisation.

Les molécules d'HA sont constituées de deux chaînes polypeptidiques HA1 et HA2 liées par un pont disulfure. Elles présentent d'une part un domaine globulaire qui porte le site d'attachement au récepteur ainsi que l'essentiel des sites antigéniques de neutralisation, et d'autre part une région correspondant à la tige, principalement composée du polypeptide HA2 qui assure l'ancrage de l'HA dans l'enveloppe virale. **(Huraux et al, 2003)**



**Figure 3** : Représentation de la structure de l'HA et de la NA d'un virus influenza de type A.

- A) Structure cristallographique du précurseur trimérique HA0. En bleu HA1 qui possède les sites de liaison à l'acide sialique et les sites antigéniques. En rouge HA2, en forme d'hélice qui porte le peptide de fusion représenté en jaune.
- B) Structure cristallographique d'un tétramère de NA vu dessus. Un monomère est coloré pour représenter les différents feuillets qui structure la NA. (Picard, 2014)

L'enveloppe virale comporte également, en quantité plus faible, une protéine intégrée dans la membrane, M2 pour les virus de type A.

### I.1.2.2 Le génome du virus de la grippe

Il est constitué de segments d'ARN monocaténaire de polarité négative (ARNv).

On dénombre 8 segments pour les virus de type A et B.

Les ARNv sont recouverts de molécules de nucléoprotéine (NP) à raison d'une molécule pour 20 nucléotides, et se présentent sous forme de ribonucléoprotéines (RNP) de structure hélicoïdale, d'un diamètre de 9 nm.

L'extrémité de chacun des segments également associée au complexe de transcription/réplication du virus, constitué des protéines PB1, PB2 et PA.

Les RNP apparaissent circulaire, du fait de la complémentarité des extrémités 5' et 3' de chacun des segments d'ARN. (Huraux et al, 2003)

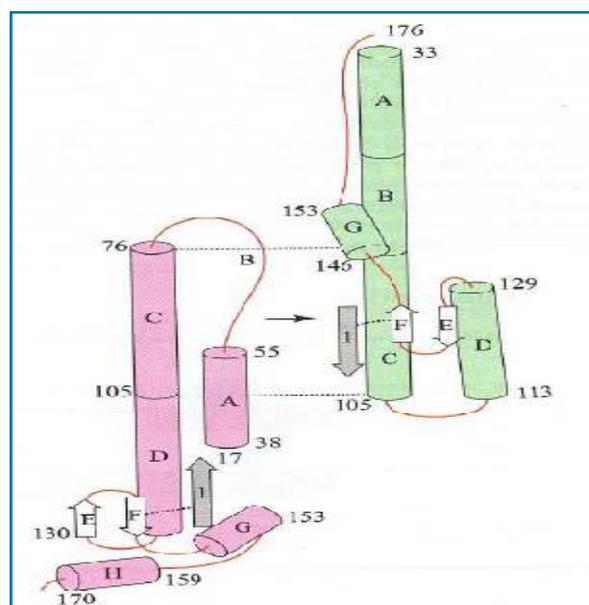
### I.1.2.3 Protéine de matrice M1

Elle couvre la face interne de l'enveloppe virale. Elle interagit avec les domaines cytoplasmiques des glycoprotéines virales d'une part, et avec les RNP d'autre part. (Huraux et al, 2003)

### I.1.3 Mode d'infection du virus influenza

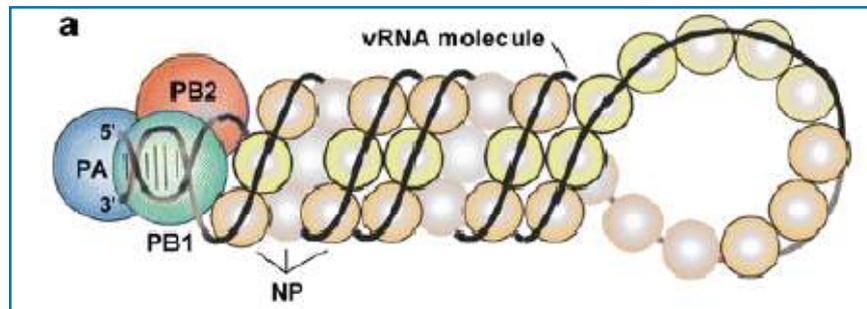
Le virus influenza s'attache à la cellule hôte par liaison de l'HA à son récepteur, l'acide N-Acétylneuraminique (Neu5Ac), présent sur la membrane de la cellule cible. Le Neu5Ac fait partie de la famille des acides sialiques et est l'acide sialique le plus fréquemment retrouvé chez les mammifères. Le Neu5Ac est lié à un résidu galactose. Cette liaison peut être de deux types :  $\alpha 2-3$  ou  $\alpha 2-6$ . Les virus humains possèdent une HA qui reconnaît préférentiellement les récepteurs  $\alpha 2-6$  très présents dans les cellules du tractus respiratoire supérieur humain (nez, gorge, trachée) tandis que les virus d'origine aviaire ont une HA qui reconnaît préférentiellement les récepteurs  $\alpha 2-3$  présents au niveau du tractus intestinal de l'oiseau.

Après l'attachement du virus, ce dernier pénètre dans la cellule hôte par endocytose. Le faible pH de l'endosome permet l'acidification de la particule virale par l'intermédiaire du canal à protons M2. Ceci entraîne le détachement des ribonucléoprotéines virales (RNPv) ainsi que le changement de conformation de l'HA, conduisant à l'exposition du peptide de fusion et à la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane endosomale. (*Picard, 2014*)



**Figure 4 :** Schéma du changement de structure tridimensionnelle d'un monomère de l'HA lors de l'abaissement du pH dans les endosomes. (*Huraux et al, 2003*)

Cette fusion permet la formation d'un pore par lequel les RNPv sont libérées dans le cytoplasme. Ces RNPv sont alors transportées dans le noyau par les protéines NP qui jouent le rôle de molécule chaperonne.



**Figure 5** : Représentation schématique de l'organisation des RNPv. Les sphères grises représentent les monomères de NP avec la molécule d'ARNv associée. La molécule d'ARN simple brin est « enroulée » dans une structure en épingle à cheveux avec une courte région de duplex due à l'association des extrémités des régions 5' et 3'. Cette région constitue le site de liaison pour la complexe polymérase virale. (*Essere, 2011*)

La première phase de réplication du génome viral permet la transcription de l'ARNv en ARNm qui est ensuite exporté dans le cytoplasme afin d'être traduit en protéines par la machinerie cellulaire. L'association de ces ARNv avec le complexe de la polymérase et des nucléoprotéines aboutit à la formation de nouveaux RNPv siégeant dans le noyau. Les RNPv sont finalement adressés sur le site d'assemblage du virus au niveau de la membrane apicale de la cellule, là où sont accumulées les protéines virales HA et NA.

L'interaction entre la protéine M1 et la partie cytoplasmique des glycoprotéines virales permet l'assemblage et le bourgeonnement des virions. La libération du virus néoformé se fait grâce à l'activité sialidase de la neuraminidase, qui catalyse le clivage de la liaison existant entre l'HA et l'acide sialique. (*Picard, 2014*)

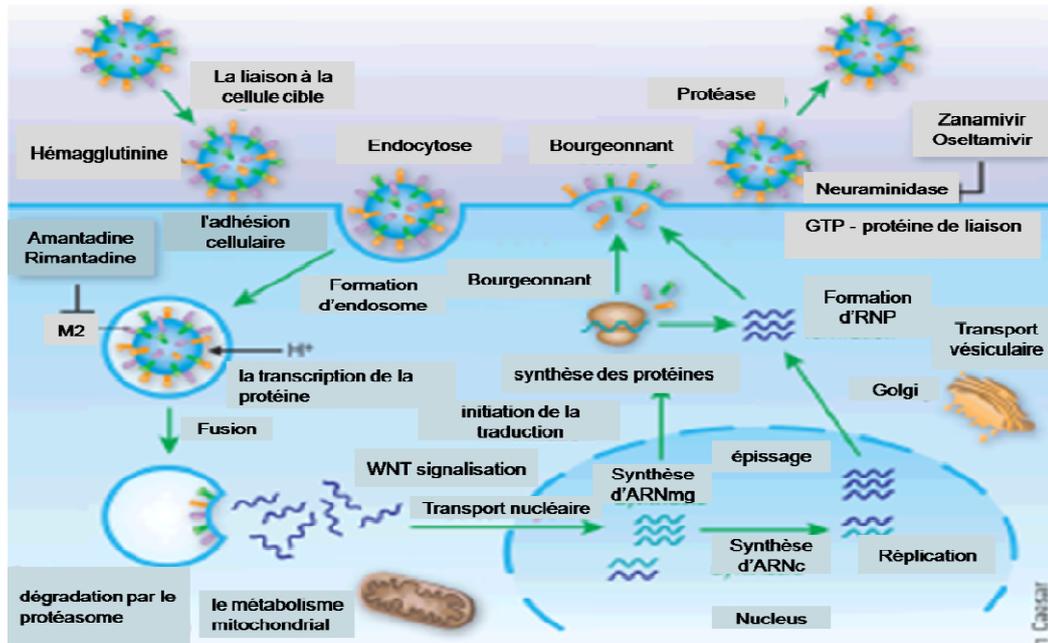


Figure 6 : Représentation schématique du cycle de réplication du virus influenza.

(Picard, 2014)

## I.2 Mécanismes d'évolution des virus influenza

Les virus de la grippe ne sont pas stables dans le temps. Plusieurs phénomènes sont responsables de cette variabilité antigénique : la dérive antigénique ou « shift » et la cassure antigénique ou « drift ».

### I.2.1 Le glissement ou dérive antigénique

Ce sont des mutations souvent ponctuelles sur les segments codant l'HA et la NA, survenant du fait des erreurs aléatoires de l'ARN polymérase ARN-dépendante du virus influenza qui n'a pas de fonction de correction. Il en résulte un nouveau variant antigénique viral remplaçant la souche initial.

Après quelques glissements cumulés, la modification de la spécificité antigénique permet au virus d'échapper à l'immunité établie vis-à-vis du virus précédent.

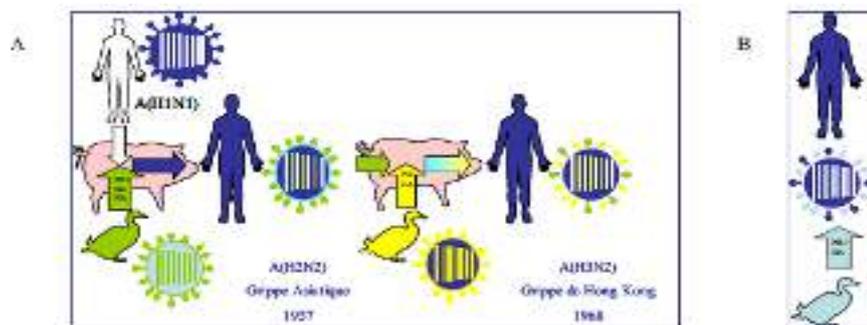
La dérive antigénique est responsable des épidémies hivernales. Elle est la cause de la réactualisation annuelle des souches vaccinales et donc de la vaccination. (Bouscambert-Duchamp, 2010)

## I.2.2 La cassure antigénique

On parle de cassure antigénique quand le changement observé modifie le sous-type de l'HA ou de la NA du virus. Elle est le résultat d'un phénomène de réassortiment génétique suite à l'échange de segments de gène lors de la co-infection d'une même cellule donc d'un même hôte par deux virus influenza A.

Lors de la co-infection d'une même cellule par deux virus influenza A, les deux génomes sont répliqués puis transcrits. C'est lors de l'assemblage, certains segments de gènes s'associent pour donner un nouveau virion dont le génome est un mélange de segments d'origines différentes. Lorsque ce nouveau virus arbore une glycoprotéine différente des virus circulant dans la population humaine, qui est à l'origine de l'émergence chez l'homme de nouveau sous-type viral potentiellement pandémique.

Hormis le réassortiment génétique, il est possible d'observer des changements majeurs au niveau des HA ou NA d'un virus influenza A, par accumulation de mutations, pouvant induire un changement de sous-type. C'est l'hypothèse de l'introduction, par transmission directe, d'un virus A(H1N1) d'origine aviaire, dans la population humaine, provoquant la pandémie de 1918 (Figure 7). L'analyse des séquences de ce virus a montré en effet, qu'il s'agissait d'un virus aviaire ayant accumulé des mutations d'adaptation à l'homme. **(Bouscambert- Duchamp, 2010)**



- (A) Le réassortiment génétique s'explique par l'échange de segments de gène entre deux virus influenza A, lors de la co-infection d'une même cellule donc d'un même hôte (aviaire, porc ou humain). Ce mécanisme est l'hypothèse expliquant l'émergence des virus responsables des pandémies de 1957 (Grippe Asiatique) et de 1968 (Grippe de Hong Kong). En 1957, le virus émergent A(H2N2) est le résultat de l'acquisition sur le fond génétique du virus A(H1N1) humain circulant depuis 1918, des segments HA, NA et PB1 d'un virus aviaire A(H2N2). En 1968, après acquisition par ce virus A(H2N2) d'une HA et du segment PB1 d'un virus aviaire A(H3N2), émerge le virus A(H5N2) circulant encore aujourd'hui.
- (B) L'hypothèse de l'émergence du virus A(H1N1), responsable de la pandémie de 1918, serait celle de l'adaptation à l'homme d'un virus d'origine aviaire par accumulation de mutations, principalement au niveau des segments de gène HA et PB1. Cette hypothèse est controversée.

**Figure 7 :** mécanismes d'émergence d'un nouveau sous-type de virus influenza par réassortiment génétique (A) ou transmission directe (B). **(Bouscambert- Duchamp, 2010)**

## **I.3 Epidémiologie de la grippe**

### **I.3.1 Clinique chez l'homme**

La grippe saisonnière est une infection respiratoire aiguë. Cette maladie sévit dans les régions tempérées, sur un mode épidémique saisonnier essentiellement en hiver. Le tableau clinique se traduit par une trachéo-bronchite simple, associant des signes locaux (rhinite, toux, maux de gorge...) et des signes généraux (céphalées, fièvre élevée d'apparition brutale, frissons, myalgies...).

Une grande majorité de sujets guérissent en quelques jours sans traitement. Cependant des complications peuvent survenir chez des populations fragiles comme les immunodéprimés, les personnes âgées ou déjà atteintes de maladies respiratoires ou cardiovasculaires et les nourrissons.

### **I.3.2 Modes de transmission**

#### **I.3.2.1 La transmission interhumaine**

Le virus influenza se multiplie principalement dans les cellules superficielles du tractus respiratoire in vivo chez l'homme. Après une période d'incubation de 1 à 3 jours, l'excrétion virale peut commencer 24-48 heures avant le début des symptômes, atteindre son maximum entre 24 et 72 heures après le début des symptômes et se prolonger jusqu'à 8 jours (durée moyenne 4 à 33338 jours) chez l'adulte.

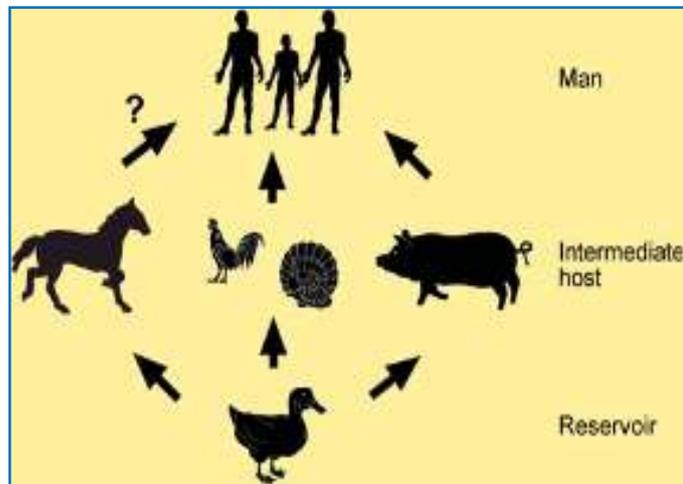
La contamination se fait par voie respiratoire ou conjonctivale et les modes de transmission sont divers. Les modes principaux de contamination sont directs par inhalation de gouttelettes de salive ou de sécrétions rhinopharyngées (toux, éternuements) projetées par le malade mais il existe aussi une transmission indirecte par contact avec des surfaces contaminées. (**Bouscambert- Duchamp, 2010**)

#### **I.3.2.2 La transmission inter-espèce**

Naturellement, il existe une «barrière d'espèce», empêchant les agents infectieux de passer entre les espèces. Cette restriction d'hôte intervient à différents niveaux notamment lors de la reconnaissance des récepteurs cellulaires par la HA. Les virus influenza humains ont une affinité particulière pour ces récepteurs porteurs d'acides sialiques de type  $\alpha 2, 6$  prépondérants à la surface des cellules du tractus respiratoire humain alors que les virus aviaires s'attachent préférentiellement aux récepteurs de type  $\alpha 2, 3$  plus abondants à la surface des cellules du tractus digestif aviaire.

