

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Ahmed Draïa Adrar



Faculté des Sciences et de la Technologie
Département de Biologie

Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de Master en :

- *Filière : Biologie*
- *Spécialité : Biochimie Appliquée*

Thème :

Etude de l'efficacité des Tests Antigénique dans le diagnostique de COVID-19 (sensibilité et Spécificité) ; Comparaison entre le test Antigénique NADAL® COVID-19 Ag et Le qRT-PCR.

Préparé par :

- *M^r. Abdella Abdelkhalek*
- *M^{me}.MEZAOUROU YASMINA*

Encadré par :

- *Dr. Djednali Abdeldjalil*

Année Universitaire : 2021/2022

شهادة الترخيص بالإيداع

انا الأستاذة(ة) : جدا عالي عبد الحليل
المشرف مذكرة الماستر الموسومة بـ : Etude de l'efficacité des Tests Antigéniques dans le diagnostic de COVID-19
من إنجاز الطالب(ة) : عبد الخالق عبد الله
و الطالب(ة) : مترادو بسامية
كلية : العلوم
القسم : البيولوجيا
التخصص : البيوكيمياء التطبيقية
تاريخ تقييم / مناقشة :

أشهد ان الطلبة قد قاموا بالتعديلات والتصحيحات المطلوبة من طرف لجنة التقييم / المناقشة، وان المطابقة بين
النسخة الورقية والإلكترونية استوفت جميع شروطها.
ويامكانهم إيداع النسخ الورقية (02) والإلكترونية (PDF).

- امضاء المشرف:

ادرار في : 28 / 07 / 2022

مساعد رئيس القسم:



رئيس قسم علوم الطبيعة والحياة
أ. د. أيتنسي عبد القادر

Signature

Résumé :

Titre :

**Etude de l'efficacité des Tests Antigénique dans le diagnostic de COVID-19
(Comparaison entre le test Antigénique NADAL® COVID-19 Ag et Le qRT-PCR
(TaqPath™ COVID-19 CE-VD RT-PCR)).**

Auteur: ABDELLA ABDELKHALEK

Mots clés: SARS-CoV-2, qRT-PCR, coronavirus, TEST NADAL® COVID-19 Ag,

Le 31 décembre 2019, le comité municipal de la santé de Wuhan (la Chine) a annoncé que des cas de pneumonie aiguë avaient été signalés, ce qui a ensuite conduit à la découverte d'un nouveau coronavirus. La recherche et les expériences scientifiques ont permis la découverte et le diagnostic du virus de SARS-CoV-2, qui repose principalement sur la réaction de polymérisation en chaîne après transcription inverse en temps réel (qRT-PCR), qui est considérée comme la méthode la plus précise pour détecter ce virus, mais elle nécessite des coûts élevés et plusieurs heures de réalisation pour donner le résultat.

C'est pourquoi les scientifiques ont développé une technologie de test rapide d'antigènes telle que le TEST NADAL® COVID-19 Ag, qui détecte la présence de certaines protéines dans le virus. En utilisant un écouvillon pour obtenir un échantillon liquide par prélèvement nasal, les résultats de ce test antigénique peuvent apparaître en quelques minutes.

L'objectif de ce travail est d'évaluer les performances de ce test rapide en termes de sensibilité et de spécificité, à partir de 50 échantillons de sécrétions nasales prélevés dans l'unité de dépistage de Covid-19 du nouvel hôpital (Tililan - Adrar) et de comparer ses résultats avec les analyses de réaction en chaîne par polymérase de transcription en temps réel.

Après analyse des données, le TEST NADAL® COVID-19 Ag donne une sensibilité de 94%, une spécificité de 100%. Il ressortait donc, dans notre étude que ce test possède une excellente spécificité et une très bonne sensibilité.

Summary :

Title :

Study of the effectiveness of Antigen Tests in the diagnosis of COVID-19 (Comparison between the NADAL® COVID-19 Ag Antigen test and qRT-PCR (TaqPath™ COVID-19 CE-VD RT-PCR)).

Author: **ABDELLA ABDELKHALEK**

Keywords: SARS-CoV-2, qRT-PCR, coronavirus, NADAL® COVID-19 Ag TEST,

On December 31, 2019, the municipal health committee of Wuhan (China) announced that cases of acute pneumonia had been reported, which later led to the discovery of a new coronavirus. Scientific research and experiments have led to the discovery and diagnosis of the virus of SARS-CoV-2, which is mainly based on Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR), which is considered to be the method the most precise to detect this virus, but it requires high costs and several hours of realization to give the result.

This is why scientists have developed rapid antigen testing technology such as the NADAL® COVID-19 Ag TEST, which detects the presence of certain proteins in the virus. By using a swab to obtain a liquid sample via nasal swab, the results of this antigen test can appear within minutes.

The objective of this work is to evaluate the performance of this rapid test in terms of sensitivity and specificity, from 50 samples of nasal secretions taken from the Covid-19 screening unit of the new hospital (Tililan - Adrar) and compare its results with real-time transcription polymerase chain reaction analyses.

After data analysis, the NADAL® COVID-19 Ag TEST gives a sensitivity of 94%, a specificity of 100%. It therefore emerged, in our study, that this test has excellent specificity and very good sensitivity.

المخلص

العنوان :

دراسة فعالية اختبار المستضدات السريعة في الكشف عن فيروس كوفيد19 (مقارنة بين تحليل المستضد NADAL® COVID-19 Ag وتحليل الاستنساخ العكسي لتفاعل البوليمراز المتسلسل في الوقت الحقيقي PCR-Rrt (TaqPath™ COVID-19 CE-VD RT-PCR)

الكاتب : عبدالله الخالق
الكلمات المفتاحية :

في 31 ديسمبر 2019 أعلنت اللجنة الصحية في بلدية ووهان الصينية عن تسجيل حالات إصابة بالتهاب رئوي حاد ، أدى ذلك لاحقا لاكتشاف فيروس كورونا مستجد. مكنت الأبحاث و التجارب العلمية من اكتشاف، اعتمد الكشف عن الفيروس و تشخيصه أساساً على تقنية الاستنساخ العكسي لتفاعل البوليمراز المتسلسل في الوقت الحقيقي PCR-rRT ، التي تعتبر أدق الطرق للكشف عن الفيروس ، إلا أنها تتطلب تكاليف باهضة و تستغرق عدة ساعات لإعطاء النتيجة ، لهذا طور قام العلماء بتطوير تقنية اختبار المستضدات السريعة مثل تحليل NADAL الذي يكشف عن وجود بروتينات معينة في الفيروس. وباستخدام مسحة أنفية للحصول على عينة سائلة، يمكن أن تظهر نتائج اختبارات المستضدات خلال دقائق.

والهدف من هذا العمل هو تقييم أداء هذا الاختبار السريع من حيث الحساسية والخصوصية، باستخدام 50 عينة من إفرازات الأنف تم جمعها في وحدة الكشف عن فيروس كوفيد 19 بالمستشفى الجديد (تيليلان – أدرار) و مقارنة نتائجها بتحاليل الاستنساخ العكسي لتفاعل البوليمراز المتسلسل في الوقت الحقيقي .

