



Comprendre les tests RT-PCR et leurs résultats

Les tests de diagnostic de la COVID-19 par RT-PCR en temps réel permettent de déterminer si un patient a été infecté ou non par le SARS-CoV-2 en détectant la présence de matériel génétique du virus et en mesurant la quantité.

Le présent document fournit un aperçu du test de transcription inverse suivie d'une réaction en chaîne de la polymérase en temps réel (RT-PCR). Il offre des renseignements généraux sur la façon dont ce test de biologie moléculaire est utilisé en laboratoire pour détecter le matériel génétique d'un pathogène tel que le SARS-CoV-2, le virus responsable de la COVID-19. Il explique également les rudiments de l'interprétation des résultats de test, susceptibles d'être utiles pour comprendre l'état de la maladie et/ou sa progression et son potentiel de transmissibilité. Il peut être d'une grande utilité aux praticiens de la santé publique et plus généralement à tout professionnel de santé investi dans la lutte contre la COVID-19.

Qu'est-ce que le matériel génétique et comment est-il utilisé pour la détection de maladies infectieuses ?

Le matériel génétique est le manuel d'instruction au sein d'une cellule ou d'un virus offrant des indications sur la façon de se comporter, survivre, etc. On distingue deux types de matériel génétique : l'acide désoxyribonucléique (ADN) et l'acide ribonucléique (ARN). La principale différence entre ces deux types de matériel génétique est que l'ADN est une structure bicaténaire (à double brin), alors que l'ARN est monocaténaire (à simple brin). D'un point de vue diagnostique, l'ADN est plus stable que l'ARN pour la détection de maladies infectieuses en raison de ses propriétés structurelles et intrinsèques. Il convient également de noter que le SARS-CoV-2 est exclusivement constitué d'ARN.

Les virus ont tous pour caractéristique commune de dépendre de protéines hôtes et de leurs outils de reproduction pour survivre. Ainsi, les virus comme le SARS-CoV-2 sont tenus d'envahir des cellules saines pour survivre et se multiplier. À l'instar d'autres virus, lorsqu'il infiltre une cellule, le SARS-CoV-2 libère son ARN et utilise les outils de la cellule pour se répliquer. Par ailleurs, tant que le matériel génétique du virus est présent dans la cellule, il est possible de recourir à la technique de laboratoire dite de la RT-PCR en temps réel pour déterminer si un patient a été/est infecté par le SARS-CoV-2.

Qu'est-ce que la RT-PCR en temps réel ?

La RT-PCR en temps réel (transcription inverse suivie d'une réaction en chaîne de la polymérase) est un test rapide et sensible servant à détecter la présence d'un matériel génétique précis dans un échantillon. Ce matériel génétique peut être propre à l'humain, à des bactéries ou à des virus comme le SARS-CoV-2.

La RT-PCR en temps réel repose sur le principe de la réaction en chaîne de la polymérase (PCR), une technique de laboratoire mise au point par le prix Nobel Kary B. Mullis dans les années 1980, qui permet aux chercheurs d'amplifier et de détecter des cibles ADN précises (1,2). Cette technique a été améliorée par la suite pour permettre la visualisation et la quantification « en temps réel » des cibles ADN lors de leur amplification. Pour visualiser l'amplification de l'ADN, la PCR en temps réel utilise l'intensité de fluorescence d'une sonde fluorogénique, dont l'augmentation est proportionnelle à la quantité d'ADN amplifié. Mesurer l'intensité de la fluorescence permet de quantifier le volume de matériel génétique au sein de l'échantillon. Un des principaux inconvénients de la PCR est qu'elle ne détecte que les matrices d'ADN. Pour appliquer la PCR en temps réel à des échantillons d'ARN (du matériel génétique du SARS-CoV-2, par exemple), les chercheurs ont donc recours à une enzyme spéciale – la transcriptase inverse – de façon à convertir l'ARN en matrices d'ADN, également appelées ADN complémentaire (ADNc). Toutes ces caractéristiques contribuent à la polyvalence et la sensibilité de la RT-PCR en tant que test diagnostique pour les maladies infectieuses.

Comment fonctionne la RT-PCR en temps réel ?

Prélèvement de l'échantillon : Pour commencer, un professionnel de la santé habilité prélève des spécimens naso-pharyngés dans le nasopharynx du patient à l'aide d'un écouvillon. L'échantillon est ensuite déposé dans un tube stérile contenant un milieu de transport viral afin de garantir la viabilité du virus (3).

Préparation de l'échantillon : À l'arrivée des spécimens au laboratoire, les chercheurs ont recours à des trousse de purification commerciale pour en extraire de l'ARN. L'échantillon d'ARN est ensuite ajouté à un mélange réactionnel contenant tous les ingrédients requis pour exécuter le test de diagnostic, également appelé « RT-PCR en une étape ». Ce mélange se compose d'ADN-polymérase, de transcriptase inverse, de blocs d'ADN ainsi que de sondes et d'amorces fluorophores spécifiques qui détectent le SARS-CoV-2.