Un changement par mutation de la séquence en acides aminés du site de liaison de l'HA pourrait suffire pour qu'un virus aviaire s'adapte à l'homme. De plus, le réservoir de virus grippaux chez les porcs joue un rôle important dans le risque de transmission des virus aviaires à l'homme

(figure 8). En effet, les cellules épithéliales du tractus respiratoire du porc co-expriment les deux types d'acides sialiques reconnus par les virus humains et aviaires. Il constitue donc un hôte intermédiaire à l'intérieur duquel, des événements de réassortiment génétique peuvent avoir lieu permettant *in fine* l'émergence de virus pouvant franchir la barrière d'espèce. (Essere, 2011)



**Figure 8 : Hôtes des virus influenza. (Essere, 2011)**

## I.4 Diagnostic de la grippe

### I.4.1 Le prélèvement

La qualité du prélèvement conditionne les performances du diagnostic. Il est recommandé de prélever les échantillons cliniques dès que possible après l'apparition des symptômes, de préférence dans un délai de trois jours, mais jusqu'à sept jours suivant l'apparition des symptômes.

Les prélèvements effectués dans la région nasale et rhino-pharyngienne prélevés dans les voies respiratoires offrent un rendement plus élevé pour la détection du virus de la grippe dans les cas de SG que les échantillons de la région oropharyngée.

### I.4.2 Méthodes de diagnostic

#### I.4.2.1 Isolement des virus grippaux sur œuf embryonné de poulet

C'est Burnet qui cultiva pour la première fois un virus de la grippe sur œuf embryonné de poule en 1935.

Il présentait de nombreux avantages sur les animaux qui étaient utilisés jusqu'alors (lapin, cobaye, souris) car c'est un « milieu vivant », il est très sensible à de nombreux virus, c'est un système clos et stérile, il est peu coûteux et peut être obtenu et traité en grande quantité.

L'œuf de poule embryonné est utilisé pour la culture des virus destinés à la production du vaccin anti grippal. La production du virus grippal se fait par inoculation de la souche à l'embryon de poulet par voie allantoïque sur des œufs de 11 jours. (Manuguerra et al, 1999)

#### I.4.2.2 Isolement des virus grippaux sur cellules en culture

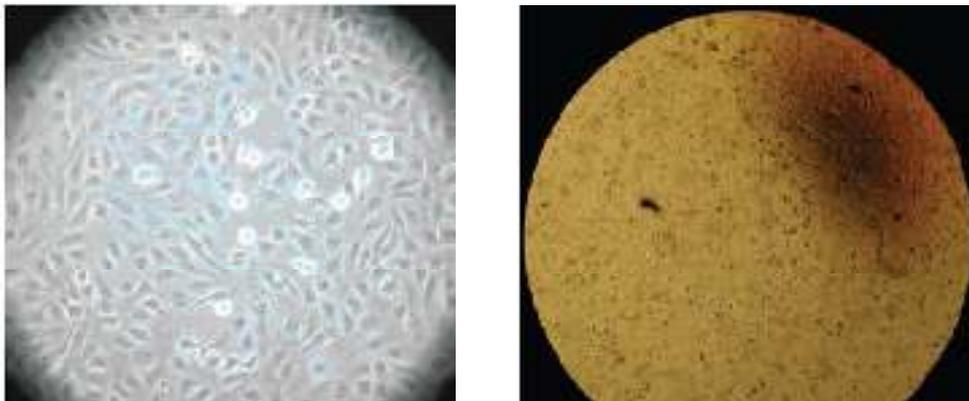
À la fin des années 1980, de nouveaux essais furent faits permettant l'isolement du virus de la grippe sur des cultures cellulaires, dont la sensibilité est proche à celle de l'œuf.

Les meilleurs résultats furent obtenus avec des cellules provenant d'une espèce animale peu ou pas sensible à la grippe, le chien.

Les cellules MDCK (Madin-Darby Canin Kidney) poussent bien en culture, on des propriétés d'attachement très intense à la paroi des flacons où elles poussent, mais, à la condition d'être cultivées sans sérum et d'être maintenues en présence de trypsine, elles donnent de très bon rendement en virus et permettent des isolements faciles de virus de la grippe.

L'inoculation aux cellules MDCK (figure 9) est devenue la méthode de référence pour le diagnostic de la grippe. Cette méthode est la plus sensible pour déceler le virus et elle présente, en outre l'avantage de permettre sa conservation pour un archivage et des études ultérieures concernant sa structure et ses propriétés.

Une fois multipliée sur cellules, la souche virale peut être récoltée et titrée par inhibition de l'hémagglutination.



**Figure 9 :** Isolement des virus grippaux. Tapis cellulaire de cellules MDCK avant (gauche) et après l'apparition d'un effet cytopathique (droite). (Grossissement X 40). (*WHO, 2011*)

### I.4.2.3 Titrage et identification des virus grippaux par les tests d'Hémagglutination (HA) et d'inhibition de l'hémagglutination (IHA)

#### A- L'hémagglutination :

Le virus grippal possède la propriété d'agglutiner les hématies de différentes espèces animales (Tableau I) de façon quantitative et visible macroscopiquement. L'agglutination est due à l'attachement des molécules d'hémagglutinine par leur site récepteur aux acides sialiques des hématies qui sont portés par des sialoglycoprotéines (glycoprotéines) et des sialolipides (gangliosides). L'hémagglutinine est un antigène de surface de la particule virale et l'évaluation de sa quantité permet d'apprécier celle du virus grippal dans une suspension. L'hémagglutination du virus grippal peut être inhibée par des anticorps spécifiques de la souche virale.

Characteristic	Type of RBC			
	Chicken	Turkey	Guinea-pig	Human type O
Concentration (%)	0.5	0.5	0.75	0.75
Type of microtitre plate	V	V	U	U
Incubation time at room temperature (minutes) after RBCs added	30	30	60	60
Appearance of control RBCs	Button*	Button*	Halo	Halo

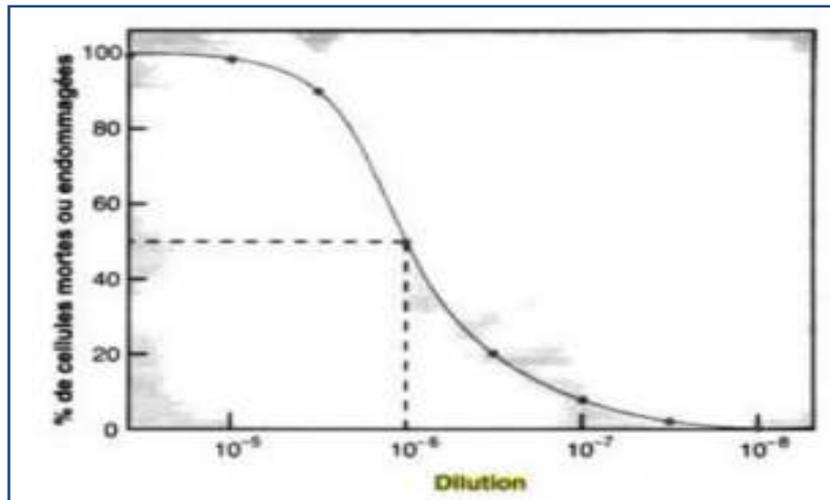
**Tableau I :** l'hémagglutination avec différents types de globules rouges

#### B- Inhibition de l'hémagglutination :

L'IHA est la méthode de référence elle est simple, permet la détermination du type, sous type et même du variant en cause son utilisation nécessite une bonne connaissance de la situation épidémiologique car le choix des antigènes de référence est étroitement lié à la connaissance des souches circulantes de virus de grippe.

### I.4.2.4 Titrage des suspensions virales en dilutions limites

On peut déterminer la quantité de virus requise pour causer une maladie ou la mort par la méthode des dilutions limites. Des organismes ou des cultures de cellules sont inoculés avec une série de dilutions de la suspension virale. Les résultats donnent la dilution limite à laquelle 50% des cellules ou des organismes hôtes sont endommagés ou détruits (figure 10). De la même façon, la dose infectieuse est la dose qui inoculée à des systèmes ou des hôtes tests, infectera 50% de ces systèmes ou de ces hôtes dans les conditions utilisées. (Lansing *et al*, 2002)



**Figure 10 :** Courbe dose-réponse hypothétique. La dose létale est indiquée en pointillés.

(Lansing *et al*, 2002)

Le titre infectieux d'un virus est calculé par une méthode statistique et permet de déterminer la dose de virus par mL qui infecte 50% des cellules inoculées (TCID<sub>50</sub>). Il s'agit d'un titrage en point final.

Le titre d'un virus cytopathogène se définit par le nombre de doses infectieuses du virus qui permettent de provoquer un ECP dans 50% des cupules tapissées par des cellules infectées.

(Manuguerra *et al*, 1999)

Le titre est l'inverse de la dilution qui permet de provoquer un ECP dans 50% des cupules tapissées par des cellules infectées.

Le calcul du log de la dilution permet de déterminer le titre d'une suspension virale.

#### A- La méthode de Kärber

Le log de la dilution qui donne une DICT<sub>50</sub> = log de la première dilution utilisée dans le test – le log du facteur de dilution (la somme des cupules présentant un ECP pour toutes les dilutions / le nombre de cupules utilisées dans le test pour chaque dilution – 0,5). *Polio laboratory manual, WHO 2004.*

**B- La méthode de Reed et Muench**

Cette méthode permet de calculer la différence des logs

A- Entre le log de la dilution qui donne le % immédiatement > à 50% et log de la dilution qui donne 50%

$$\frac{\% \text{ de positifs immédiatement } > 50\% - 50\% \text{ (Facteur de correction)}}{\% \text{ de positifs immédiatement } > 50\% - \% \text{ de positifs immédiatement } < 50\%} \times \text{facteur du log de dilution}$$

Cette différence est ajoutée au log positif de la dilution qui donne le % immédiatement > à 50% pour retrouver le log de la dilution donnant une DICT<sub>50</sub>. (**Manuguerra et al, 1999**)

B- Entre le log de la dilution qui donne le % immédiatement < à 50% et log de la dilution qui donne 50%

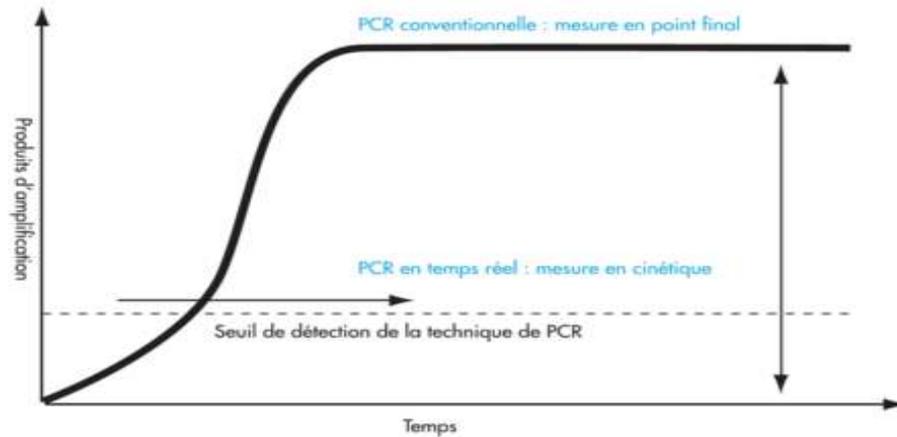
$$\frac{50\% - \% \text{ de positifs immédiatement } < 50\%}{\% \text{ de positifs immédiatement } > 50\% - \% \text{ de positifs immédiatement } < 50\%} \times \text{facteur du log de dilution}$$

Cette différence est retranchée du log positif de la dilution qui donne le % immédiatement < 50% pour retrouver le log de la dilution donnant une DICT<sub>50</sub>. (**Manuguerra et al, 1999**)

**I.4.2.5 Détection du génome des virus grippaux par RT-PCR****A- Principe de l'amplification génique**

Le principe est l'amplification d'une séquence d'ADN cible après rétro-transcription de l'ARN viral en ADN complémentaire (RT-PCR). Deux amorces (sens et anti-sens) spécifiques s'hybrident à la séquence cible en présence d'un excès de désoxyribonucléotides et d'une ADN polymérase stable à haute température, la Taq polymérase qui synthétise le brin complémentaire.

Les techniques de PCR en temps réel permettent de quantifier et de caractériser le produit amplifié au fur et à mesure de la réaction, ce qui réduit considérablement le délai d'obtention des résultats. (Figure 11).

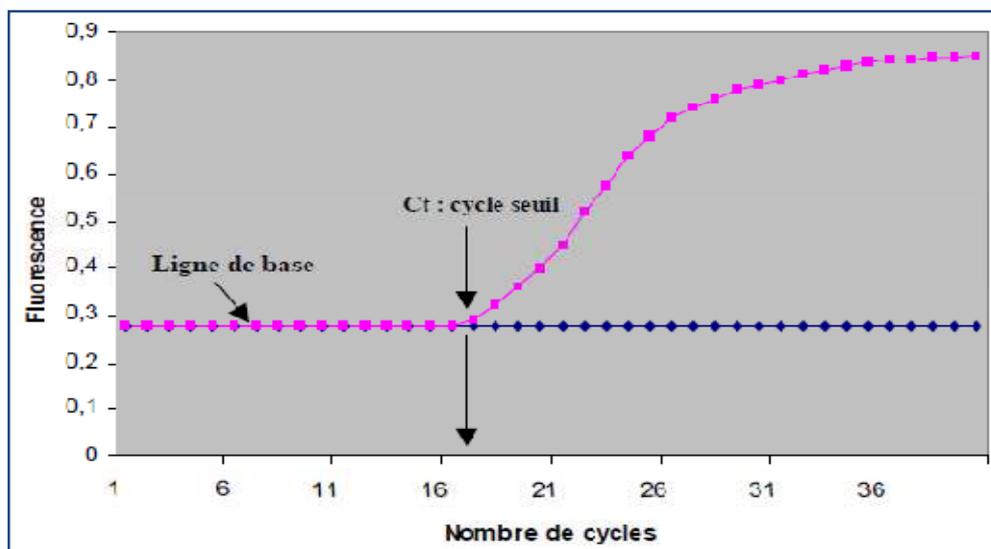


**Figure 11** : Principe de détection du produit amplifié par amplification génique. (Buisson *et al*, 2008)

### B- Diagnostic moléculaire de la grippe

Pour affirmer qu'il s'agit d'un virus de type A ou B, c'est un gène interne, le gène M, qui code la protéine de la matrice à la face interne de l'enveloppe virale. Pour déterminer le sous type viral, c'est une séquence du génome codant l'HA virale. La RT-PCR s'avère au moins aussi sensible que l'isolement en culture. (Huraux *et al*, 2003)

La technique de PCR en temps réel appliquée au virus influenza consiste à réaliser une RT-PCR en une seule étape. Pour déterminer la positivité d'une PCR et/ou Quantifier un échantillon par PCR en temps réel, on détermine le nombre de cycles à partir duquel le produit PCR est détectable. Le moment d'apparition de ce signal seuil dénommé cycle seuil ou Ct (Cycle threshold) est dépendant de la quantité de matrice initialement présente dans l'échantillon amplifié. Il apparait toujours au cours de la phase exponentielle de la PCR (Figure 12).



**Figure 12** : Modèle graphique de la PCR en temps réel où l'intensité de la fluorescence est exprimée en fonction du nombre de cycles. Le cycle seuil (Ct) représente le nombre de cycles requis où le signal d'émission de fluorescence est statistiquement et significativement plus élevé que la ligne de base. (Poitras *et al*, 2002)

## CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES

Afin d'étudier l'apport de la sensibilité cellulaire dans la validation d'une méthode moléculaire « RT-PCR » pour la détection du virus de la grippe, nous avons ciblé une population de 68 malades qui présentaient une grippe saisonnière de type A/H3N2 et ceci durant la période allant de 2009 jusqu'au 2016.