بعد تحليل البيانات أظهر الاختبار حساسية بنسبة 94 % و نوعية 100 % فقد ظهر في دراستنا أن لهذا الاختبار خصوصية وحساسية ممتازتين.

Dédicaces

Je dédie ce travail à ma famille en pensant à :

Mes deux parents

qui me sont si cher et qui sont à la base de ce que je suis aujourd'hui,

Ma femme

Pour leur appui et leur encouragement,

Mes frères et sœurs , mes oncles et tantes,

Pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral,

ABDELLA

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

-Mes chers parents.

-Mon mari.

-Mes deux supères filles Ines et Hiba.

-Tous ceux qui me sont chers.

Yasmina

REMERCIEMENTS

On remercie ALLAH le tout puissant qui a donné durant toutes ces années, la santé, le courage pour pouvoir avancer et mener nos études à leurs termes.

Nous tenons à remercier notre encadreur Mr : ABDELDJALIL JEDNALI pour leur soutien, leurs conseils judicieux et leur grande bien vaillance durant l'élaboration de ce travail.

Nous remercions aussi à monsieur ABAKHITI ABDELKADER chef de département des sciences de la nature et de la vie de l'université d'Adrar. Merci pour tout, pour le moment qui nous avons vécu ensemble

Liste des Abréviations :

ACE2	: Enzyme de conversion de l'angiotensine 2
ADN	: Acide désoxyribonucléique
AngII:	Angiotensine 2
ARN	: Acide Ribo Nucléique
ARNm	: Acide Ribo Nucléique messenger
AT1	: Angiotensine 1
CatB/L :	catB/L-alanine-DL-glutamate épimérase
CD147	: Cluster de Différenciation 147
CMH:	Complexe majeur d'histocompatibilité
CMIA:	Chemiluminescent Microparticule Immunoassays
CoV:	Coronavirus
COVID-19:	COronaVirus Disease 2019
CPA	: Cellules Présentatrices d'Antigènes
CT	: Cycle Threshold
CTD:	Domaine carboxyl-terminal
EEQ :	Evaluation externe de la qualité
ELISA:	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FDA:	Food and Drug Administration
GISAID:	Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data
IBV:	Infectious Bronchitis Virus
IC:	Contrôle interne
ICTV	: Comité International de Taxonomie des Virus
IFN	: Interferon
IL-6	: Interleukine-6
LBA	: Lavage bronchoalvéolaire
MERS-CoV :	Coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient
MHV	: Mouse Hepatitis Virus
NIH	: National Institutes of Health
NSP	: Protéines non structurales
NTD	: Domaine N-terminal
OC	: Culture d'organes
OMS	: Organisation mondiale de la santé

ORF	: Open Reading Frame
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PEDV	: Porcine Epidemic Diarrhea Coronavirus
RDB	: Receptor Binding Domain
RdRp	: ARN polymérase ARN-dépendante
RE	: Réticulum Endoplasmique
RT-PCR	: Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SARS-CoV	: Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus
SDRA	: Syndrome de détresse respiratoire aiguë
TDR	: Test Diagnostic Rapide
TMPRSS2	: Transmembrane Serine Protease 2
TM2	: Domaine Transmembranaire 2
2019-nCoV	: Nouveau Coronavirus 2019
3CLpro	: 3C-like protease

Liste des tableaux :

Tableau 1	Classification des coronavirus responsables d'infections humaines	05
Tableau 2	Les fonctions des protéines non structurales	11
Tableau 3	Classification des états des patients COVID-19	22
Tableau 4	Les réactifs de kit de TaqPath™ COVID-19 CE-VD RT-PCR	31
Tableau 5	Les cibles de la qRT-PCR SARS-CoV-2	32
Tableau 6	Protocole thermique d'amplification (TaqPath™ COVID-19 CE-VD RT-PCR).....	33
Tableau 7	Préparation du Mix (TaqPath™ COVID-19 CE-VD RT-PCR).....	34
Tableau 8	Plaque de réaction (TaqPath™ COVID-19 CE-VD RT-PCR).....	34
Tableau 9	Interprétation des résultats qRT-PCR SARS-CoV-2 (TaqPath™ COVID-19 CE-VD RT-PCR).....	38
Tableau 10	Les résultats des tests qRT-PCR SARS-CoV-2.....	39
Tableau 11	Les résultats des tests qRT-PCR SARS-CoV-2 selon le leur charge virale...	40
Tableau 12	Les résultats du test antigénique NADAL.....	42
Tableau 13	Résultats du test antigénique et la charge virale des échantillons	42
Tableau 14	Performance du TEST NADAL® COVID-19 Ag.....	43

Liste des figures :

Figure 1	Facteurs d'influence possibles sur les symptômes variables et la gravité de la COVID-19.	06
Figure 2	Classification et épidémies de coronavirus dans la société humaine.	07
Figure 3	L'organisation génomique du SRAS-CoV-2	08
Figure 4	Structure schématique du SRAS-CoV-2 avec l'ensemble minimal de protéines structurales.	09
Figure 5	Le mécanisme de l'infection et de la propagation du coronavirus	12
Figure 6	Cycle de réplication du SRAS-CoV-2	15
Figure 7	Activation des voies de signalisations et libération des cytokines suite à l'infection par SARS-CoV-2	18
Figure 08	Réponse immunitaire adaptative	19
Figure 09	Protéines du SARS-CoV-2 ciblées par la réponse immunitaire adaptative.....	19
Figure 10	Réponse immunitaire des cellules T4	20
Figure 11	Cinétique des réponses humorales et cellulaires contre le SARS-CoV-2	21
Figure 12	Les mécanismes potentiels de l'immunopathologie induite par le SARS-CoV-2..	22
Figure 13	Les mécanismes impliqués dans la physiopathologie du COVID-19.....	22
Figure 14	Principe de la qPCR en temps réel	24
Figure 15	Représentation graphique des résultats du qRT-PCR	25
Figure 16	Principe de la technique RT-LAMP	27
Figure 17	Test immunochromatographique COVID-19 sur bandelette de nitrocellulose...	28
Figure 18	Milieu de transport PBS et écouvillon de prélèvement nasopharyngé.....	34
Figure 19	Extracteur KingFisher Duo Prime	30
Figure 20	Réactif du Kit TaqPath™ COVID-19 CE-VD RT-PCR	31
Figure 21	Thermocycleur QuantStudio™ 5 d'Applied Biosystems™.	32
Figure 22	Résultat positif ; toutes les cibles (CI, S, N, ORF1ab) sont positifs	40
Figure 23	Résultat négatif ; les cibles (S, N, ORF1ab) sont négatifs, (MS2) est positif	40
Figure 24	Interprétation des résultats de test antigénique NADAL	41

SOMMAIRE :