Transcription inverse : Comme indiqué plus haut, la PCR ne fonctionne que sur des matrices d'ADN. Le rôle de la transcriptase inverse au sein du mélange réactionnel est donc de convertir en ADNc tout l'ARN présent dans un échantillon donné. Cela inclut l'ARN humain, l'ARN bactérien voire l'ARN d'autres coronavirus, et l'ARN du SARS-CoV-2 le cas échéant.

Étape 1 – Dénaturation/séparation : Rappelons tout d'abord que l'ADN est une structure à double brin. Cette étape consiste donc à séparer les deux brins de la molécule d'ADN. Pour cela, il convient de faire chauffer l'ADN à haute température (> 90 °C) pendant une dizaine de minutes.

Étape 2 – Hybridation des amorces : L'étape suivante consiste à apparier de courts fragments d'ADN appelés amorces. Les amorces conçues sont d'une grande spécificité et se fixent à des cibles précises à l'intérieur de l'ADNc du virus à ARN SARS-CoV-2. L'hybridation des amorces requiert par ailleurs une température très basse spécifique. Sept gènes cibles communs sont généralement utilisés pour détecter la COVID-19 ; chacun de ces gènes cibles est indispensable à la réplication ou à la structure du virus (4). Parmi ces gènes cibles essentiels figurent notamment l'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRP), le gène ORF1ab (cadre de lecture ouvert conservé du SARS-CoV-2), le gène S (protéine de spicule), le gène N (protéine nucléocapside) et le gène E (enveloppe ; capsid du virus).

Étape 3 – Extension/élongation des amorces : L'ADN étant une structure à double brin, le mélange réactionnel comporte deux amorces, chacune d'elles spécifiquement conçue pour cibler l'un des deux brins d'ADN. Une fois fixées à leur brin d'ADN cible, les amorces indiquent à l'ADN polymérase où commencer et où terminer l'amplification du segment d'ADN. Le produit de cette étape est une copie d'ADN identique à l'ADN cible.

Répétition du cycle : La PCR en temps réel répète le cycle à plusieurs reprises (40 cycles en moyenne). La quantité d'ADN cible double à chacun de ces cycles, et des sondes fluorescentes se fixent spécifiquement aux cibles ADN en aval de chaque amorce. Chaque fois que l'ADN polymérase amplifie la cible ADN, cela active la sonde qui émet un signal fluorescent. Ainsi, plus le volume d'ADN cible augmente, plus l'intensité de la fluorescence augmente elle aussi.

Quelle est la lecture de la RT-PCR en temps réel ?

La fluorescence émise est ensuite captée sous forme de signal pour générer une valeur de « cycle seuil » (Ct). La valeur Ct se rapporte au nombre de cycles requis pour que le signal fluorescent dépasse le bruit de fond. En général, plus l'échantillon contient d'ADN cible, plus l'amplification est rapide, et plus le nombre de cycles requis pour que le signal fluorescent franchisse la valeur seuil est faible (faible valeur Ct). À l'inverse, plus la quantité d'ADN cible est faible, plus il faudra de cycles avant que la fluorescence franchisse la valeur seuil (valeur Ct élevée).

Pourquoi les valeurs Ct sont-elles importantes ?

Les valeurs Ct sont utiles car elles fournissent des renseignements sur la charge de matériel génétique pathogène (SARS-CoV-2) du patient. Une faible valeur Ct indique une charge génomique virale élevée, tandis qu'une valeur Ct élevée indique une faible charge génomique virale. Les professionnels de la santé peuvent utiliser les valeurs Ct conjointement aux symptômes cliniques et à l'historique du patient pour juger du stade de la maladie. Les séries de valeurs Ct résultant de tests répétés peuvent également aider les cliniciens à suivre l'évolution de la maladie et à prédire les différentes phases de récupération jusqu'à la résolution de l'infection. Les traceurs de cas contacts ont également recours aux valeurs Ct pour concentrer leurs efforts sur les patients dont la charge génomique virale est élevée, puisque cela indique un fort risque de transmission.

Valeur Ct	Indication	Interprétation
<25	Niveaux élevés de charge génomique de SARS-CoV-2	Les patients présentant de fortes charges génomiques de SARS-CoV-2 sont plus susceptibles de développer une forme grave de la maladie et de devoir être intubés.
25-30	Niveaux modérés de charge génomique de SARS-CoV-2	Le patient doit être placé sous surveillance.
>30	Faibles niveaux de charge génomique de SARS-CoV-2	Une faible charge génomique de SARS-CoV-2 peut être détectée aux premiers stades d'une infection, lorsque la réplication virale vient de commencer. Elle peut également caractériser les dernières phases de l'infection, lorsque le virus a été éradiqué et que seuls subsistent des reliquats de son contenu génomique. L'interprétation requiert un contexte clinique.