Pour cela, nous avons eu recours aux techniques suivantes :

- Isolement du virus de la grippe sur cellules MDCK (Madin-Darby Canin Kidney) puis typage et sous typage par le test d'inhibition de l'hémagglutination
- Le titrage du virus de la grippe en dilutions limites  $DICT_{50}$  : pour la détermination de la dose de virus par mL qui infecte 50% des cellules inoculées.
- La RT-PCR : qui permet de quantifier l'ARN virale

### II.1 Isolement du virus de la grippe sur cellules MDCK en culture (Voir annexe 1)

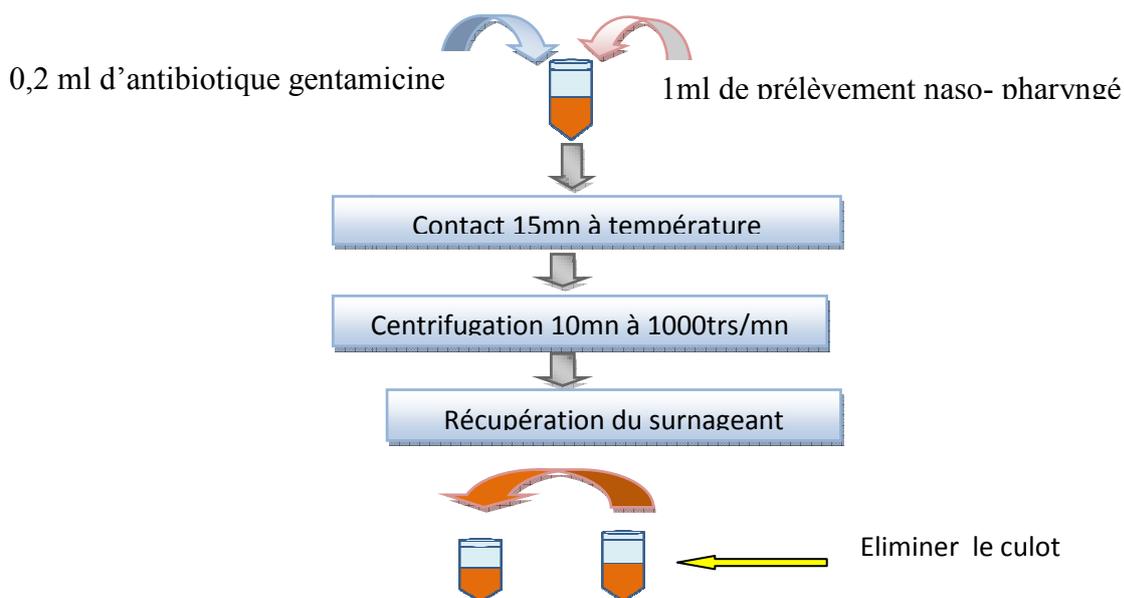
#### II.1.1 Principe

L'isolement du virus de la grippe se fait par inoculation de matériel prélevé chez l'homme sur des cellules MDCK.

#### II.1.2 Méthode

Chaque prélèvement est d'abord vortexé, on ajoute ensuite 200  $\mu$ l de gentamicine par 1ml de l'échantillon et on incube à température ambiante pendant 15 mn.

On centrifuge à 1000tr/mn pendant 10mn pour éliminer les matières étrangères (débris cellulaires), le surnageant est collecté puis conservé à +4°C jusqu'à l'inoculation, si le surnageant ne peut être inoculé dans les 24h, on le congèle à -70 °C.



**Figure 13** : Schéma du traitement du prélèvement par des antibiotiques

- **Préparation des cellules :**

Les cellules sont examinées au microscope inversé au G10 et G40X, on fait un étiquetage de chaque flacon de culture cellulaire : numéro du prélèvement, numéro du passage cellulaire, date et numéro de passage d'inoculation.

On aspire le milieu DMEM de culture cellulaire en utilisant une pipette pasteur stérile puis on lave trois fois avec 6ml DMEM ou bien PBS (A).il est essentiel d'éliminer toute trace de sérum de veau fœtal. Le milieu DMEM ou bien PBS (A) est évacué avec une pipette pasteur stérile.

- **Inoculation sur culture cellulaire (MDCK)**

On inocule 200ul de chaque prélèvement traité dans un flacon de T-25 contenant une nappe confluyente des cellules MDCK (Madin Darby Canine Kidney) 75-80%. On dépose 1ml DMEM pour le témoin négatif et on incubé à 37C° pendant 30 mn.

Après une période d'incubation, on ajoute 6 ml de milieu DMEM contenant 0.1%TPCK (2mg) pour avoir une concentration finale 2ug/ml et 1% antibiotique Pénicilline (10.000U/ml) +streptomycine (10mg/ml) pour la croissance virale. On incube à 35C°.

L'effet cytopathique (ECP) est vérifié quotidiennement pendant 7 jours.

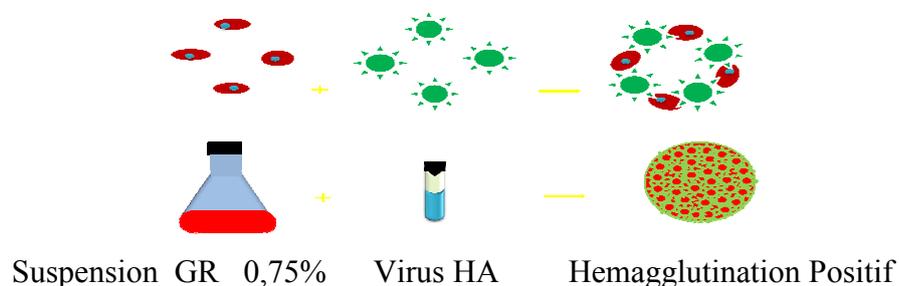
Les cultures virales positives sont conservées à -80 C°, puis décongelé et centrifuger à 3000rpm pendant 5mn et un test d'hémagglutination et d'inhibition d'hémagglutination est effectuer, alors que les autres cultures négatives sont repiquées.

- **Titrage et identification des virus grippaux par le test d'Hémagglutination et inhibition de l'hémagglutination (IHA) (Annexe 2)**

**A- Le test d'Hémagglutination (HA)**

**Principe:**

Le virus grippal possède la propriété d'agglutiner les hématies de différentes espèces animales de façon quantitatives et visible macroscopiquement.



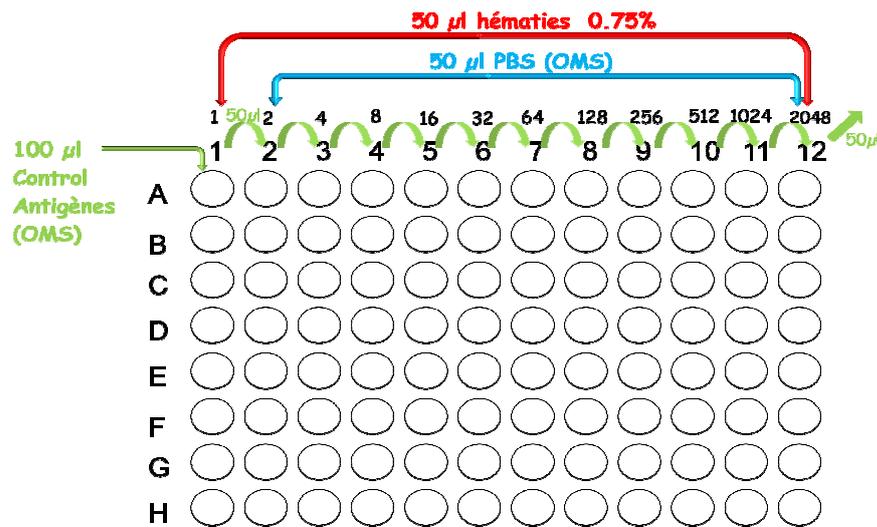
**Méthode :**

**Titration des contrôles antigènes et des isolats viraux par le test d'hémagglutination**

On prépare une suspension d'érythrocytes selon le besoin à 0,75% à partir du sang de cobaye lavés 3 fois par le PBS. Deux plaques en forme U sont utilisées : une pour les contrôles antigènes de l'OMS et l'autre pour les isolats. 50ul de PBS (OMS) sont déposés dans une rangée de 12 puits d'une plaque de micotitration à 96 puits à fonds U sauf dans la première rangée ceci pour chaque contrôle antigènes et virus à identifier (isolat). On ajoute 100ul des contrôles antigènes et d'isolats non dilués dans le premier puits de chaque rangée de chaque plaque correspondant A1, B1, C1, D1, E1, F1, puis on dilue le contrôle antigène et l'isolat en série à l'aide d'une pipette multicanaux pour délivrer 50ul. Les dilutions résultantes vont ainsi aller de 1/2 (puits n°1) à 1/20480 (puits n°12).

On ajoute 50ul de suspension d'érythrocytes à 0,75 % dans chaque puits et agite la plaque pour bien mélanger ensuite on incube à température ambiante (22-25°C) pendant 60 mn.

**Remarque :** les érythrocytes doivent être maintenus en suspension pendant l'étape de distribution.



**Figure 14 :** Titration des contrôles antigènes (OMS) par le test d'hémagglutination.

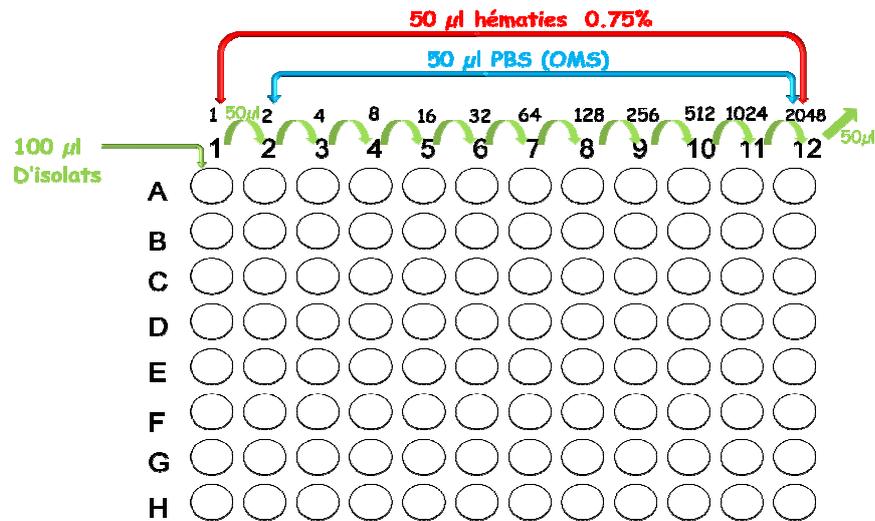
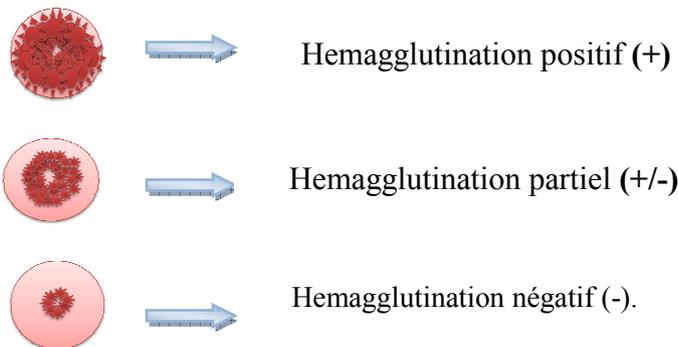


Figure 15 : Titrage des isolats par le test d'hémagglutination.

**Lecture des résultats :**

- Dans les puits où l'hémagglutination est complète (HA positive) : les érythrocytes se dispersent dans tout le puit en formant un tapis continu d'apparence mate au fond de la cupule.
- Les puits où les érythrocytes sédimentent au fond de la cupule en formant un culot central sont négatifs au regard de l'activité hémagglutinante (HA négatif).



**Interprétation :**

- Le titre d'antigène est indiqué par la dilution la plus élevée donnant encore une **hémagglutination complète** qui correspond à une « unité » **hémagglutinante**.

## **B- Identification du Virus de la Grippe par le test d'inhibition de l'hémagglutination (IHA)**

### **Principe :**

Le test IHA est réalisé en utilisant une quantité standardisée de l'antigène avec des antisérums dilués en série et les globules rouges sont ensuite ajoutés pour évaluer le degré de la liaison entre l'anticorps et la molécule de l'hémagglutinant (HA).

### **Test d'inhibition de l'hémagglutination :**

L'antigène est dilué dans le PBS (OMS) de façon à titrer 8 unités pour 50ul (4HAU/25ul), la dilution à appliquer est obtenue en divisant par 8 le dénominateur du titre défini dans le test d'hémagglutination par exemple : un titre d'hémagglutination est 16 divisé par 8 donne 8 c'est à dire mélanger 1ml de l'antigène avec 7ml PBS (MOS) pour obtenir le volume d'antigène standardisé.

25ul de PBS (OMS) sont déposées de A2 jusqu'à A12 d'une plaque de microtitration à 96 puits à fond U sauf dans la première rangée (pour chaque antisérum) puis 50ul des antisérums sont ajoutées dans le premier puits de chaque rangée ex A1, B1, C1, D1, E1.

Les antisérums sont dilués en série à l'aide d'une pipette multicanaux pour délivrer 25ul

25ul de la suspension antigénique à 8 unités sont répartis dans toutes les cupules affectées aux titrages et 25ul de PBS (OMS) sont ajoutées au lieu de l'antigène pour plaque du contrôle du sérum

Un BACK TITRATION doit être effectué en ajoutant 100ul de la suspension antigénique à 8 unités dans les deux premiers rangers G1 et H1 (comme décrit dans le test HA). Les plaques sont agitées manuellement pendant 10 secondes ensuite 50ul de la suspension d'hématies (0,75%) sont répartis dans toutes les cupules de la plaque à 96 puits, on agite les plaques pour bien mélanger

On ajoute pour le test GR 50ul du PBS (OMS) et 50ul d'hématies (0,75%) (ex : G1-G6, H1-H6) voir figure 1, les plaques sont recouvertes puis incubées une heure à la température du laboratoire (22°C-25°C).

**Remarque :** bien maintenir les érythrocytes en suspension pendant la phase de répartition

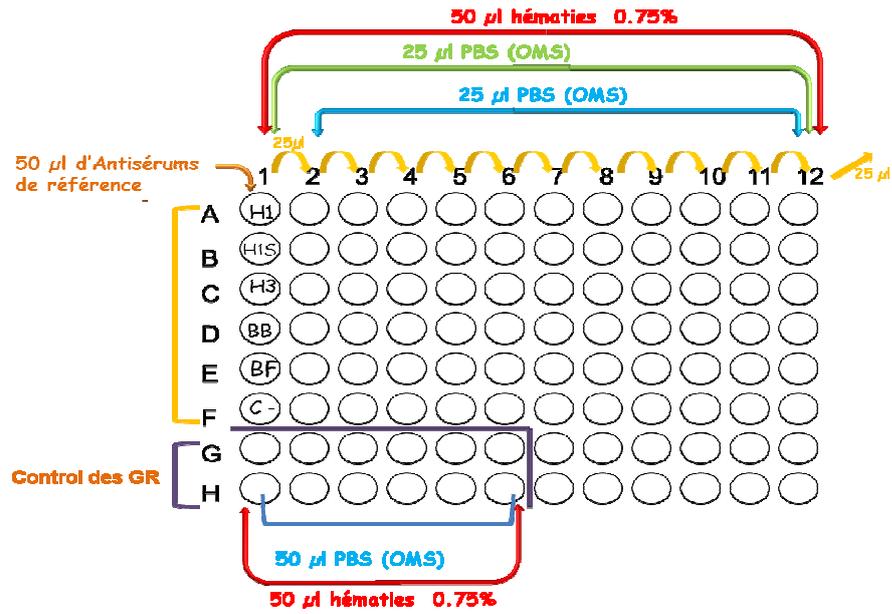


Figure 16 : Schéma représentant le test de détection des agglutinines non spécifiques

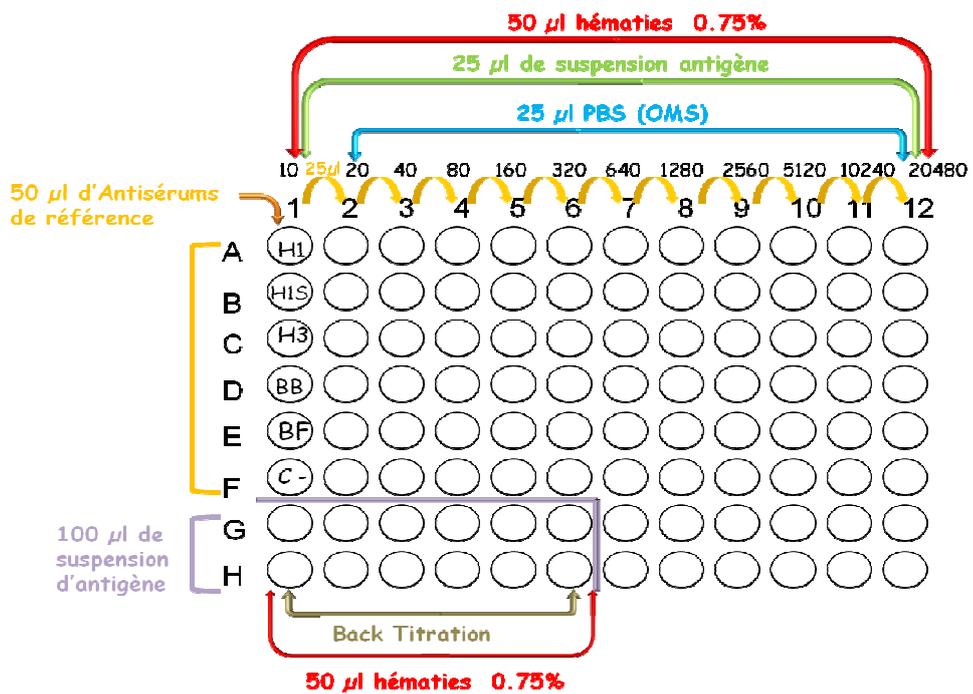


Figure 17 : Schéma représentant le test d'inhibition d'hémagglutination

### Lecture et interprétation des résultats

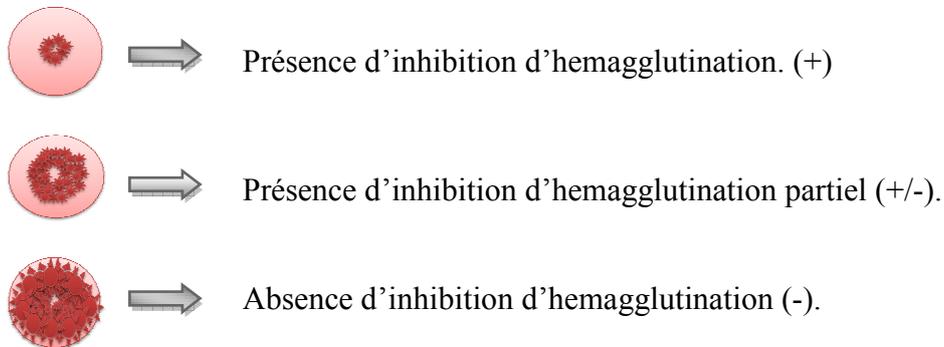
Pour que le test soit valide il ne doit pas y avoir d'hémagglutination dans les puits du test sérum.