INTRODUCTION	01
PARTIE THEORIQUE	
CHAPITRE I : Généralités sur le SARS-CoV-2	
I. Historique	03
II. Taxonomie de virus	04
III. Maladie de COVID-19	05
IV. Coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère 2 (SARS-CoV-2)	06
V. La biologie du SRAS-CoV-2 :	08
• <u>1. Protéines non structurales :</u>	08
• <u>2. Protéines structurales :</u>	09
<u>2.1. Protéine S</u>	09
<u>2.2. Protéine M :</u>	10
<u>2.3. protéine N :</u>	10
<u>2.4. Protéine E :</u>	10
VI. Le mécanisme de l'infection par le SRAS-CoV-2	10
VII. Cycle de vie du SRAS-CoV-2	13
1- Entrée de virus	13
2- Traduction des machines de réplication virale et réplication	13
3- Traduction des protéines de structure virale et assemblage de virions :	14
4- Libération de virus :	14
VIII. Variabilités génétiques du SARS-CoV-2	15
IX. REPOSE IMMUNITAIRE A L'INFECTION PAR SARS-CoV-2 ET IMMUNOPATHOLOGIE DU COVID-19	16
1. Réponse immunitaire innée	16
2. Réponse immunitaire adaptative :	18
2.1 Réponse immunitaire cellulaire	19
2.2 La réponse immunitaire humorale	20
3. Immunopathologie du COVID-19	21
X. PHYSIOPATHOLOGIE DU COVID-19	22
XI. DIAGNOSTIC VIROLOGIQUE DE L'INFECTION PAR SARS-CoV-2	23
1. Diagnostic moléculaire	23
<u>1.1 La détection du génome viral SARS-CoV-2 par qRT-PCR</u>	23
<u>1.2 La détection du génome viral SARS-CoV-2 par RT-LAMP :</u>	25
2. Diagnostic sérologique :	27
PARTIE PRATIQUE	
Matériels et Méthodes	
1. Echantillons	29
2. Type et lieu d'étude :	29
3. Milieu de transport (PBS):	29
I. qRT-PCR SARS-CoV-2 (kit TaqPath™ COVID-19 CE-IVD RT-PCR)	30
1. Extraction des acides nucléiques	30
1.1 KingFisher Duo Prime :	30
2. Amplification des acides nucléiques :	30
1.1- Préparation du Mix réactionnel pour qRT-PCR SARS-CoV-2 et dépôt d'ARN viral (<u>kit TaqPath™ COVID-19 CE-IVD RT-PCR</u>):	30

1.2 - Amplification et détection en temps réel	32
1.3 Préparation de mélange réactionnel (Mix)	33
II. Test rapide Antigénique (NADAL® COVID-19 Ag)	35
II.1 Domaine d'application	35
II.2 Principe	35
II.3 Réactifs et matériel utilisés	35
II.4 Matériel supplémentaire nécessaire :	36
II.5 Conservation et stabilité :	36
II.6 Recueil et préparation des échantillons :	36
a- Prélèvement oropharyngé	36
b- Prélèvement nasopharyngé :	36
II.7 Procédure du test :	36

RESULTATS ET DISCUSSION

I. qRT-PCR SARS-CoV-2:	38
I.1 Contrôle qualité et validité des résultats	38
I.2 Résultats :	38
II. TEST ANTIGENIQUE NADAL :	41
II.1 Contrôle qualité et validité des résultats :	41
II.2 Résultat	41
DISCUSSION	44
CONCLUSION	46

INTRODUCTION

INTRODUCTION :

31 décembre 2019, La Commission sanitaire municipale de Wuhan, dans la province de Hubei (Chine) signale un groupe de cas de pneumonie. Un nouveau coronavirus est ensuite identifié (1).

Suite à son identification le 7 janvier 2020 par le centre chinois de contrôle et de prévention des maladies, le nouveau virus et la maladie ont été officiellement dénommé SARS-CoV-2 (pour le coronavirus-2 du syndrome respiratoire aigu sévère) et COVID-19 (Pour CoronaVirus Disease 2019), respectivement, par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) (2)

Le 25 février 2020, Le ministre algérien de la santé a confirmé le premier cas de coronavirus dans le pays dans une annonce officielle à la télévision nationale. Le 11 mars 2020, l'OMS a annoncé publiquement l'épidémie de SRAS-CoV-2 comme une pandémie mondiale (3).

Le virus affecte principalement le système respiratoire provoquant un large panel de présentations cliniques ; de l'infection asymptomatique aux formes graves avec SDRA (syndrome de détresse respiratoire aigu) nécessitant une prise en charge en réanimation. Des signes d'une infection respiratoire avec fièvre, toux et asthénie sont observés chez la majorité des malades symptomatiques (4). La mortalité est élevée chez les personnes âgées (plus de 60 ans) et chez les personnes souffrant de comorbidités. (5).

La connaissance des tests de diagnostic du SARS-CoV-2 est encore en évolution et il est important de bien comprendre la nature, l'indication des tests et l'interprétation de leurs résultats. Jusqu'à présent, le test de référence le plus couramment utilisé et le plus fiable pour le diagnostic virologique de cette infection reste la RT-PCR, réalisée à partir de prélèvements naso-pharyngés ou d'autres échantillons des voies respiratoires. Cependant, d'autres tests d'ordre sérologiques sont actuellement utilisés et constituent un complément utile à la détection de l'ARN du SARS-CoV2 (6).

L'objectif de ce travail, est l'évaluation de la performance analytique du test rapide **NADAL® COVID-19 Ag** en termes de sensibilité et spécificité.

Une première partie théorique sera consacrée à l'étude de l'infection par le virus SARS-CoV 2, ses aspects virologiques, cliniques, et épidémiologiques. Ensuite, la deuxième partie expérimentale se focalisera sur la mesure de la sensibilité et spécificité du test rapide **NADAL® COVID-19 Ag** en comparaison avec la technique de référence qRT-PCR et finalement une troisième partie sera réservée pour l'interprétation et la discussion des résultats obtenus.

PARTIE THEORIQUE

CHAPITRE I
GENERALITES SUR
LE SARS-COV-2

I. Historique :

Le premier coronavirus aperçu est le coronavirus de la bronchite infectieuse aviaire qui a été observée pour la première fois dans le *Dakota du Nord (Etats-Unis)* en 1930. Il provoque un type de détresse respiratoire aiguë chez les volailles qui est caractérisé par une contagiosité très élevée, une toux, une baisse significative de la production d'œufs, une détérioration de la qualité des œufs, et une mortalité élevée chez les jeunes poussins (6). Par la suite, en 1937, deux chercheurs américains Fred Robert Beaudette et Charles Bannus Hudson de l'université *Rutgers*, ont annoncé dans le *Journal of the American Veterinary Medical Association* qu'ils avaient réussi à isoler et à cultiver l'agent pathogène responsable de la bronchite infectieuse (6).

En 1946, le virus de la gastroentérite transmissible du porc est identifié. Des années plus tard (1949-1951), une équipe des chercheurs du *Rockefeller Institute (New York)* avec une équipe londonienne découvrent une infection des souris qui peut provoquer une hépatite ou une encéphalite due au virus de l'hépatite murine (6).

Cependant, le lien entre ces maladies, affectant les poulets, les porcs et les souris, n'a pas été déterminé, et il n'a pas été prouvé que ces trois pathologies aient été causées à des virus appartenant à une même famille. Par conséquent, il a fallu attendre la découverte des premiers coronavirus humains (HCOV) pour que ces virus animaux et humains soient classés dans la même famille (6).