Pas d'inhibition d'hémagglutination avec l'antisérum du contrôle négatif.

Le titrage HA de contrôle (back titration) doit indiquer 8 unité pour 50ul (4 unité pour 25ul).

Le titre d'inhibition d'hémagglutination attendu correspond à la plus forte dilution d'antisérum.

Une augmentation de ce titre d'un facteur plus de 40 (>40) est considérée comme un diagnostic positif, et inversement



- Un échantillon est considéré positif si l'hémagglutination est inhibée.
- Un échantillon est considéré négatif si l'hémagglutination n'est pas inhibée.

## II.2- Titrage du virus de la grippe en dilutions limites (Voir annexe 3)

### II.2.1 Principe

Les cellules MDCK sont inoculées avec des dilutions croissantes de suspensions virales. Après détection du virus, on observe pour chaque dilution le nombre de cupules positifs et le nombre de cupules négatives. Ceci permet alors de définir la dose de virus qui infecte la moitié des cupules.

### II.2.2 Méthode

#### A- Préparation de la plaque :

Une nappe confluente de cellules MDCK (Madin-Darby canine kidney) est trypsiné, suivie d'un comptage à la cellule de Naubauer, le nombre de cellules est reporté à  $4,5 \times 10^4$  cellules/cupule, 100  $\mu$ l de cette suspension sont répartis dans chaque puits de la plaque à 96

cupules, les plaques à 96 puits sont incubées dans une étuve à CO<sub>2</sub> réglé à 37°C pendant 24 Heures jusqu'à ce que le tapis soit juste confluent.

### **B- Inoculation des suspensions virales à titrer**

- **Préparation des dilutions des suspensions virales**

Des dilutions des suspensions virales à raison  $\frac{1}{2}$  log<sub>10</sub> sont préparées dans une plaque stérile à fond rond à 96 cupules. On répartit 100 µL de milieu DMEM sans SVF dans la plaque entière à l'exception de colonne 1 puis 146 µL de suspension virale à titrer sont déposées dans la première colonne et à l'aide d'une pipette multicanaux, on prend 46 µL de la première colonne qui sera transférer dans la colonne suivante avec 10 aspirations-refoulements.

Après l'antépénultième colonne, on jette le contenu des cônes. Les deux dernières colonnes serviront de témoin négatif (milieu seul).

- **Inoculation des suspensions virales**

A l'aide d'une pipette pasteur, le milieu de culture est aspiré avec précaution dans tous les puits ces dernier sont par la suite laver deux fois avec 100 µL de PBS.

On lave une dernière fois avec du milieu de culture sans SVF qui restera pour le transport et jusqu'au moment de l'inoculation. Une fois les dilutions de suspensions virales réalisées, le contenu de la plaque 96 puits à fond rond est transféré vers la plaque à 96 puits pour culture cellulaire où les cellules ont été cultivées en respectant le plan de plaque et on incubé à 37°C pendant 60 minutes. Le contenu de chaque cupule est ensuite aspirer et remplacer par 200 ul du milieu DMEM contenant 0,1% TPCK. Les microplaques sont incubées dans une étuve à 35°C et sous 5% de CO<sub>2</sub>.

### **C- Lecture et interprétation**

- Après 3 ou 4 jours, les plaques cellulaires inoculées avec du virus grippal sont lues afin de déterminer si l'effet cytopathogène caractéristique des virus grippaux est positif ou négatif.
- On remplit le formulaire d'enregistrement : titrage du virus de la grippe par la technique de la DICT<sub>50</sub> (Annexe 8)
- le titre de la suspension est déterminé à l'aide de la fiche de calcul titrage DICT<sub>50</sub> (Annexe 9)
- Les résultats de cette technique nous permettent d'obtenir la dilution de virus (titre viral) nécessaire pour entamé l'étude de la sensibilité de la technique de RT- PCR pour le diagnostic du virus de la grippe.

## II.3 Détection de l'ARN viral par RT-PCR en temps réel

### II.3.1 Principe

La PCR utilisée est une méthode qualitative très sensible, c'est-à-dire qu'elle détecte le virus même en très petite quantité dans les suspensions virales.

Il existe divers principes pour la détection des amplicons. La technique PCR utilisée lors de ce travail est basé sur le principe des sondes fluorescentes par la technologie de la sonde d'hydrolyse (TaqMan Assay) (APPLIED BIOSYSTEMS).

La technologie TaqMan est basée sur l'activité 5' exonucléasique de la Taq polymérase pour hydrolyser une sonde fluorescente fixée sur sa cible située à l'intérieur d'un produit PCR amplifié par deux amorces. (Figure 18)

Cette sonde contient un fluorochrome émetteur (reporter) (ex.FAM) à son extrémité 5' dont l'émission est quenchée (absorbée) par un second (quencher ou accepteur) (ex.ROX) situé à l'extrémité 3' et émise sous forme de chaleur. L'activité exonucléasique de la Taq est double-brin spécifique. Si l'amplicon est correctement amplifié (élongation), la sonde TaqMan va s'hybrider sur sa cible après l'étape de dénaturation. Lorsque la Taq rencontre sur son passage la sonde hybridée, son activité exonucléasique va déplacer la sonde et la dégrader, ce qui entraîne la séparation des deux fluo et donc une augmentation de la fluorescence du rapporteur à chaque cycle proportionnellement au taux d'hydrolyse de la sonde. (Figure 18).

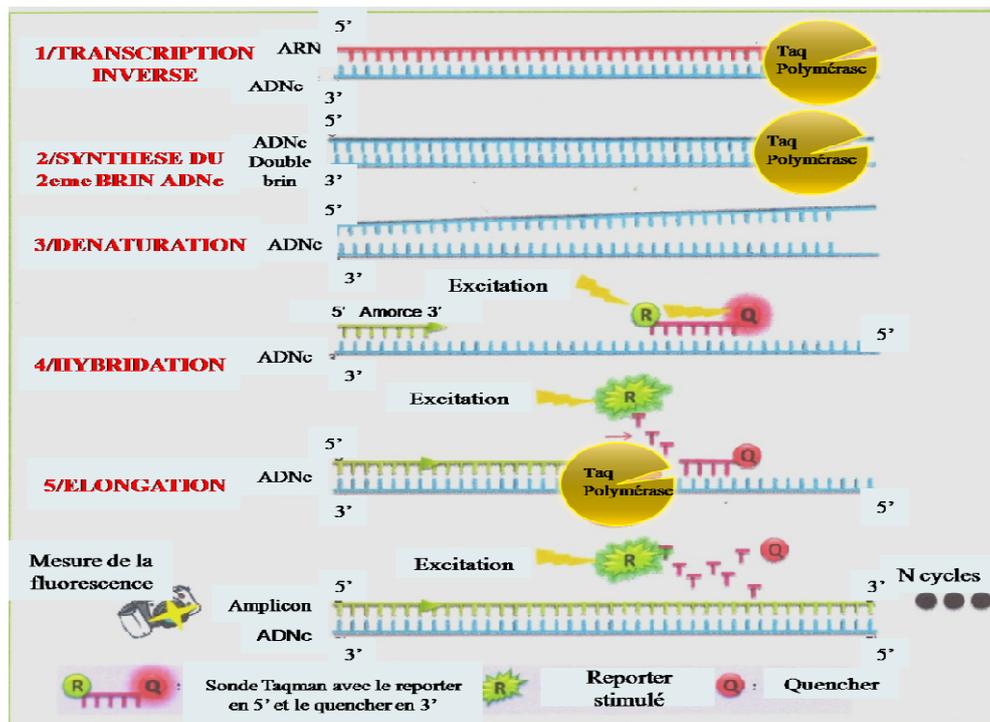


Figure 18 : Principe de la sonde d'hydrolyse ou sonde TaqMan

### II.3.2 Méthode (Annexe 4)

#### ❖ Extraction de l'ARNv:

Après l'étape de lyse cellulaire, l'ARN viral est capturé sur une membrane à base de gel de Silice. Le lavage suivi d'une étape d'élution va assurer la purification d'un ARN exempt de contaminants (RNases, ADN génomique, protéines) et/ou d'inhibiteur de l'amplification des acides nucléiques.

#### 1- Etape de lyse :

560 µl de tampon de lyse AVL/ARN carrier sont déposés dans chaque tube Eppendorf stérile de 1,5 ml, on ajoute 140 µl d'échantillon dans chaque tube Eppendorf correspondant. Ces derniers sont vortexés pendant 15 sec puis incubés 10 mn à température ambiante (15-25) °C. On centrifuge brièvement pour récupérer les gouttelettes accumulées dans le capuchon

#### 2- Etape de fixation :

560 µl d'éthanol (100 %) sont ajoutées à l'échantillon. On mélange vigoureusement (15 sec au vortex) puis on centrifuge brièvement le tube Eppendorf. 630 µl de la solution sont déposés dans la colonne QIAamp puis centrifugés 1 mn à 8000 rpm et transférés dans un autre tube collecteur

#### 3- Etape de lavage :

On ouvre la colonne QIAamp avec précaution et on ajoute 500 µl de tampon de lavage AW1. La colonne est centrifugée 1 mn à 8000 rpm puis transférée dans un tube collecteur propre. On refait la même opération avec 500 µl de tampon de lavage AW2 : centrifugation pendant 3mn à vitesse maximale.

La colonne QIAamp est transférée dans un nouveau tube collecteur puis centrifugée 1mn à 8000 rpm.

#### 4- Etape d'élution :

La colonne QIAamp est transférée dans un tube Eppendorf stérile (1,5ml). On ouvre la colonne avec précaution et on dépose au centre 60µl de tampon d'élution (AVE) puis on incubé 5mn à température ambiante (15-25) °C. La colonne est centrifugée 1 mn à 8000 rpm. L'éluat (ARNv) est conservé au congélateur -80°C.

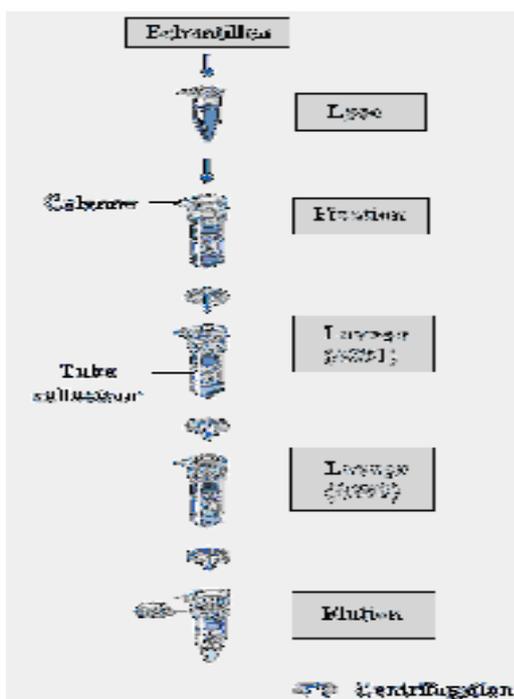


Figure 19 : Les étapes de l'extraction

**A- Détection des sous type du virus de la grippe (type A) par PCR en temps réel**

• **Méthode**

**a-Préparation du mélange réactionnel : (Salle PCR Mix)**

On détermine le nombre de réactions : N

N est le Nombre d'échantillons+contrôles

- Contrôles :** Contrôles négatifs (eau)  
 Contrôle positif Grippe saisonnière

Le mélange réactionnel est préparé comme indiqué dans le tableau II :

Réactifs	Invitrogen (N=1)
Eau stérile	5 µl
ROX (d=1/10)*	0,5 µl
Amorce (sens) *	0,5 µl
Amorce (anti-sens)*	0,5 µl
Sonde *	0,5 µl
Enzyme **	0,5 µl
2xPCR Master Mix *	12,5µl

Tableau II : Préparation du mélange réactionnel PCR

Le mélange réactionnel est centrifugé pendant 5 seconds puis le placer immédiatement sur le portoir réfrigérant. La plaque à 96 puits est placée sur le portoir réfrigérant et à l'aide d'une pipette on remplit les puits avec 20µl du mélange réactionnel. (Tableau III) sans oublier de pipeter 05µl d'eau dans les puits NTC. (Tableau IV).

**Plaque PCR**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	H3											
B		H3										
C		H3										
D		H3										
E		H3										
F		H3										
G		H3										
H	H3											

**Tableau III** : Exemple de configuration du test

**b-Dépôt des échantillons : (Salle Extraction)**

Les tubes contenant les extraits d'ARN<sub>v</sub> sont vortexés, centrifugés puis placés sur le portoir réfrigérant. 05 ul du contrôle négatif sont déposés dans la première colonne de la plaque échantillon en position H. 05µl d'échantillon sont déposés dans chaque puits de la plaque échantillon et 05µl du contrôle positif sont déposés dans le dernier puits de la plaque échantillon. La plaque est ensuite centrifugée pendant 30 sec (500 xg / +4°C)

**Plaque échantillon**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NTC	E2	E4	E6	E8	E10	E12	E14	E16			
B		F2	F4	F6	F8	F10	F12	F14	F16			
C		E2	E4	E6	E8	E10	E12	E14	E16			
D		E2	E4	E6	E8	E10	E12	E14	E16			
E		E3	E5	E7	E9	E11	E13	E15	E17			
F		E3	E5	E7	E9	E11	E13	E15	E17			
G		F3	F5	F7	F9	F11	F13	F15	F17			
H	C-	E3	E5	E7	E9	E11	E13	E15	E17			C-

**Tableau IV** : Exemple de la répartition des échantillons

**c- Lancement de la réaction :(Salle Amplification)**

La plaque est placée dans l'automate (Figure 20), ce dernier est programmé selon le tableau V



**Figure 20** : Thermocycleur Applied Biosystems

	<b>Invitrogen (N=1)</b>
<b>Reverse transcription</b>	30mn-50°C
<b>Taq inhibitor inactivation</b>	2mn -95°C
<b>PCR amplification (45cycles)</b>	15 sec-95°C 30sec-55°C

**Tableau V** : Programmation de l'automate Applied Biosystems

**d- Interprétation des résultats**

- Validation de la série :**

Pour qu'une série soit validée, les conditions du tableau ci-dessous doivent être remplies :

	<b>A/H3</b>
<b>Contrôle positif</b>	(+)
<b>Contrôle négatif :</b>	
NTC	(-)
Échantillon Grippe négative	(-)

(+) : fluorescence détectée,

H3 ⇒ le Ct doit être compris dans l'intervalle [20,30]

(-) : fluorescence non détectée, le Ct est non déterminé

**CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION****III.1 RESULTAS****III.1.1 Caractéristique épidémiologiques de la population étudiée**

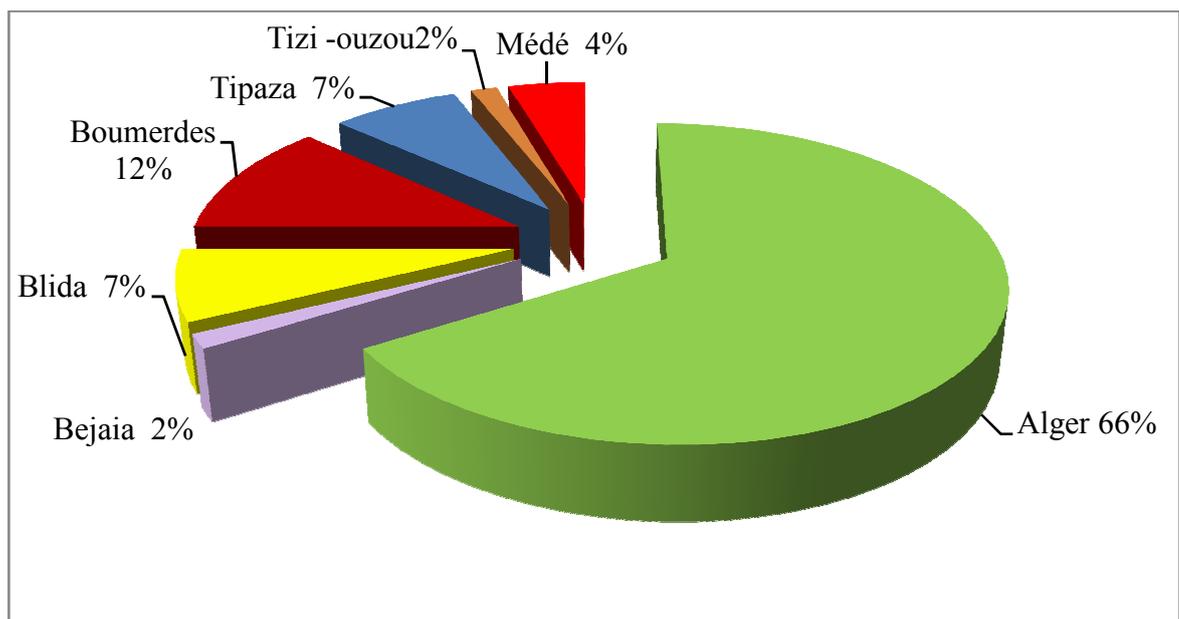
Un total de 68 souches virales A/H3N2 a été testé. Ces souches ont été isolées au CNR Grippe de l'Institut Pasteur d'Algérie, durant la période allant de 2009 au Avril 2016.

Les renseignements relevés sur ces malades, rapportés dans le tableau 7 (Annexe 5) ont été analysés par des méthodes statistiques descriptives.

**■ Origine géographique du virus influenza isolé**

Parmi les 68 patients révélés porteurs de virus A (H3N2) nous pouvons noter que :

- Plus de 2/3 des patients ( $45/68= 66,66\%$ ) proviennent de la région centre (Alger) (Figure 21).



**Figure 21** : Répartition des cas autochtones par wilaya

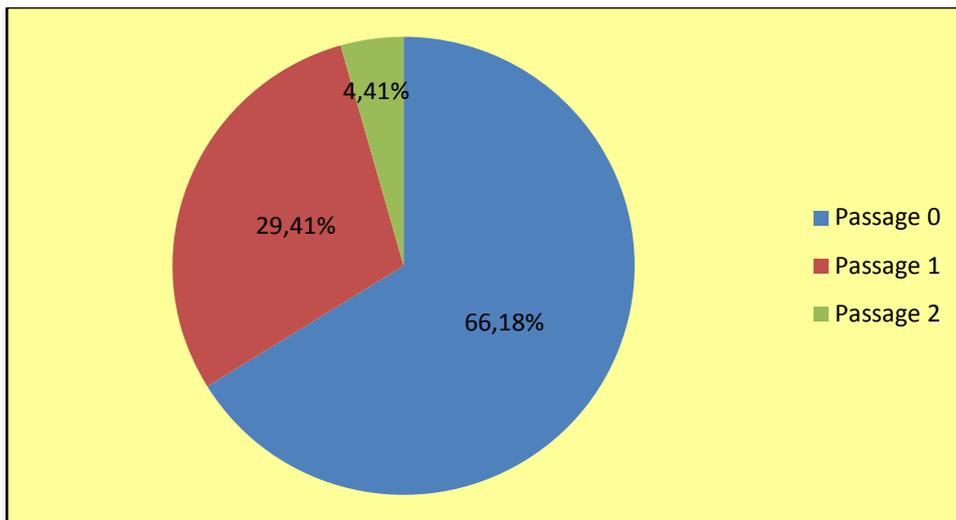
**III.1.2 Résultats de la technique du titrage du virus de la grippe en dilutions limites**

Cette technique permet de déterminer la dose du virus de la grippe qui infecte 50% des cellules en culture. Après comptage du nombre de puits positifs et le nombre de puits négatifs de chaque dilution, les résultats sont reportés dans un fichier Excel, ce dernier permet de calculer le titre du virus qui infecte 50% des cellules en culture (Annexe 9).

- **Détermination de la DICT<sub>50</sub>**

Les valeurs des DICT<sub>50</sub> obtenues par le fichier Excel pour les 68 souches isolées au LGVR-IPA sont analysées par une méthode statistique en calculant la moyenne, l'écart type...etc. (Annexe 6).

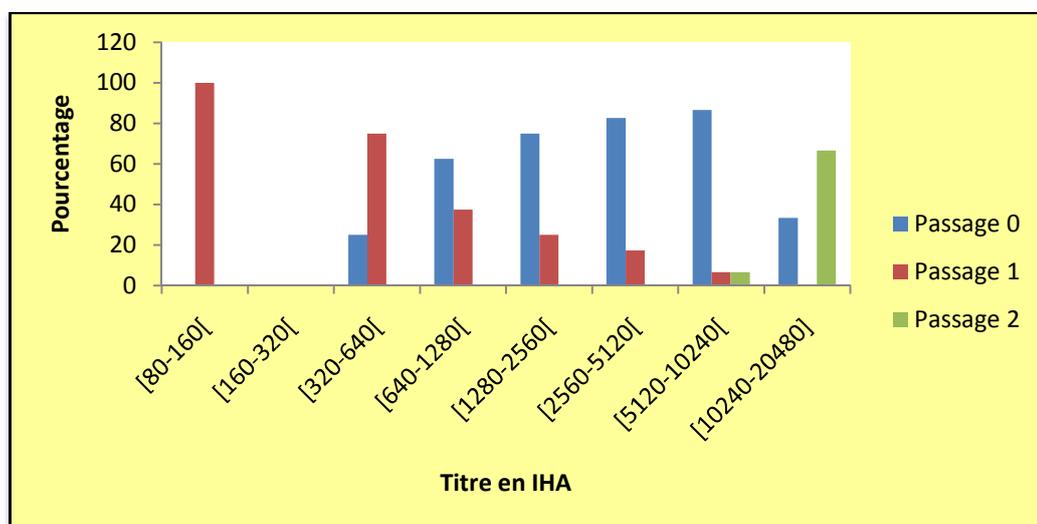
- **Répartition des souches selon le nombre de passage**



**Figure 22** : Répartition des souches selon le nombre de passage

- Plus de 2/3 des souches A/H3N2 ( $45/68 = 66,18\%$ ) ont été isolées lors du premier passage sur cellules MDCK (Passage 0) (Figure 22).

- **Répartition des IHA selon le nombre de passage**

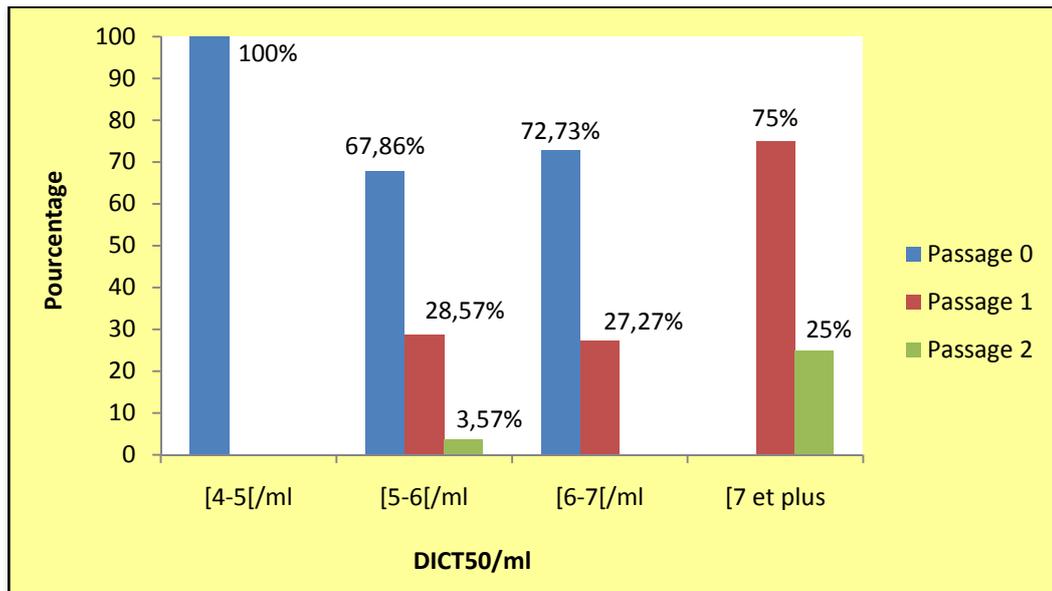


**Figure 23** : Répartition des IHA selon le nombre de passage

Il existe une différence significative entre les passages pour les titres en IHA suivante [80-160[ $p=0.0011$ , [1280-2560[  $p=0.029$ , [2560-5120[  $p=3.92 \cdot 10^{-7}$ , [5120-10240[  $p=3.16 \cdot 10^{-5}$ , donc il y'a un lien entre le titre en IHA et le nombre de passage cellulaire.

Pour les IHA [320-640[  $p=0.32$ , [640-1280 [  $p=0.1$ , [10240-20480[ $p=0.77$ , donc il n' y'a pas un lien entre le titre en IHA et le nombre de passage cellulaire.

- **Répartition des  $DICT_{50}$  selon le nombre de passage**



**Figure 24** : Répartition des  $DICT_{50}$  selon le nombre de passage

L'étude statistique (test de Fisher) montre que pour les concentrations [4-5/ml et plus de 7ml respectivement le résultat de la p-valeur et le suivant 0.000031 et 0.029 au seul d'erreur  $\alpha = 5\%$ .

Test de chi2 pour les concentrations [5-6/ ml et [6-7]/ml respectivement le résultat de la p-valeur et le suivant 0.000036 et 0.000046 au seul d'erreur  $\alpha = 5\%$ . (Annexe 6).

Donc il y'a un lien entre la  $DICT_{50}$  et le nombre de passage cellulaire.

• Répartition des DICT50 selon IHA

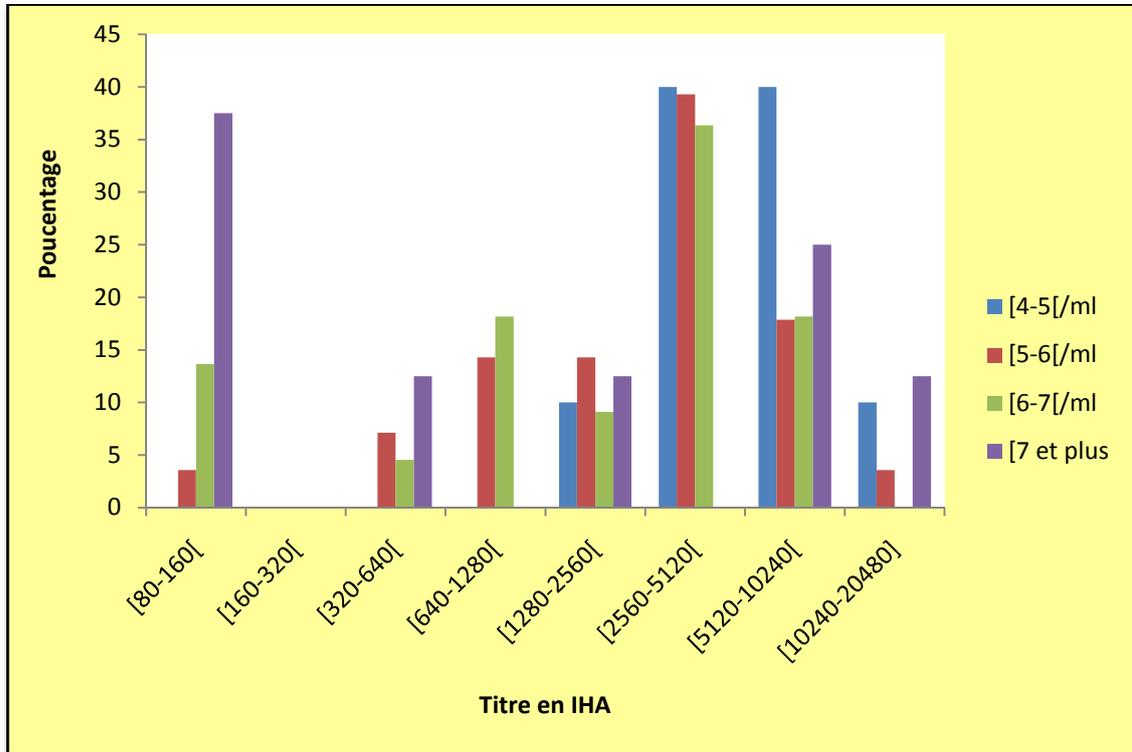


Figure 25 : Répartition des DICT50 selon IHA

L'étude statistique (test de Fisher) montre que pour les concentrations [4-5]/ml ( $p=0.011$ ), [5-6]/ml ( $p=0.0009$ ) et [6-7]/ml ( $p=0.0071$ ) et [7 et plus]/ml ( $p=0.043$ ), Il existe une différence significative entre les IHA et la DICT50 au seul d'erreur  $\alpha = 5\%$ , donc il y'a un lien entre le titre en DICT50 et le titre en IHA.

III.1.3 Résultats de la technique RT- PCR/DICT<sub>50</sub>

- Détermination du nombre de puits positifs et négatifs en fonction des titres en DICT<sub>50</sub>/ml

Titre en log10 (DICT50/ml)	Puits infectés	Puits non infectés
(4.6-5.2)	80	82
(5.2-5.8)	116	106
(5.8-6.4)	94	59
(6.4-7.0)	52	28
(7.0-7.6)	45	16
(7.6-8.2)	17	3

Tableau VI : Représentation du nombre de puits positif (Présence d'ECP) et négatif (Absence d'ECP) en fonction du titre en DICT<sub>50</sub>

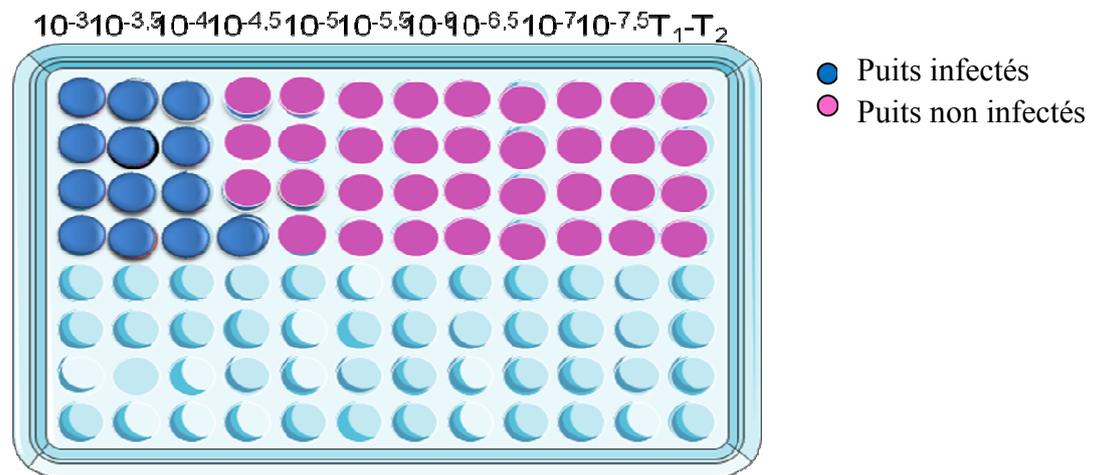


Figure 26 : lecture de la plaque du titrage (Titre en DICT50/ml=10<sup>5,42</sup>)

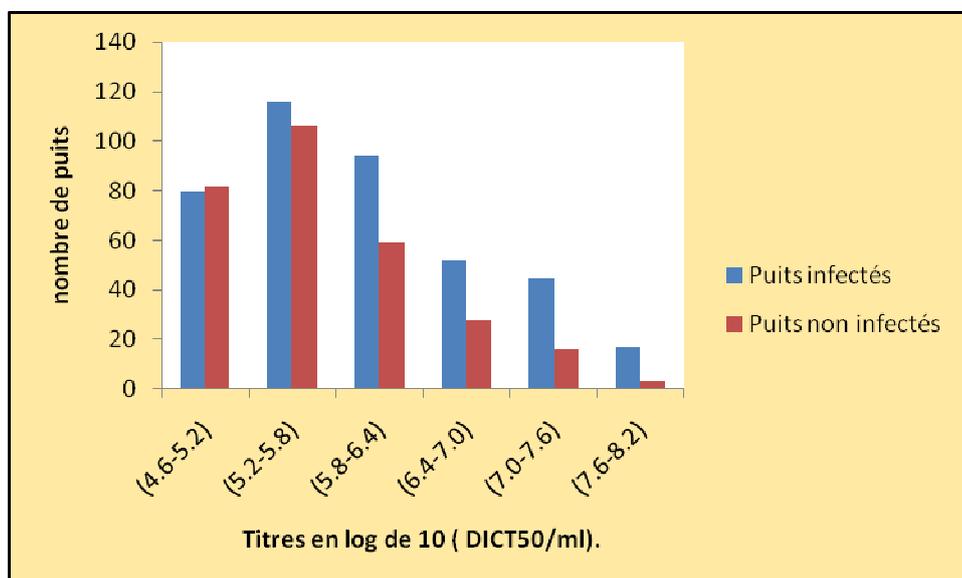


Figure 27 : Représentation de nombre de puits infectés et non infectés

Cette étude est réalisée pour quantifier le titre de virus infectieux en DICT50/ml qui se trouve dans une suspension cellulaire.