En 1960, Kendall, Malcom Byone et David Tyrrell qui travaillent à l'Unité du rhume du *British Medical Research Council*, ont isolé une souche virale nommée B81 à partir d'échantillon respiratoire d'un écolier atteint d'un rhume, néanmoins, le virus n'a pas pu être cultivé à l'aide des techniques standard qui avaient permis de cultiver avec succès des virus du rhume connus (7). Cinq ans plus tard, en 1965, les chercheurs britanniques David Tyrrell et Malcolm Byone ont réussi à cultiver le nouveau virus en le faisant passer en série dans des cultures d'organes de la trachée d'embryons humains. Ainsi, lorsque le virus isolé est inoculé à des volontaires par voie intranasale, a provoqué un rhume et a été inactivé par l'éther. En effet, l'éther est un solvant des lipides ce qui indique que le virus possède une enveloppe lipidique. L'année suivante, en 1966, deux chercheurs à l'université de *Chicago*, Dorothy Hamre et John Procknow, ont révélé qu'ils avaient cultivé un virus sur des cultures de cellules rénales embryonnaires humaines inoculées avec des prélèvements respiratoires d'étudiants en médecine enrhumés. Ce virus désigné HCoV 229E, est morphologiquement similaire au coronavirus humain B814 et à la bronchite infectieuse aviaire. Et semblablement à B814, le

virus 229E a montré une sensibilité à l'éther, de plus son matériel génétique est constitué d'ARN (Acide Ribonucléique). Par la suite, le virus HCoV 229E est devenu une « souche prototype » pour toute une série de travaux ultérieurs, contrairement à la souche B814 qui n'a pas eu une grande célébrité, et elle n'a pas été conservée au fil du temps (6) (7).

En 1967, Kenneth McIntosh et ses collègues de la *National Institutes of Health* ont découvert aux *États-Unis* une autre souche, appelée HCoV OC43. Ce virus a été cultivé sur des cellules de trachée humaine. Cette équipe a également notifié l'isolement d'autres virus sensibles à l'éther à partir d'échantillons de l'appareil respiratoire. Tous ces virus sont désignés OC (*Organ Cultures*) ce qui signifie que leur croissance a été réalisée à l'aide de cultures cellulaires provenant de divers organes (6).

Ainsi, il a été constaté que les virus de la bronchite infectieuse aviaire, de la gastroentérite du porc et de l'hépatite murine présentent en microscopie électronique (ME) une morphologie caractéristique « aspect en couronne ». Pour cette raison qu'en 1968, ces virus ont été reconnus en tant que groupe taxonomique distinct sous la dénomination de « coronavirus ». D'ailleurs, puisque ces virus étaient peu pathogènes cette famille de virus a attiré un intérêt minable en médecine humaine. Ce n'est qu'en 2002 que le premier coronavirus hautement pathogène SARS-CoV-1 a fait son apparition dans le *delta de la Rivière des Perles (Guangdong, Sud de la Chine)*, puis s'est propagé rapidement à travers le monde. Ce virus a été responsable d'une épidémie de syndromes respiratoires aigus sévères. Et puis, le coronavirus humain NL63 a été décrit en 2004 aux *Pays-Bas* et enfin HKU1 a été découvert en 2005 à *Hong-Kong* (8) (9).

En septembre 2012, un coronavirus nommé MERS-CoV (*Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus*) isolé chez un patient âgé de 60 atteint d'une pneumonie sévère a émergé le Moyen-Orient débuté à Jeddah en Arabie Saoudite (6). En décembre 2019, un nouveau coronavirus était identifié dans la ville de *Wuhan*, province de *Hubei en Chine*, chez des patients qui présentaient des pneumopathies sévères inexplicables. Puis en février 2020, l'OMS attribua le nom de COVID-19 pour désigner la maladie causée par ce virus, initialement appelé nCoV-2019, puis SARS-CoV-2 par le comité international de taxonomie des virus (9).

II. Taxonomie de Virus :

En 1975, le Comité International de Nomenclature des Virus a approuvé la création d'une famille nouvelle. La famille des *Coronaviridae* elle-même appartient à l'ordre des *Nidovirales* qui comprend deux sous-familles, les *Coronavirinae* et les *Torovirinae* (10) (11).

Selon la taxonomie actuelle, la sous-famille *Coronavirinae* est subdivisée en quatre genres nommés Alpha-, Beta-, Gamma- et Deltacoronavirus (11). À l'intérieur de ces genres, les virus sont regroupés en sous-genres, puis en espèces. Ainsi, le genre *Alphacoronavirus* comprend deux sous-genres : Duvinacovirus et Setracovirus et le genre *Betacoronavirus* comprend quatre sous-genres : Embecovirus, Hibecovirus, Merbecovirus et Sarbecovirus (**Tableau 1**) (12).

Actuellement, sept coronavirus sont capables d'infecter l'homme ; les HCoV-229E et HCoV-NL63 appartiennent au genre *Alphacoronavirus* et les autres coronavirus humains appartiennent au genre *Betacoronavirus* qui est lui-même subdivisé en quatre clades nommés classe A, classe B, classe C et classe D, dont les HCoV-HKU1 et –OC43 sont inclus dans le classe A, le SARS-CoV et le MERS-CoV appartiennent aux classes B et C respectivement (**Tableau1**) (11).

Tableau 1: Classification des coronavirus responsables d'infections humaines (11) (13).

Genres	Sous-genres	Classes	Espèces
<i>Alphacoronavirus</i>	Duvinacovirus	—————	HCoV-229 E (1996)
	Setracovirus		HCoV-NL63 (2004)
<i>Betacoronavirus</i>	Embecovirus	Classe A	HCoV-OC43 (1967) HCoV-HKU1 (2005)
	Sarbecovirus	Classe B	SARS-CoV-1 (2003) SARS-CoV-2 (2019)
	Merbecovirus	Classe C	MERS-CoV (2012)

III. Maladie COVID-19 :

La maladie COVID-19 a d'abord commencé à se propager en Chine, puis dans presque toutes les régions du globe. Alors que de plus en plus de cas étaient confirmés, de nombreux pays dans le monde ont annoncé des restrictions de transport et mis en place une quarantaine (12). Les résultats ont révélé que non seulement les personnes atteintes de la maladie qui présentaient une gamme de symptômes pouvaient transmettre le virus, mais même celles qui ne développaient pas de symptômes étaient porteuses du virus (13). Dans certains cas, les personnes infectées par le virus sans présentant des symptômes de COVID-19 ou même présentant des symptômes légers de la maladie. D'autre part, les signes de la maladie peuvent

passer de légers et modérés à aigus (critiques) et devenir graves, nécessitant des soins particuliers pour le patient avec le développement du syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) et l'accumulation de liquides dans les poumons. (13) (14).

Selon des recherches épidémiologiques, les résultats cliniques (allant de l'asymptomatique au décès) sont fortement influencés par des facteurs tels que l'âge, les caractéristiques démographiques, la qualité des soins cliniques et d'autres paramètres potentiels inconnus (15) (16)

De plus, une alimentation saine est reconnue comme un autre facteur important dans la prévention du développement de la forme grave de la maladie en renforçant le système immunitaire (17). La présence de certaines maladies sous-jacentes (par exemple, le diabète) chez une personne est un autre facteur affectant la probabilité accrue de développement de la COVID-19 et l'incidence d'un état grave de la maladie (Figure 01) (18). Dans le même temps, le virus peut provoquer des pneumonies bactériennes (19). Pour s'assurer de la présence du virus dans le corps, des tests moléculaires par réaction en chaîne par polymérase (PCR) sont effectués. L'autre technique est la tomodensitométrie du thorax. De plus, le nombre de globules blancs, de créatine phosphokinase (CPK), de vitesse de sédimentation des érythrocytes (ESR), de protéine c-réactive (CRP) et de lactate déshydrogénase D (LDHD) est mesuré dans le sang.(13),(20)

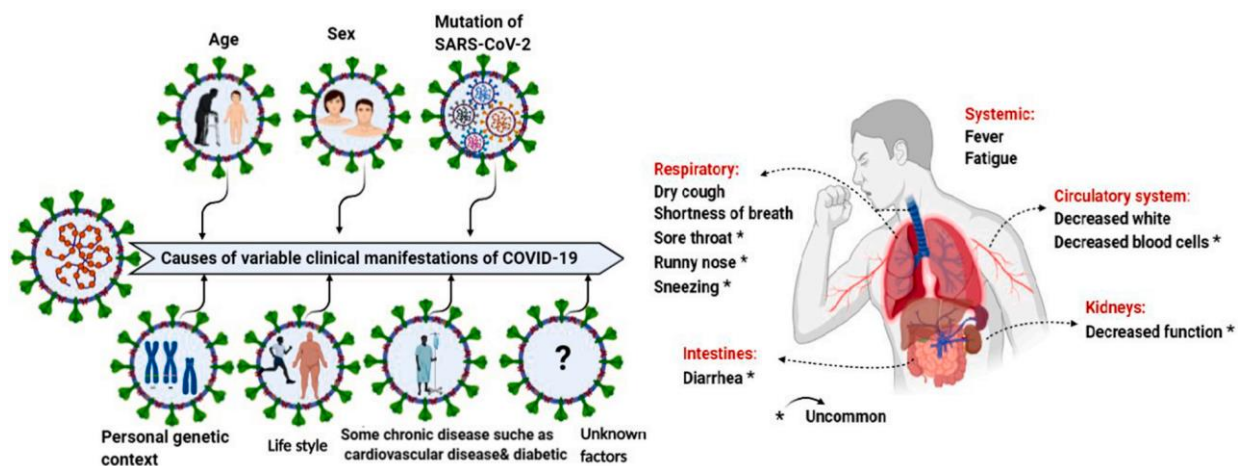


Figure 01.Facteurs d'influence possibles sur les symptômes variables et la gravité de la COVID-19.

IV. Coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère 2 (SARS-CoV-2) :

Le SRAS-CoV-2 appartient à une grande famille de virus connus sous le nom de coronavirus. Les coronavirus sont le plus grand groupe de virus appartenant aux Nidovirales contenant les familles Coronaviridae, Roniviridae et Arteriviridae. Les Coronaviridae sont une

famille de virus à ARN enveloppé simple brin de sens positif, avec un génome d'une longueur comprise entre 26 et 32 kilobases. Ce groupe viral comprend quatre genres différents, à savoir Alpha, Bêta, Gamma, et Delta, et englobe divers coronavirus humains et animaux (21). Le coronavirus humain a été identifié pour la première fois au milieu des années 1960. Jusqu'à présent, sept coronavirus humains ont été identifiés qui appartiennent à la Alpha et Bêta genres ; comme représenté dans Figure 2, genre Alpha, y compris (coronavirus humain NL63 (HCoV-NL63) et coronavirus humain 229E (HCoV-229E)) et le genre Beta, y compris (coronavirus humain OC43 (HCoV-OC43), coronavirus humain HKU1 (HCoV-HKU1), coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère (SARS-CoV), le coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient (MERS-CoV) et le SARS-CoV-2 actuel) (22). Ils provoquent un large éventail de maladies, y compris le rhume et les maladies respiratoires avec des symptômes légers et aigus.

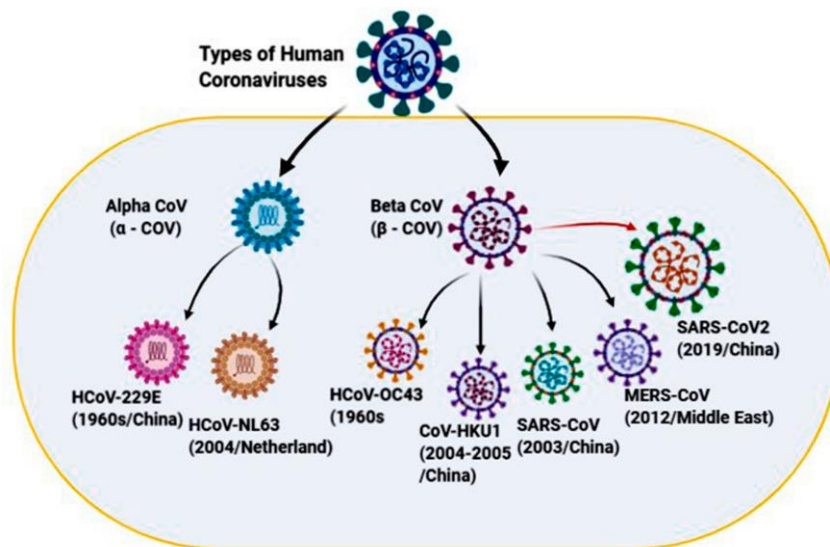


Figure 2. Classification et épidémies de coronavirus dans la société humaine.

À ce jour, cinq coronavirus appartenant à la lignée bêta-coronavirus ont été détectés en association avec une pneumonie aiguë chez l'homme (Figure 2) (23). Le SARS-CoV-2 est le troisième coronavirus après le MERS et le SARSCoV (24,25).

Il a été signalé que les chauves-souris sont un hôte essentiel pour certains coronavirus. Les exemples incluent le SRAS-CoV, un virus avec des symptômes respiratoires aigus qui s'est propagé à travers la Chine, tuant des centaines de personnes en 2003-2004. Après cela, le MERS-CoV a été signalé au Moyen-Orient en 2012 ; les deux virus provenant de chauves-souris ont causé l'infection et la mort de nombreuses personnes (23,26). En 2020, une nouvelle maladie avec une prévalence mondiale croissante a été nommée COVID-19 par l'Organisation

mondiale de la santé La pandémie de COVID-19 est récemment apparue puis s'est rapidement propagée dans plus de 200 pays dans le monde jusqu'à présent. Selon l'Organisation mondiale de la santé, 39,8 millions de cas mondiaux de COVID-19 ont été confirmés le 16 octobre avec un taux de mortalité de 3,4 %.

V. La biologie du SRAS-CoV-2 :

Les protéines structurales et non structurales du génome du virus sont codées dans les séquences du cadre de lecture ouvert (ORF) (Figure 3). Près de 14 ORF ont été séquencés dans le génome du SRAS-CoV-2 à ce jour (27).