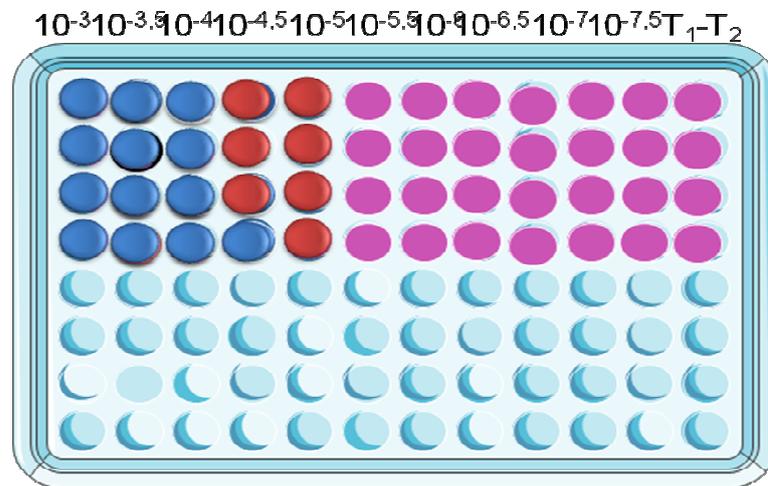
Les résultats sont lus par microscope photonique inversé, en évaluant le nombre de puits Positifs (présence ECP) et les puits négatifs (absence ECP) pour chaque dilution, par exemple pour une dilution de 1/1000 on a trouvé un titre de DICT50=  $10^{5,42}$  pour le prélèvement G366/13.

D’après les résultats de la figure 20, le nombre des puits positifs (Présence d’ECP) augmente en fonction de la charge virale.

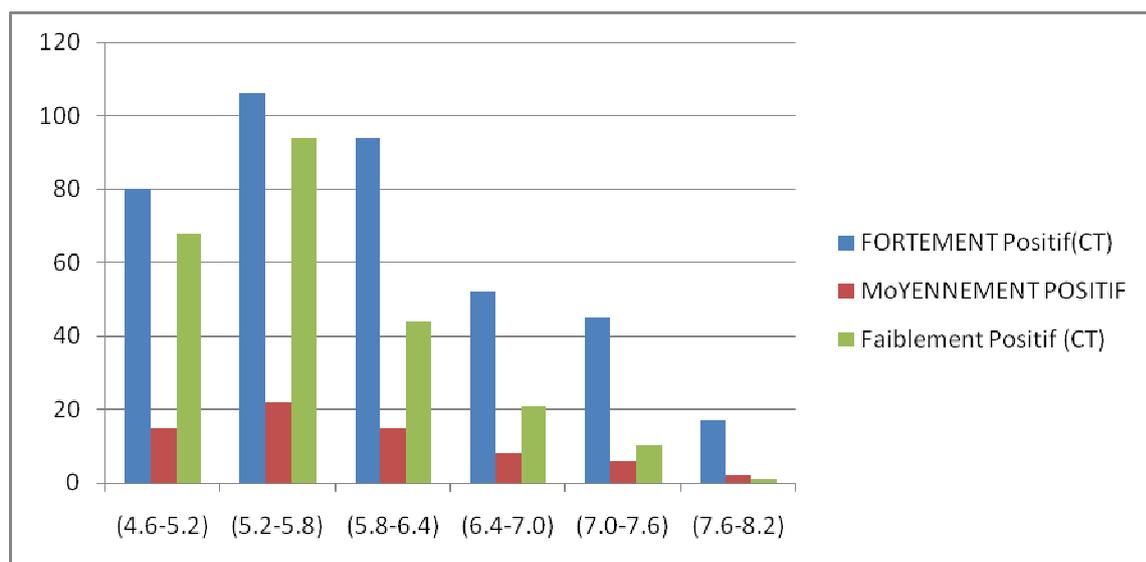
• **Comparaison entre les valeurs de Ct et les titres en DICT<sub>50</sub>**

Titre DICT50/ml et RT-PCR	Fortement Positif(CT)	Moyennement Positif	Faiblement Positif (CT)
(4.6-5.2)	80	15	68
(5.2-5.8)	106	22	94
(5.8-6.4)	94	15	44
(6.4-7.0)	52	8	21
(7.0-7.6)	45	6	10
(7.6-8.2)	17	2	1

**Tableau VII** : Répartition du nombre de copie du génome par RT-PCR



**Figure 28** : Représentation schématique des puits positifs et négatifs en Ct



**Figure 29 :** Représentation des valeurs Ct des puits positifs (Présence d’ECP) et les puits négatifs (Absence d’ECP).

Les suspicions virale ont été récolté après 4 jours d’incubation et analysé par RT-PCR en temps réel.

La charge Virale a été mesurée pour chaque dilution et exprimée en nombre de copies (Ct) d’équivalent génome.

D’après les résultats de notre étude on a observé que les puits positif par la technique du titrage donnent des valeurs en Ct fortement positifs par RT PCR (entre 8 jusqu’à 15 cycles) et les premiers puits négatif présentent une charge virale moyennement positive (entre 20 à 30 cycles), alors que le reste des puits négatifs présentent une charge virale faiblement positive (entre 30 à 34 cycles).

Exemple : titre DICT50 = 10 <sup>5,42</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-3,5</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4,5</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-5,5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-6,5</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-7,5</sup>
nombre de cycle par RT-PCR	9,173	9,173	9,173	9,173	25,168	30,1488	30,0755	33,9366	32,1831	31,0773
Les puits positifs et négatifs	Positif	positif	positif	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif

**Tableau VIII :** Valeurs de Ct des puits infectés et non infectés

A titre d’exemple :

Pour le titre en DICT50/ml=10<sup>5,42</sup>, le nombre des puits positifs en microscope photonique présentent des valeurs en Ct fortement positif jusqu’a la dilution 10<sup>-4,5</sup> et les premiers puits négatif (Absence d’ECP) présentent des valeurs en Ct moyennement positifs jusqu’a la dilution 10<sup>-5</sup>. Au de la de la dilution 10<sup>-5,5</sup> jusqu’à 10<sup>-7,5</sup> les valeurs en Ct deviennent faiblement positifs.

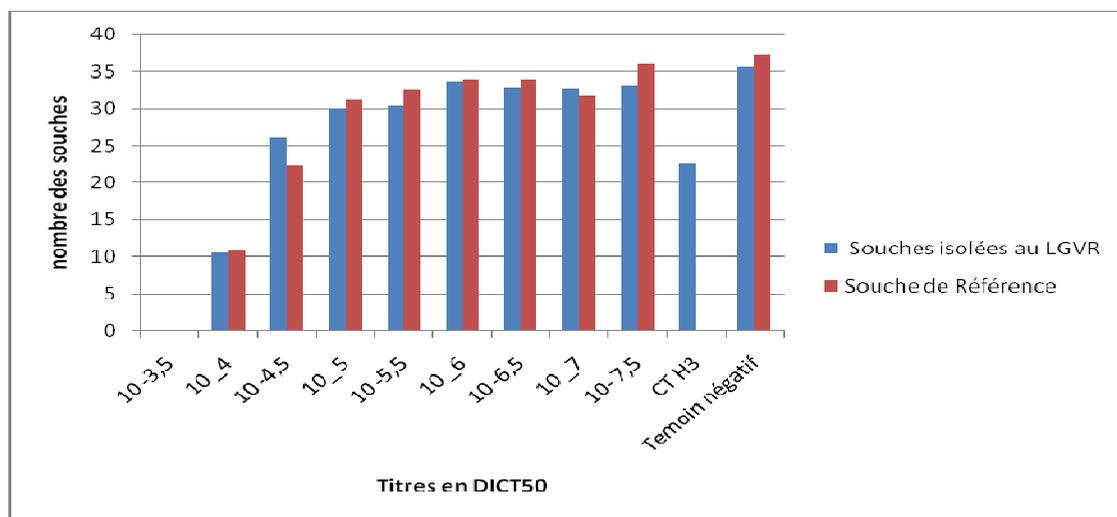
• Etude statistique des résultats :

Titre en log 10(DICT50/ml)	$10^{-3,5}$	$10^{-4}$	$10^{-4,5}$	$10^{-5}$	$10^{-5,5}$	$10^{-6}$	$10^{-6,5}$	$10^{-7}$	$10^{-7,5}$	Ct H3 des pvts	Ct du témoin négatif
4,4(SR)		10,7459	22,239	31,228	32,451	33,992	33,921	31,717	36		37,33
4,875	8,97	17,47	27,159	30,748	31,28	30,582	29,808	29,02	32,488	26,25	35,09
5,172		10,476	26,067	29,907	30,311	33,602	32,7692	32,643	33,019	22,505	35,615
5,45			11,354	27,619	28,2858	31,264	32,322	32,123	32,461	23,91	35,501
6,028				11,419	21,428	29,679	30,302	32,231	33,377	22,588	35,65
6,24					13,962	25,991	29,136	30,931	32,516	26,684	35,386
6,14						11,260	27,750	28,147	32,313	22,8	35,729
6,631							14,107	30,45	31,742	26,86	36,218
7,75								10,693	28,891	22,355	38,46

**Tableau IX :** Représentation des valeurs moyennes de Ct des différentes dilutions en fonction des titres en DICT50/ml.

Le tableau IX représente les valeurs moyennes en Ct des différentes dilutions des souches et les valeurs moyennes en Ct des prélèvements ainsi que leurs témoins négatifs.

Afin d’analyser les résultats obtenus de nos souches algériennes isolés au LGVR-IPA nous avons comparé leurs valeurs de Ct avec celle de la souche de référence (IPP).



**Figure 30 :** Répartition des valeurs moyennes en Ct des différentes dilutions correspondant au titre  $10^{5,17}$  DICT50/ml

Selon la figure 30, la valeur moyenne des titres en DICT50/ml qui correspond à la dilution  $10^{-4}$  donne une valeur de  $10^{5,17}$  DICT50/ml.

La valeur moyenne du Ct du prélèvement (Ct=22,505) se situe entre la dernière dilution positive (présence d’ECP) (Ct=10,476) et la première dilution négative (Absence d’ECP) (Ct=26,067). Même principe pour les autres souches, se qui nous amène a conclure que les valeurs de Ct des

prélèvements se situe entre la dernière dilution positive (présence d'ECP) et la première dilution négative quelque soit le titre en DICT<sub>50</sub>/ml.

Variable : DICT <sub>50</sub>					
Paramètres estimés					
Variable	Degré de liberté (DDL)	Résultats estimé des paramètres	Erreur type	Valeur du test t	Pr >  t
Intercept	1	6.05368	1.34610	4.50	0.0001
Dilution	1	0.06880	00.19374	0.36	0.7254

L'étude statistique, montre qu'il n'ya pas de corrélation entre les valeurs de Ct des différentes dilutions et les titres en DICT<sub>50</sub> (p valeurs= 0.7254) au risque 5%.

### III.2 DISCUSSION

Le présent travail a porté sur l'étude de la sensibilité cellulaire  $DICT_{50}$  dans la validation de la méthode RT-PCR en temps réel, qui est la méthode de référence en situation épidémique ou pandémique. (*Leruez-ville, 2006*)

Cette étude est la première à être réalisée en Algérie, nous avons réalisé ce travail sur des souches A/H3N2 du fait de leurs fréquentes modifications antigéniques. Pour cela deux techniques ont été appliquées : une sur culture cellulaire par détermination des  $DICT_{50}$  et une autre technique de biologie moléculaire (RT-PCR) par la détermination du nombre de cycle virale (Ct).

La population ciblée était des malades, chez qui le virus A/H3N2 a été isolé au LGVR-IPA durant la période allant de 2009 jusqu'Avril 2016.

Par analyse statistique des données épidémiologiques de cette population, nous avons noté que parmi les 68 patients révélés porteurs de virus A (H3N2) nous pouvons noter que plus de 2/3 des patients ( $45/68 = 66,66\%$ ) proviennent de la région d'Alger.

Plus des 2/3 des souches A/H3N2 ( $45/68 = 66,18\%$ ) ont été isolées lors du premier passage sur cellules MDCK (Passage 0) ce qui nous amène à conclure que les cellules MDCK utilisées lors de l'isolement de ces souches ont une bonne sensibilité au virus de la grippe.

Il existe une différence significative entre les passages pour les titres en IHA suivante [80-160] [ $p=0.0011$ ], [1280-2560] [ $p=0.029$ ], [2560-5120] [ $p=3.92 \cdot 10^{-7}$ ], [5120-10240] [ $p=3.16 \cdot 10^{-5}$ ], donc il y'a un lien entre le titre en IHA et le nombre de passage cellulaire. Plus le nombre de passage augmente, plus la quantité d'antigènes augmente et plus on aura un titre en IHA élevé.

L'étude statistique (test de Fisher) montre que pour les concentrations [4-5/ml et plus de 7ml respectivement le résultat de la p-valeur et le suivant 0.000031 et 0.029 au seuil d'erreur  $\alpha = 5\%$ .

Test de  $\chi^2$  pour les concentrations [5-6]/ ml et [6-7]/ml respectivement le résultat de la p-valeur et le suivant 0.000036 et 0.000046 au seuil d'erreur  $\alpha = 5\%$ . Donc il y'a un lien entre la  $DICT_{50}$  et le nombre de passage cellulaire. Ce qui nous amène à conclure que la multiplication virale est proportionnelle au nombre de passage sur cellule.

L'étude statistique (test de Fisher) montre que pour les concentrations [4-5]/ml ( $p=0.011$ ), [5-6]/ml ( $p=0.0009$ ) et [6-7]/ml ( $p=0.0071$ ) et [7et plus/ml ( $p=0.043$ ), Il existe une différence significative entre les titres en IHA et le titre en  $DICT_{50}$  au seuil d'erreur  $\alpha = 5\%$ , donc il y'a un lien entre le titre en  $DICT_{50}$  et le titre en IHA. Plus il y'a multiplication virale, plus la quantité d'antigène augmente, et plus le titre en IHA est élevé.

L'étude statistique des trois paramètres (Passage cellulaire, DICT50, IHA) nous amène à conclure que le succès d'un isolement viral dépend de la qualité du prélèvement, des cellules utilisées et du titre infectieux du prélèvement.

Cette étude est réalisée pour quantifier le titre de virus infectieux en DICT50/ml qui se trouve dans une suspension cellulaire.

Les résultats sont lus par microscope photonique inversé, en évaluant le nombre de puits Positifs (présence ECP) et les puits négatifs (absence ECP) pour chaque dilution.

La charge Virale a été mesurée pour chaque dilution et exprimée en nombre de copies (Ct) d'équivalent génome.

D'après les résultats de notre étude on a observé que les puits positif par la technique du titrage donnent des valeurs en Ct fortement positifs par RT PCR (entre 8 jusqu'à 15 cycles) et les premiers puits négatifs présentent une charge virale moyennement positive (entre 20 à 30 cycles), alors que le reste des puits négatifs présentent une charge virale faiblement positive (entre 30 à 34 cycles), Ces résultats confirment que la technique RT-PCR est plus sensible que la technique du titrage en DICT<sub>50</sub>.

La PCR n'est représentée que par la concentration seuil, le titre dépend du passage viral ce qui est normal puisque le virus doit être vivant contrairement à la PCR qui peut amplifier des ARN de virus morts et donc n'est pas fidèles

L'étude statistique, montre qu'il n'y a pas de corrélation entre les valeurs de Ct des différentes dilutions et les titres en DICT<sub>50</sub> (p valeurs= 0.7254) au risque 5%. Ceci peut être expliqué du faite que la majorité des souches utilisées pour la réalisation de ce travail présentent une charge virale importante (valeur de Ct fortement positif), et les dilutions très rapprochées (1/2 log 10) lors du titrage du virus de la grippe par la technique DICT50.

## CONCLUSION

Cette étude qui porte sur la détermination du seuil de détection d'une méthode moléculaire RT-PCR par l'analyse virale directe (Titration du virus de la grippe en dilutions limites DICT<sub>50</sub>) est une première en Algérie concernant La capacité de déterminer rapidement et à haute précision les titres viraux est l'un des outils les plus importants souhaités lorsque on travaille avec des virus dans un laboratoire de recherche.

La PCR en temps réel est plus sensible que les techniques basées sur la culture cellulaire pour la détection des virus dans des échantillons cliniques.

Il était donc intéressant d'examiner si la technologie PCR en temps réel peut aussi être un outil important pour l'estimation rapide et efficace des équivalents de titre viral, exprimé en valeurs de Ct enregistrées. Les titres sont déterminés à l'aide des dilutions en point finale (DICT<sub>50</sub>), méthode qui prend du temps et du travail intense.

Le but majeur de notre étude était de mettre au point une technique fiable pour la validation de RT-PCR en temps réel qui est la méthode de référence pour le diagnostic du virus de la grippe.

Nous pouvons dire qu'une partie de l'objectif est atteint par cette étude qui permettra de réaliser d'autres études sur une population d'étude présentant une charge virale faible et en utilisant des dilutions de 10 en 10 lors du titrage de virus de la grippe par la technique DICT<sub>50</sub>.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Ameziane N. Bogard M. Lamoril J (2005). Principes de biologie moléculaire en biologie clinique. Page 232-308.
- [2] Anonyme. Fundamental Techniques in cell Culture. Laboratory Handbook, 2<sup>nd</sup> Edition
- [3] Bouscambert- Duchamp M. (2010). Etude du réassortiment génétique des virus influenza d'origine et de sous types différents. Thèse Ecole Doctorale E2M2, Evolution, écosystème, microbiologie, modélisation. Université Claude Bernard – Lyon 1. Réf.00733681, version 1. Pages 23-27.
- [4] Buisson Y. Nicand E ; Saliou P. (2008). La grippe en face. Pages 122-124.
- [5] CANAVAGGIO P. (2011).THESE DE DOCTORAT. Profil clinique d'une cohorte de patients ayant bénéficié d'une recherche de virus A(H1N1) 2009 au SAU d'un hôpital référent au cours de la pandémie 2009. PARIS 7- UNIVERSITÉ PARIS DIDEROT. Pages 8-14.
- [6] Cavé H. (2003).La RT-PCR en diagnostic clinique. *Ann Biol Clin* 2003, 61: 635-4.
- [7] CDC (2007).Real time RT PCR (rRT PCR) Protocol for Detection and Caractérisation of Influenza.
- [8] ESSERE B. (2011). Etude des mécanismes moléculaires gouvernant le réassortiment génétique des virus Influenza de type A. Thèse Ecole Doctorale : Evolution, écosystème, microbiologie, modélisation. Université Claude Bernard – Lyon 1. Réf.2011LYO10119. Pages 22-50.
- [9] Huraux J.M., Nicolas J.C., Agut H., Peigue-Lafeuille H. (2003), Traité de Virologie Médicale. Pages 439- 456.
- [10] Influenza Reagent Influenza anti A/Wyoming/03/03 Serum NIBSC code: 03/212 Instructions for use (Version 3.0, Dated 07/03/2008). National Institute for Biological Standards and Control.
- [11] Joanna S. E, Maria C. Zambon (2002). Molecular diagnosis of influenza. *Rev. Med. Virol.* 2002; 12: 375–389.
- [12] Kilbourne E.D. (1987). Influenza. Première édition, pages 126-130.
- [13] Lamoril J. (2006). Biologie moléculaire et microbiologie clinique en 2007. Généralités - Partie 1. Pages 5-18.
- [14] Lamoril J. (2006). Biologie moléculaire et microbiologie clinique (2007). Les applications et leur avenir – Partie 2. Pages: 73-94.
- [15] Lansing M. Prescott,John P. Harley,Donald A. Klein (2002). Microbiologie. 2<sup>ème</sup> édition. Pages 367-368.
- [16] Leruez-ville L., (2006). Diagnostic virologique des infections respiratoires. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique*, 46 :538-542.
- [17] Manuguerra J.C. Hannoun C. (1999). Grippe et autres viroses respiratoires : surveillance et diagnostic de laboratoire. Méthodes de laboratoire – Institut Pasteur de France.

- [18] Manuel d'utilisation de l'automate Applied Biosystems 7300/7500/7500 Fast Real time PCR system. Part number 4347825 Rev.E 07/2006.
- [19] Marie-Anne R. (2008). THESE DE DOCTORAT :Neuraminidase des virus influenza A: Sensibilité aux antiviraux et interaction avec *neisseria meningitidis*. PARIS VII - UNIVERSITÉ PARIS DIDEROT.
- [20] Mark A. Valasek, Joyce J. Repa (2005). The power of real-time PCR. *Advan in Physiol Edu* 29:151-159.
- [21] NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer. V1.0 User Manual. 2009.
- [22] Nucleic Acid (2010). Thermo scientific NanoDrop spectrophotometers.
- [23] OMS (1980). Manuel de techniques de laboratoire pour le diagnostic rapide des infections virales.
- [24] PICARD C. THESE DE DOCTORAT : Virus influenza A réassortants porteurs de neuraminidase du groupe 1 (N1-N4-N5-N8) : impact de la mutation H275Y sur le fitness viral et la résistance aux antiviraux. Lyon 1: UNIVERSITE CLAUDE BERNARD, 2014. Page 1-22
- [25] Palese P, Kingsbury D.W. (1983). Genetics of Influenza Viruses.
- [26] Payment P. Trudel M. (1989). Manuel des techniques virologiques. Institut Armand-Frappier Université du Québec. Page 21-44.
- [27] Poitras E., Houde A., (2002). La PCR en temps réel: Principe et applications. *Review in biology and Biotechnology*, 2(2): 2-11.
- [28] QIAamp<sup>®</sup>Viral RNA Mini Handbook (2005). Second Edition.
- [29] Richard W. Compans ; Michael B. A. Oldstone (2014). Influenza Pathogenesis and Control - Volume I. Springer International Publishing Switzerland.
- [30] SALAZ N. (2013). Contribution à l'étude séroépidémiologique de la grippe. Thèse Ecole Doctorale à l'université de MARSEILLE. Pages 19-51.
- [31] SuperScript<sup>®</sup> III Platinum<sup>®</sup> One- Step Quantitative RT-PCR system. Invitrogen.
- [32] Spackman E. (2014). Animal Influenza Virus, Exotic and Emerging Avian Viral Diseases Unit, Southeast Poultry Research Laboratory, US Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Athens, GA, USA, Second Edition.
- [33] Tse C ; Capeau J. Quantification des acides nucléiques par PCR quantitative en temps réel. *Ann Biol Clin* 2003, 61: 279-93.
- [34] WHO (2011).Manual for laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza.
- [35] World Health Organization. (2004). Polio laboratory manual. Geneva, Switzerland, 4<sup>th</sup> edition, Pages 73-78.

**[36]** World Health Organization. (2015). Protocole pour la surveillance sentinelle de la grippe au niveau national. Programme de surveillance intégrée des maladies. Groupe organique chargé de la sécurité et des urgences sanitaires. Bureau régional de l'Afrique. Pages: 43-46.

**[37]** WHO INFLUENZA REAGENT KIT FOR IDENTIFICATION OF INFLUENZA ISOLATES.

**[38]** WHO information for molecular diagnosis of influenza virus (OMS 2014).

**[39]** WHO International Laboratory for Biological Standards, UK Official Medicines Control Laboratory.

**[40]** WHO. (2005). Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance. Page 51-52.

**[41]** Yoshihiro Kawaoka ; Gabriele Neumann (2012). Influenza Virus: Methods and Protocols. Influenza Research Institute, Department of Pathobiological Sciences, School of Veterinary Medicine, University of Wisconsin–Madison, Madison, WI, USA. Page 39-41.

---

## Annexes

### Annexe 1 : Isolement des virus grippaux sur cellules MDCK en culture

- **Réactifs et matériel**

- Flacon de T-25 contenant une nappe confluyente des cellules MDCK (Madin Darby Canine Kidney) 75-80%
- Prélèvements naso-pharyngés
- PBS (A) (phosphate buffer saline) stérile, PH : 7,2 sans  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$
- DMEM (Milieu minimum d'Eagle modifié par Dulbecco 1X) sans sérum de veau fœtal
- Pénicilline (10.000U/ml) +streptomycine (10mg/ml)
- Gentamicine à 50mg/ml
- TPCK-trypsine (L-1Tosylamide-2Phénylethyl Chlorométhyle Ketone) diluée à 2mg/ml
- Pipettes (1ml-5ml-10ml) à usage unique
- Flacons 25cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup>
- Hotte à flux laminaire
- Centrifugeuse tube réfrigérée
- Congélateur réglé à -80 °C
- Congélateur réglé à -20 °C
- Réfrigérateur à +4 °C
- Vortex
- Microscope inversé.
- Incubateur 35-37°C sous CO<sub>2</sub>
- Peptman (peptideur électronique)
- Pipette (20-200 ul)
- Pompe à vide

## **Annexe 2: Titrage et identification des virus grippaux par le test d'Hémagglutination et inhibition de l'hémagglutination (IHA)**

### **Réactifs et matériel**

- Souche virale (surnageant de culture cellulaire infectée)
- Antigènes de référence (kit OMS n° de réf : RF 57) :
  - Influenza A (H1N1) pandémique control antigène inactivé.
  - Influenza A (H1) saisonnière control antigène inactivé.
  - Influenza A (H3) control antigène inactivé.
  - Influenza B (lignée Yamagata) control antigène inactivé
- Influenza B (lignée Victoria) control antigène inactivé
- PBS (OMS pH : 7,2)
- Sang de cobaye
- Microplaques à 96 cupules en forme U et leur couvercle
- Flacon de 100ml stérile
- Pipettes stériles (1ml-10ml)
- Pipette multicanaux (5-50ul)
- Pipette (20-200 ul)

### **B- Identification du Virus de la Grippe par le test d'inhibition de l'hémagglutination (IHA)**

#### **Réactifs et matériel**

- Souche virale à identifier
- Antigènes de référence **:(kit OMS n° de réf : RF57) :**
  - Influenza A (H1N1) pandémique control antigène inactivé.
  - Influenza A (H1N1) saisonnière control antigène inactivé.
  - Influenza A (H3) control antigène inactivé.
  - Influenza B (lignée Victoria) control antigène inactivé
- Influenza B (lignée Yamagata) control antigène inactivé
- Sérums de référence **:(kit OMS n° de réf : RF57) :**
  - Antisérums A (H1N1) pandémique
  - Antisérums A (H1N1) saisonnière
  - Antisérums A (H3);
  - Antisérums B (lignée Victoria).
  - Antisérums B (lignée Yamagata).
  - Antisérums Control négatif.
- RDE(Reseptor destroying enzyme).(kit OMS n° de réf : RF57)
- PBS (OMS), pH=7,2
- Sérum physiologique (0,85%)
- Hématies de cobaye à 0,75%

- Micro plaques à 96 cupules en U à usage unique
- Pipette stérile (1ml-10ml) à usage unique
- Flacon de 100ml
- Embout bleu stérile à usage unique
- Embout jaune stérile à usage unique
- Bacs
- Tube conique de 15ml stérile à usage unique
- Hotte à flux laminaire
- Congélateur réglé à -80 °C
- Centrifugeuse tube réfrigérée (conique 15ml)
- Réfrigérateur a + 4 °C
- Vortex
- Bain-marie
- Pipette multicanaux (5-50ul)
- Micropipette (20-200ul)
- Pipette Gilson (p1000)

### **Annexe 3 : Titrage des suspensions virales en dilutions limites**

- **Matériel et réactifs :**

- Une nappe confluente de cellules MDCK
- Milieu de culture DMEM préchauffé à 37°C
- Sérum de veau fœtal (SVF)
- Phosphate buffer saline (PBS) 1X
- Flacons stérile de 25 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup>
- Trypsine TPCK à une concentration finale de 2ug/ml
- Plaque stériles à fond plat de 96 puits
- Pipettes stériles à usage unique de 1ml, 5 ml, 10 ml
- Tubes coniques stériles
- Pipette Pasteur stérile
- Embouts jaunes stériles
- Haemocytomètre (Naubauer)
- Poire aspirante

- **Equipements**

- Hotte à flux laminaire (Mc Advantage)
- Distributeurs pour les plaques à 96 puits (Eppendorf)
- Micropipette réglable de (20-200 ul) (One Touch)
- Micropipette multicanaux, réglable (10-50 ul) (One Touch)
- Incubateur à CO<sub>2</sub>, réglé à +37°C (SANYO)
- Réfrigérateurs réglé à + 4°C (ENIEM)
- Bain-marie réglé à 37°C (Fischer Scientific)
- Microscope inversé avec contraste de phase (NIKON)
- Pompe aspirante (MILLIPORE)
- Congélateur réglé à – 20°C (ENIEM)
- Congélateur réglé à – 80°C (Thermo SCIENTIFIC)

**Annexe 4 : Extraction de l'ARNv à partir de cultures virales****• Matériel et réactifs**

- Suspensions virales conservées à -80°C
- Kit d'extraction QIAamp® Viral RNA Mini Kit 250
- Ethanol (100%)
- Tubes coniques (14ml)
- Tubes Eppendorfs stériles (1,5 ml)
- Micropipettes réglables (20-200µl, 200-1000µl)
- Embouts à filtre (100-200) µl
- Embouts à filtre 1000µl
- Portoirs

**• Equipements**

- Hotte à flux laminaire (BIOCYT)
- Congélateur réglé à -80°C (Thermo scientific)
- Congélateur réglé à -20°C (ENIEM)
- Centrifugeuse réfrigérée (Heraeus Pico 17 Thermo Scientific)
- Vortex (Vortex Genie 2)
- Bain-marie (Fisher scientific)

**• Préparation des réactifs**

Tous les réactifs préparés ci-dessous sont fournis dans le kit QIAamp® Viral RNA Mini Kit 250. (Figure 29)



**Figure 31** : Le kit QIAamp® Viral RNA Mini Kit 250

➤ **ARNcarrier**

310 µl de tampon d'éluion (AVE) sont ajoutées au tube de l'ARN carrier, le tube est ensuite bien mélangé, on fait des aliquotes et on conserve à (-20° C).

➤ **Tampon de lyse AVL /ARNcarrier** :

La quantité de tampon de lyse AVL/ARNc est déterminée selon le nombre d'échantillons à traiter simultanément comme indiqué dans le tableau ci-dessous

Nbre Ech	Tampon AVL(ml)	ARNc-AVE (µl)	Nbre Ech	Tampon AVL(ml)	ARNc-AVE (µl)
1	0.56	5.6	13	7.28	72.8
2	1.12	11.2	14	7.84	78.4
3	1.68	16.8	15	8.40	84.0
4	2.24	22.4	16	8.96	96.0
5	2.80	28.0	17	9.52	95.2
6	3.36	33.6	18	10.08	100.8
7	3.92	39.2	19	10.64	106.4
8	4.48	44.8	20	11.20	112.0
9	5.04	50.4	21	11.76	117.6
10	5.60	56.0	22	12.32	123.2
11	6.16	61.6	23	12.88	128.8
12	6.72	67.2	24	13.44	134.4

**Tableau X** : préparation du tampon de lyse AVL/ARNc

- Préparer dans un tube conique le volume nécessaire de tampon de lyse AVL/ARN carrier correspondant

➤ **Tampons de lavage (AW1/AW2)** : livrés sous forme concentrée

On ajoute la quantité appropriée d'éthanol (100%) comme indiqué sur les flacons et on conserve à température ambiante

---

**Annexe 5 : Détection des sous type du virus de la grippe (type A) par PCR en temps réel****• Matériel et réactifs :**

- Extraits d'ARNv conservés à -80°C
- Contrôle positif Grippe saisonnière
- Amorces et sondes Grippe CDC, cat #Flu RUO-02
- Invitrogene SuperScript III RT Platinum<sup>®</sup> One step quantitative Kit (cat.11732-088)
- Eau purifiée exempte d'ARNase et d'ADNase
- Pipettes réglables (20-200µl) (Finnpipette)
- Pipettes réglables (2-20µl) (One Touch)
- Tubes Eppendorfs stériles (0,5ml-1,5ml)
- Embouts à filtre (200µl, 10µl)
- Embouts à filtre (2-20µl)
- Plaque PCR à 96 puits (MicroAmp<sup>®</sup>)
- Support pour plaque
- Film adhésif+ adaptateur (MicroAmp<sup>®</sup>)
- Portoir réfrigérant
- Décontaminant RNase Away

**• Equipements**

- Hotte à flux laminaire pour la préparation du mélange réactionnel (HEPA/UV3)
- Hotte à flux laminaire pour le dépôt des échantillons (BIOCYT)
- Congélateur réglé à (-80°C) (thermo scientific)
- Congélateur réglé à (-20°C) (ENIEM)
- Centrifugeuse de paillasse (eppendorf)
- Centrifugeuse réfrigérée (Heraeus Pico 17 Thermo Scientific)
- Vortex (Vortex Genie 2)
- Automate PCR en temps réel (Applied Biosystems)

## Annexe 6 : statistique descriptives des patients

- Âge :

$$\text{Rappel : } SE = \frac{SD}{\sqrt{n}}$$

SE (standart error of mean) avec SD (standard deviation) égale à s, écart type estimé, tel que

$$\frac{s}{\sqrt{n}} = \frac{\sigma}{\sqrt{n-1}}$$

	Masculin (n=39)	Féminin (n=29)
Moyenne $\pm$ SE	5,57 $\pm$ 8,10	4,14 $\pm$ 5,27
Médiane	6,0	4,0
Age minimum	1 an	1 an
Age maximum	61 ans	77 ans

$$\text{Sex ratio} = \frac{n(\text{Mas})}{n(\text{Fém})} = \frac{39}{29} = 1,5185\%$$