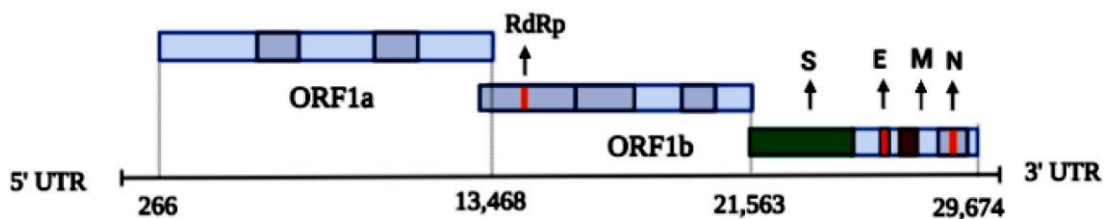


Figure 3. L'organisation génomique du SRAS-CoV-2

L'analyse moléculaire du nouveau coronavirus a indiqué qu'il possède un génome d'ARN à sens positif simple brin, dont la taille varie entre 29,8 kb et 29,9 kb, soit de 60 à 140 nm de diamètre. Son génome est homologue à près de 80 % avec le SRAS-CoV, et près de 96 % de ses gènes sont partagés avec le coronavirus de la chauve-souris (Bat-CoV) (28). Chacun de ces ORF est responsable du codage de 17 protéines, à la fois structurales et non structurales, qui pilotent divers processus tout au long de la vie du virus, de sa survie à sa virulence. (29,30)

Le génome commence par 5'UTR, qui consiste en un nombre variable (entre 6 et 11) d'ORF, y compris ORF1ab, ORF3, ORF6, ORF 7a, ORF 8 et ORF10. Le SRAS-COV 2 possède huit protéines accessoires (3a, 3b, p6, 7a, 7b, 8b, 9b et orf14), codées respectivement par les gènes ORF3a, ORF6, ORF7a, ORF7b et ORF8. Ces gènes contiennent des informations vitales pour la réplication du virus, qui ont été préservées à travers les générations successives (21)

- **1. Protéines non structurales :**

Au cours de la phase de transformation du virus, le premier événement est l'expression des segments de gènes orf1ab et orf1a pour produire deux grandes polyprotéines nommées pp1ab et pp1a. Ces deux polyprotéines sont ensuite clivées en 16 Nsp, dont Nsp1 à Nsp10 et Nsp12 à Nsp16 par l'action de deux enzymes protéases faisant partie de chacun de ces polypeptides

nommés papaine-like proteases (PLpro) (31). Ces Nsps participent à de nombreux processus viraux ; par exemple, le Nsp3 est le composant le plus important parmi les autres constituants qui forme le complexe de réplication et de transcription des coronavirus, dont le clivage par la protéinase PL entraînerait la promotion de l'expression des cytokines et la suppression de la réponse immunitaire innée de l'hôte. La protéase 3CLPro, en tant qu'autre Nsp, joue un rôle essentiel dans la réplication de l'ARN. De nombreuses Nsps codées dans ORF1ab, y compris Nsp5, Nsp3 et l'ARN polymérase dépendante de l'ARN (RdRp, Nap12), sont responsables de l'assemblage du complexe répliques-transcriptase dans les vésicules à double membrane (DMV) (32). D'autres répliques sont constituées de protéines qui facilitent la réplication virale et bloquent le système immunitaire intrinsèque de l'hôte en contrôlant la machinerie cellulaire. Nsp8 et Nsp12 sont deux RdRps monomères impliqués dans le processus de réplication du SARS-CoV-2. Nsp8 réplique le génome du virus à travers interagissant avec la protéine accessoire ORF6 et la protéine réplique Nsp9, en se liant à l'ARN. Contrairement à Nsp12, Nsp8 a une capacité de primase qui rend inutile toute amorce pour initier le processus de réplication virale.

En plus de ces polymérases, le SARS-CoV-2 possède une ARN polymérase multimérique unique composée de Nsp7 et Nsp8, qui est responsable à la fois de l'initiation et de l'allongement du fragment nouvellement synthétisé du génome viral (22,29).

- **2. Protéines structurales :**

Le 3' L'extrémité du génome du SRAS-CoV-2 se compose de quatre gènes codant pour les protéines structurales, qui comprennent la pointe (S), la membrane (M), l'enveloppe (E) et la nucléocapside (N). De l'entrée dans les cellules hôtes à la formation de particules virales, divers processus viraux dépendent de ces protéines (Figure 4) (27,31,32)

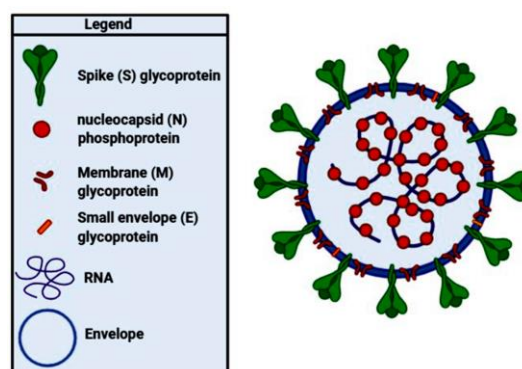


Figure 4. Structure schématique du SRAS-CoV-2 avec l'ensemble minimal de protéines structurales.

- **2.1. Protéine S :**

La pointe ou glycoprotéine S est une protéine transmembranaire qui réside sur la surface

externe du virus, avec un poids moléculaire de près de 150 kDa qui détermine la gamme d'hôtes et la pathogénicité du virus par sa contribution à l'entrée virale en médiant l'attachement de la particule virale à la membrane plasmique de la cellule hôte. La protéine S du SARS-CoV-1 et du SARS-CoV-2 forme des homo-trimères saillants dans la surface virale qui facilite l'entrée virale dans les cellules hôtes en interagissant avec l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 (ACE2) qui est leur principal récepteur exprimé dans les cellules des voies respiratoires inférieures. Cependant, dans certaines circonstances, ils pourraient utiliser CD209L comme récepteur alternatif. En revanche, le MERS-CoV utilise la dipeptidyl peptidase 4 (DPP4) comme récepteur principal. Ces virus se propagent entre différents types de cellules à l'aide de ce mécanisme qui supprime les réponses d'anticorps neutralisant le virus (22,27,31).

- **2.2. Protéine M :**

La membrane ou protéine M détermine la forme de l'enveloppe du virus. Il peut fonctionner comme une petite protéine transmembranaire en se liant à toutes les autres protéines structurales. La protéine M contribue également à l'encapsidation du génome de l'ARN viral dans une ribonucléocapside hélicoïdale lors de la formation du virion.(22).

- **2.3. protéine N :**

La nucléocapside ou protéine N est le constituant structurel du SRASCoV-2 qui est lié au génome ARN du virus. Cette protéine participe à divers processus liés au génome viral, notamment le cycle de réplication des virus, la signalisation du génome viral et la réponse des cellules hôtes aux infections virales.(28,31).