- Distribution dans les classes d'âges

Classes d'âges (ans)	Masculin n(%)	Féminin n (%)	Total n (%)
[ind[ ans	0 (0%)	2 (2,94%)	2 (2,94%)
[01-11[ans	23 (33,82%)	16 (23,53%)	39 (57,35%)
[11-21[ans	4 (5,88%)	1 (1,47%)	5 (7,35%)
[21-31[ans	7 (10,29%)	3 (4,41%)	10 (14,71%)
[31-41[ans	0 (0%)	2 (2,94%)	2 (2,94%)
[41-51[ans	4 (5,88%)	2 (2,94%)	6 (8,82%)
[51 ans et +	1(1,47%)	3 (4,41%)	4(5,88%)
Total	39 (57,35%)	29 (42,65%)	68 (100,00%)

- Répartition des cas autochtones par wilaya :

Wilaya	Nombre	%
Alger	45	66,18
Bejaia	1	1,47
Blida	5	7,35
Boumerdes	8	11,76
Médéa	3	4,41
Tipaza	5	7,35
Tizi -ouzou	1	1,47
Total	68	100,00

▪ **Répartition des 68 souches A/H3N2 selon le nombre de passage sur cellules MDCK**

Nombre de passage	Nombre	%
Passage 0	45	66,18
Passage 1	20	29,41
Passage 2	3	4,41
Total	68	100,00

• **Répartition des DICT<sub>50</sub> selon le nombre de passage**

DITCT50/ml et passage cellulaire	[4-5[/ml	[5-6 [/ ml	[6-7 [/ml	[7ml et plus
p-valeurs au risque 5%	0.000031	0.000036	0.000046	0.029

Annexe 7 : Valeurs de la DICT<sub>50</sub> et du Ct de toutes les souches testéesTableau XI : Valeurs de la DICT<sub>50</sub> et du Ct de toutes les souches testées

Numéros	N° de la souche	Titre en log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub>	Ct des dilutions pour chaque souche									Dilution correspondante	Temoin négatif
			10 <sup>-3,5</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4,5</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-5,5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-6,5</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-7,5</sup>		
Souche de référence	A/Wyoming/2003/3	4,4		10,7459	22,2392	31,228	32,4515	33,9924	33,9216	31,7172	36	10 <sup>-7,5</sup>	37,33
1	G107/12	4,67			9,34683	23,139	31,8158	33,5719	31,9074	33,8636	34,3533	10 <sup>-7,5</sup>	36,33
2	G218/10	4,79					10,8323	24,2187	33,2726	34,211		10 <sup>-7,5</sup>	37,41
3	G228/10	4,83						11,3161	33,9708	34		10 <sup>-7,5</sup>	36
4	G283/12	4,83		12,1563	30,3474	32,09	32,9388	32,9765	33,1766	32,3681	33,7126	10 <sup>-7,5</sup>	35,14
5	G316/12	4,83	8,19116	9,84064	24,784	30,216	31,0079	30,97	27,4255	29,7099	31,0196		35,04
6	G327/12	4,83		13,27	13,5	23,05	33,48	35,42	36,78	38	37,73	10 <sup>-6</sup>	35
7	G343/13	4,88		9,95764	31,3273	30,686	35,8523	36,1363	34,0916	33,9753	32,9669	10 <sup>-7</sup>	34,77
8	G263/12	4,88		8,321	15,4462	30,31	32,42	32,4144	32,076	31,2744	33,842	10 <sup>-6</sup>	36,08
9	G11/11	4,92					10,4719	22,0432	15,8798	32,6478		10 <sup>-7,5</sup>	34,85
10	G120/12	4,92	9,74993	25,1024	29,5345	31,28	31,5524	30,194	32,191	28,343	33,9579	10 <sup>-7,5</sup>	35,15
11	G519/12	5,12			11,15	31,077	30,8883	33,2674	30,7387	30,6456	30,0261		35,71
12	G165/11	5,17					12,3141	11,3929	32,9824	34,5198		10 <sup>-7,5</sup>	35,8
13	G76/11	5,17				11,246	25,0442	32,7216	16,0698	31,4632	30,8783		35,46
14	G486/12	5,17			10,3764	30,435	31,7537	33	32,6623	31,6968	31,4506	10 <sup>-6,5</sup>	34,34
15	G536/12	5,17					27,8249	28,0166	25,0747	29,5246	29,8123		35,13
16	G249/12	5,22			11,643	32,436	31,0501	32,4558	34,5409	30,4584	35,8242	10 <sup>-7,5</sup>	35,94
17	G284/12	5,25		9,2051	29,7049	29,926	10,1262	28,3299	30,8988	29,7409	31,7944		35,16
18	G303/12	5,27		12,7276	33,7411	34,232	34,3249	38,4689	32,6376	31,2919	30,5081	10 <sup>-6</sup>	36,63
19	G62/11	5,33					11,2583	31,0151	29,9795	29,5761	31,6137		35,36
20	G320/12	5,38			7,94289	9,1992	29,3589	27,9062	30,0867	31,2366	32		35,68
21	G229/10	5,4							11,0401	29,0557	32,4529	10 <sup>-7,5</sup>	31,05
22	G121/11	5,42			10,0788	33,605	32,877	32,8605	26,8106	33,0491	29,6298	10 <sup>-5</sup>	35,31

**Tableau XI (Suite) : Valeurs de la DICT<sub>50</sub> et du Ct de toutes les souches testées**

Numéros	N° de la souche	Titre en log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub>	Ct des dilutions pour chaque souche									Dilution correspondante	Temoin négatif	
			10 <sup>-3,5</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4,5</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-5,5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-6,5</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-7,5</sup>			
23	G366/13	5,42			9,17306	25,168	30,1488	30,0755	33,9366	32,1831	31,0773	10 <sup>-6,5</sup>	33,88	
24	G322/12	5,58			9,38268	29,153	30,1377	28,0474	30,8253	30,2136	31,1204		37,89	
25	G08/14	5,62			8,91342	28,12	28,5574	29,048	31,6103	29	31,2527		34,98	
26	G377/16	5,62			12,3665	31,644	15,1725	33,0033	32,5173	33,2729	31,9693		35,24	
27	G636/16	5,62				12,688	27,3794	31,5203	33,1758	32,7579	32,1189		35,08	
28	G48/11	5,67						11,4203	28,6006	28,206	31,291		36,12	
29	G497/12	5,67					9,02408	27,5322	15,8276	29,3909	29,8039		35,22	
30	G332/12	5,72		9,06965	24,101	29,542	29,5661	31,126	30,884	31,6349	31,1606		35,48	
31	G343/12	5,72		9,10712	30,3701	29,428	33,7802	33,9473	31,6093	32,8632	32,4382		36,66	
32	G384/12	5,75			10,17	19,18	31,93	29,4	38	36,9	38	10 <sup>-6,5</sup>	36,22	
33	G483/12	5,75				10,201	11,9773	32,4702	31,7377	30,205	31,3224		38	
34	G04/11	5,75			11,0759	31,448	31,2069	32,2114	34,2786	32,352	34,0322	10 <sup>-7,5</sup>	34,04	
35	G266/12	5,75			10,02	29,92	9,83	28,81	29,9	31,16	29,39		34,03	
36	G365/13	5,75							10,5387	31,5733	29,7426		36,57	
37	G267/14	5,75						11,2658	33,345	34,2069	36,4945	10 <sup>-7,5</sup>	36,1	
38	G285/12	5,83			27,3193	32,152	31,2743	34,0399	34,6937	33,6981	34,336981	10 <sup>-6,5</sup>	37,43	
39	G323/12	6,08				11,971	14,9172	30,248	30,8684	31,8273	32,8101		34,39	
40	G404/12	6,08				11,191	32,3777	30,6534	31,3864	32,9683	32,0415		34,62	
41	G99/11	6,12				9,4661	33,0137	32,2537	32,5404	33,8118	31,8454		35,11	
42	G114/11	6,12							10,8563	30,0874	28,4256		37,52	
43	G238/12	6,17						10,4629	31,3386	33,1159	32,4845		35,9	
44	G333/12	6,25						11,3094	14,2571	33,7538	29,2712	36,5248	10 <sup>-7,5</sup>	36,46
45	G366/12	6,25						10,9978	30,4513	33,5581	32,771	35,3301	10 <sup>-7,5</sup>	36,97

**Tableau XI (Suite) : Valeurs de la DICT<sub>50</sub> et du Ct de toutes les souches testées**

Numéros	N° de la souche	Titre en log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub>	Ct des dilutions pour chaque souche								Dilution correspondante	Temoin négatif	
			10 <sup>-3,5</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4,5</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-5,5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-6,5</sup>	10 <sup>-7</sup>			10 <sup>-7,5</sup>
46	G502/12	6,25						11,0117	30,2692	33,136	33,5491		35,13
47	G637/16	6,25					32	31,1121	27,0356	20,9079	20,48		34,92
48	G640/16	6,25					10,94	37,73	24,11	38	38	10 <sup>-6</sup>	35,69
49	G230/14	6,28						10,771	32,7705	32,2086	34,2616		38,07
50	G400/09	6,33				13,33	15,76	36,98	37,91	38	38	10 <sup>-6</sup>	37,94
51	G36/11	6,33					8,80531	21,3549	33,4474	28,4099	31,152		35,04
52	G337/12	6,38							28,2598	32,7161	31,7206		36,37
53	G63/11	6,75					11,3502	34,9836	33,586	34,6253	34,8083	10 <sup>-6</sup>	34,91
54	G365/12	6,75						9,12326	30,0683	14,6256	32,2915		34,5
55	G411/12	6,75						10,1015	31,7417	30,9005	36	10 <sup>-7,5</sup>	33,99
56	G485/12	6,75						10,876	30,0884	10,7016	20,4023		36,04
57	G396/16	6,75						14,0111	26,5099	31,5656	30,2054		35,21
58	G639/16	6,83					13,94	16,96	31,75	37,9	38	10 <sup>-7</sup>	35,73
59	G301/12	6,88					10,9317	11,1588	31,3448	32,1464	32,4429		34,94
60	G108/11	6,92					9,16592	27,3238	30,1727	28,6504	32,2346		34,27
61	G361/09	7,08				11,26	10,96	10,59	28,73	26,82	38	10 <sup>-7,5</sup>	34,64
62	G627/16	7,08						13,915	24,7304	33,9974	31,3247		35,15
63	G410/16	7,12								12,9125	28,1367		36,45
64	G352/09	7,25						11,0707	31,3962	29,2613	32,7127		35,94
65	G05/11	7,33							10,7647	19,0669	33,2225		35,46
66	G351/09	7,38							11,0371	33,4615	31,0778		37,4
67	G435/16	7,75								10,6934	28,891		38,46
68	G527/16	7,75							12,4136	33,4338	32,0064		34,56

Annexe 8 : Fiche du titrage du virus de la grippe par la technique de DICT 50

 <p><b>INSTITUT PASTEUR D'ALGERIE</b> Service de Virologie Humaine Laboratoire Grippe et Virus Respiratoires Laboratoire de Référence OMS pour la Grippe</p>	<p>Formulaire d'enregistrement</p> <p>Titrage des virus de la grippe Technique de la DICT<sub>50</sub></p>	<p>Ref : F LGVR 0116/01</p> <p>Page : 1/2</p>																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
<p>Date de l'ensemencement :</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th>Date :</th> <th>1</th><th>2</th><th>3</th><th>4</th><th>5</th><th>6</th><th>7</th><th>8</th><th>9</th><th>10</th><th>11</th><th>12</th> <th>CC</th> </tr> <tr> <td>A</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>B</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>C</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>D</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>E</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>F</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>G</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>H</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> <td></td> </tr> </table>	Date :	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	CC	A															B															C															D															E															F															G															H															<p>MDCK passage :</p> <p>Nom de la souche :</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th>Date :</th> <th>1</th><th>2</th><th>3</th><th>4</th><th>5</th><th>6</th><th>7</th><th>8</th><th>9</th><th>10</th><th>11</th><th>12</th> <th>CC</th> </tr> <tr> <td>A</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>B</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>C</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>D</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>E</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>F</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>G</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>H</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> <td></td> </tr> </table>	Date :	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	CC	A															B															C															D															E															F															G															H															<p>Date de l'ensemencement :</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th>Date :</th> <th>1</th><th>2</th><th>3</th><th>4</th><th>5</th><th>6</th><th>7</th><th>8</th><th>9</th><th>10</th><th>11</th><th>12</th> <th>CC</th> </tr> <tr> <td>A</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>B</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>C</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>D</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>E</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>F</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>G</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>H</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> <td></td> </tr> </table>	Date :	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	CC	A															B															C															D															E															F															G															H															<p><b>Calcul de la DICT<sub>50</sub> selon Reed et Muench</b></p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th>Dilutions</th> <th>Colonne 1</th> <th>Colonne 2</th> <th>Colonne 3</th> <th>Colonne 4</th> <th>Colonne 5</th> <th>Colonne 6</th> </tr> <tr> <td>Valuers Positives</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Valuers négatives (2)</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Somme Des Valuers positives</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Somme Des Valuers négatives (B)</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Ratio</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>%</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </table>	Dilutions	Colonne 1	Colonne 2	Colonne 3	Colonne 4	Colonne 5	Colonne 6	Valuers Positives							Valuers négatives (2)							Somme Des Valuers positives							Somme Des Valuers négatives (B)							Ratio							%							<p>Titre: ...../DICT<sub>50</sub>/0.1ml</p> <p>Date et Signature de l'opérateur</p>
Date :	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	CC																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
A																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
B																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
C																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
D																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
E																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
F																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
G																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
H																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
Date :	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	CC																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
A																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
B																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
C																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
D																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
E																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
F																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
G																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
H																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
Date :	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	CC																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
A																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
B																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
C																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
D																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
E																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
F																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
G																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
H																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
Dilutions	Colonne 1	Colonne 2	Colonne 3	Colonne 4	Colonne 5	Colonne 6																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
Valuers Positives																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
Valuers négatives (2)																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
Somme Des Valuers positives																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
Somme Des Valuers négatives (B)																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
Ratio																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
			<p>Proportion % = <math>\frac{\dots}{\dots} \times 50</math></p> <p>Date et Signature du Chef du Laboratoire</p>																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				

Annexe 9 : Feuille de calcul Excel de la DICT<sub>50</sub>

Echantillon titré: **A/WORMING/3/2003/H3N2**

Numéro de plaque :

Nombre de répliques: **4**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-1,5</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-2,5</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-3,5</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4,5</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-5,5</sup>
Nbre de puits positifs	4	4	3	2	0	0	0	0	0	0
% de puits positifs	100%	100%	75%	50%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

Facteur de dilution	Nombre répliques		Valeurs cumulée du nombre de répliques			% répliques positives
	Négatives	Positives	Négatives	Positives	Total	
10 <sup>-1</sup>	0	4	0	21	21	100,00%
10 <sup>-1,5</sup>	0	4	0	17	17	100,00%
10 <sup>-2</sup>	0	4	0	13	13	100,00%
10 <sup>-2,5</sup>	0	4	0	9	9	100,00%
10 <sup>-3</sup>	1	3	1	5	6	83,33%
10 <sup>-3,5</sup>	2	2	3	2	5	40,00%
10 <sup>-4</sup>	4	0	7	0	7	0,00%
10 <sup>-4,5</sup>	4	0	11	0	11	0,00%
10 <sup>-5</sup>	4	0	15	0	15	0,00%
10 <sup>-5,5</sup>	4	0	19	0	19	0,00%

Valeurs			
100,0	100,0	0,0	83,33
100,0	100,0	0,0	40,00
100,0	100,0	0,0	
100,0	100,0	0,0	
83,3	83,3	0,0	
40,0	100,0	40,0	
0,0	100,0	0,0	
0,0	100,0	0,0	
0,0	100,0	0,0	
0,0	100,0	0,0	

% des positifs immédiatement < à 50%	40,0%
% des positifs immédiatement > à 50%	83,3%
Raison de dilution	3,162
Log 10 de la raison de dilution	0,4999619
Différence des logarithmes	0,1153758

Inverse de la dilution donnant un % de positifs immédiatement < 50%	3,16E+03
Log (inverse de la dilution donnant un % de positifs immédiatement < 50%)	3,49999895
Différence des log	0,11537582
Log (inverse de la dilution correspondant à 50% de positifs)	3,38462313

Volume de prise d'essai: **0,1** mL

Titre en log<sub>10</sub> (DICC<sub>50</sub> /mL): **4,38**

ou  
Titre (DICC<sub>50</sub> /mL): **2,42E+04**

# **CHAPITRE I : GENERALITES**

# **CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES**

# **CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION**

# **BIBLIOGRAPHIE**

# **ANNEXES**