- **2.4. Protéine E :**

Les preuves structurales montrent que le terminal N-amino de l'enveloppe ou de la protéine E est une courte séquence hydrophile composée de 7 à 12 acides aminés. Il est suivi d'un grand segment médian hydrophobe avec 25 acides aminés connu sous le nom de domaine transmembranaire et possède une longue extrémité C-terminale hydrophile qui constitue l'essentiel de la protéine. La protéine E est impliquée dans les processus de production et de maturation du virus en interagissant avec la protéine membranaire de la cellule hôte.(28)

VI. Le mécanisme de l'infection par le SRAS-CoV-2

La présence de la protéine S dans le processus de pathogenèse du SARS-CoV-2 est critique. La protéine Spike utilise une aminopeptidase liée à la membrane appelée ACE2 comme récepteur cellulaire primaire qui se lie à la dipeptidyl peptidase-4 sur le virus [27]. L'ACE2 est largement exprimé dans les différents organes, y compris le cœur, les poumons, le

tractus gastro-intestinal et les reins [27]. La transmission du signal via ACE2 est perturbée lorsque de graves lésions myocardiques et un dysfonctionnement des poumons et d'autres organes tels que les reins et le cœur sont induits lorsque le virus se fixe au récepteur ACE2.28].

En outre, la détermination de la spécificité des cellules cibles est influencée par l'interaction de la glycoprotéine S avec les récepteurs cellulaires. L'emplacement du domaine de liaison au récepteur (RBD) dans le domaine S1 de la protéine S est déterminé par la structure de chaque virus, qui peut être variable. Les régions RBD sont situées au terminal N ou au terminal C1 de S1. Le SRAS-CoV-2 utilise certaines peptidases comme récepteurs cellulaires, bien que leur entrée se produise même en l'absence d'enzymes secondaires (31,33).

Après s'être attaché au récepteur, le virus pénètre dans le cytosol de la cellule hôte par la protéase transmembranaire sérine 2 (TMPRSS2) ou d'autres protéases telles que la furine, et fusionne les membranes virale et cellulaire. La glycoprotéine de pointe SARSCoV-2 contient un site semblable à une fente. L'emplacement de détection de la furine est crucial pour la détection par pyrolyse et, par conséquent, dans l'infection virale du virus.

Cette glycoprotéine est décomposée par la furine protéinase en une sous-unité S1 et S2 comme une cellule hôte. L'infection commence par l'interaction de S1, contenant RBD, avec le récepteur hôte ACE2, dans la membrane cellulaire. Le domaine S2 est une protéine de fusion virale et est impliqué dans un mélange de glandes à virions. Immédiatement après l'entrée du virus dans la cellule, la glycoprotéine S est clivée par la cathepsine CTSL pour tuer le peptide de fusion S2, puis forme une endocytose et des endosomes à faible pH, activant ainsi la fusion des membranes dans les endosomes. A la jonction entre la membrane virale et la membrane cellulaire, se forme un faisceau susceptible de libérer le génome viral dans le cytoplasme. L'étape suivante du cycle d'infection est la traduction des répliques de gènes à partir du virus à ARN.

Les deux protéines polymères pp1a et pp1 ab sont codées par deux grandes protéines, ORF rep1a et rep1b. Une séquence glissante (5'-UUUAAAC-3') et un pseudo-nœud d'ARN aident à exprimer ces protéines, conduisant à une déformation de la forme de lecture rep1a dans l'ORF rep1b. Habituellement, le ribosome ouvre la structure du pseudonœud et poursuit le processus de traduction jusqu'à ce qu'il rencontre une pause ou atteigne la fin des 11 répétitions dans le codon. Mais parfois, le ribosome est arrêté par le pseudonœud, ce qui empêche de s'étirer et de rester dans la séquence glissante, et arrête le cadre de lecture des nucléotides avec un décalage vers l'arrière qui entraîne la traduction de pp1ab. Après le processus de traduction, l'ARN viral est synthétisé et les complexes de réplication virale sont collectés. L'ensemble des répliques virales par le processus de transcription entraîne des effets cytopathiques tels que

des anomalies dans les complexes vasculaires. Dans la région en aval des protéines ridicules,(35).

L'étape suivante est la liaison et la traduction des glycoprotéines structurales du virus, y compris S, M et E en ER. Ces protéines sont sécrétées dans la chambre intermédiaire ER Golgi (ERGIC). Ici, les génomes viraux qui codent pour les protéines structurales sont encapsulés par la protéine Ngerme dans la membrane ERGIC et deviennent des virus matures. L'interaction protéine-protéine est principalement médiée par la glycoprotéine M, qui est responsable de la collecte des CoV. La protéine M, exprimée avec la protéine E, est impliquée dans la formation de particules pseudo-virales (VLP) ainsi que dans la formation de revêtements pour les CoV. Alors que la glycoprotéine N provoque la formation de VLP, une combinaison de génomes codés en ERGIC améliore la croissance du virus. Dans la chambre ERGIC, la glycoprotéine S interagit avec la glycoprotéine M car elle est essentielle à sa synthèse. source de motivation pour masquer la puberté. La glycoprotéine modifie la voie de sécrétion de l'hôte et libère l'accumulation du virus dans l'hôte. La protéine M se fixe à la nucléocapside située à l'extrémité C-terminale de l'endo domaine M et signale l'achèvement de l'assemblage viral. Après assemblage, les virus sont transmis par des vésicules à la membrane de la cellule hôte et sont libérés par exocytose. En étant transportée à la surface cellulaire, la protéine S combine la fusion cellulaire entre les cellules infectées et saines, résultant en une grande cellule multinucléée qui propage le virus chez l'hôte et fournit les conditions pour la détection d'anticorps spécifiques contre le virus (Figure 5) (35)

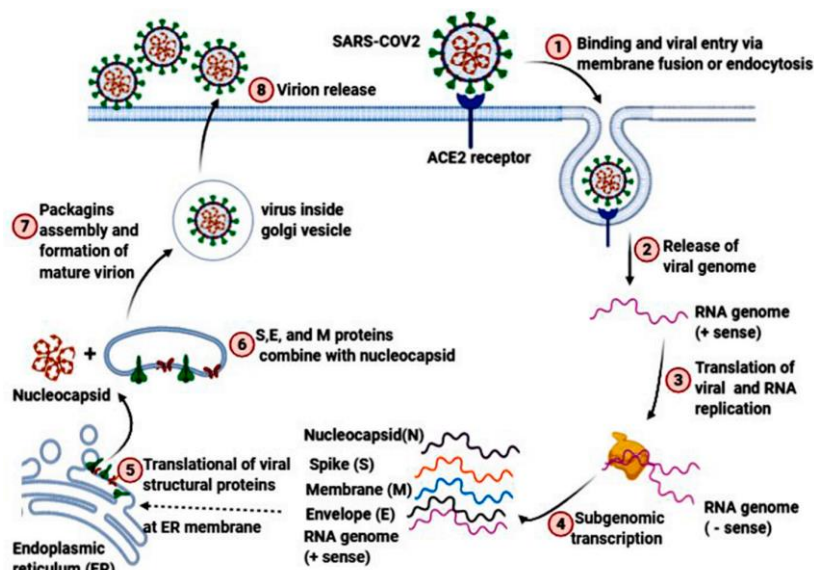


Figure 5.Le mécanisme de l'infection et de la propagation du coronavirus.

VII. Cycle de vie du SRAS-CoV-2 :

Le coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS-CoV-2) appartient aux virus à ARN à sens positif enveloppés. Ce virus se caractérise par des pointes en forme de massue à la surface et une stratégie de réplication unique. L'entrée cellulaire des coronavirus dépend de la liaison des protéines virales de pointe (S) aux récepteurs cellulaires et de l'amorçage de la protéine S par les protéases de la cellule hôte. Découvrir quels facteurs cellulaires sont utilisés par le SRAS-CoV-2 pour l'entrée pourrait fournir des informations sur la transmission virale et révéler des cibles thérapeutiques. (37)

1- Entrée de virus :

Le SARS-CoV-2 peut détourner la cellule de deux manières, soit via les endosomes, soit via la fusion de la membrane plasmique. (Dans les deux sens) Les protéines de pointe (S1, S2) du SARS-CoV-2 assurent la fixation à la membrane d'une cellule hôte et engagent l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 (ACE2) en tant que récepteur d'entrée.1 Des inhibiteurs comme la Griffithsine (Inhibiteur III) se lient à la glycoprotéine de pointe, empêchant ainsi l'entrée virale. La vimentine de surface cellulaire (VIM) agit comme un co-récepteur critique et est essentielle pour une liaison réussie à l'ACE-2.2 La liaison de l'héparane sulfate (HS) au domaine de liaison au récepteur (RBD) améliore également la liaison à l'ACE2. L'adhésion virale peut être inhibée par l'héparine exogène. L'héparine entre en compétition avec HS pour la liaison de la protéine S du SARS-CoV-2. (38)

Lorsque les virions sont absorbés dans les endosomes, la cathepsine L active la protéine de pointe. La cystéine protéase dépendante du pH peut être bloquée par des agents lysosomotropes, comme la bafilomycine A1 ou le chlorure d'ammonium (classes d'inhibiteurs IV, V). Alternativement, la protéine de pointe peut être clivée entre les domaines S1 et S2 par la sérine protéase cellulaire TMPRSS2 à proximité immédiate du récepteur ACE2, qui initie la fusion de la membrane virale avec la membrane plasmique (Inhibiteur II : Camostat). 1 L'entrée de fusion de la membrane plasmique est moins susceptible de déclencher l'immunité antivirale de la cellule hôte et donc plus efficace pour la réplication virale (38)

2- Traduction des machines de réplication virale et réplication :

Une fois l'ARN viral libéré dans la cellule hôte, les polyprotéines sont traduites. L'ARN génomique du coronavirus code pour des protéines non structurales (NSP) qui ont un rôle essentiel dans la synthèse de l'ARN viral, et des protéines structurales qui sont importantes pour l'assemblage du virion. Tout d'abord, les polyprotéines pp1a et pp1ab sont traduites et clivées par la protéase de type papaïne (PLpro, Nsp3) et la protéase de type 3C (3CLpro, Nsp5)

(inhibiteur VIII) pour former des NSP fonctionnels tels que l'hélicase ou l'ARN répliquase-transcriptase complexe (RdRp).⁵ RdRp en particulier peut être inhibé par des virostatiques comme le Favipiravir ou le Penciclovir (Inhibiteur VI) ; la réplication de l'ARN viral en général par des inhibiteurs de la voie de signalisation des kinases comme le Saracatinib (Inhibiteur VII). Le niveau d'expression de la protéine N peut être diminué par le resvératrol (inhibiteur X).⁽³⁹⁾

L'une des premières protéines traduites est le facteur d'arrêt de l'hôte Nsp1. Cette protéine virale interfère avec la traduction et provoque une dégradation accélérée de l'ARNm de l'hôte, supprimant ainsi la réponse immunitaire innée de l'hôte. ⁽⁴⁰⁾

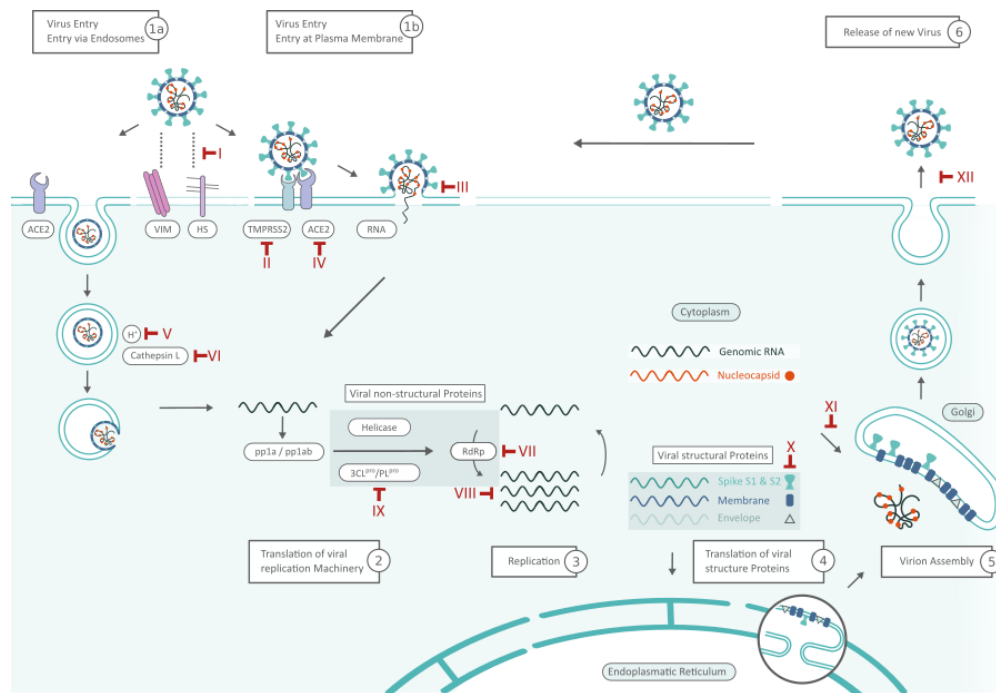
3- Traduction des protéines de structure virale et assemblage de virions :

RdRp (Nsp12) est responsable de la réplication de l'ARN de la protéine structurale. Les protéines structurales S, Enveloppe (E), Membrane (M) sont traduites par des ribosomes liés au réticulum endoplasmique (RE). L'ER forme des vésicules à double membrane (DMV) dans lesquelles l'ARN viral est répliqué et protégé du système immunitaire inné de l'hôte. Nsp3 crée des pores à travers lesquels l'ARN viral quitte les DMV pour l'assemblage du virion. Les protéines de la nucléocapside (N) restent dans le cytoplasme et sont assemblées à partir de l'ARN génomique. Ils fusionnent avec le précurseur du virion qui est ensuite transporté du RE à travers l'appareil de Golgi jusqu'à la surface cellulaire via de petites vésicules.

4- Libération de virus :

Les virions sont ensuite libérés de la cellule infectée par exocytose et recherchent une autre cellule hôte. L'oseltamivir inhibe le clivage des acides sialiques par la neuroamidase à partir des récepteurs cellulaires, empêchant ainsi la libération de virions nouvellement formés à partir de la surface cellulaire (inhibiteur XI). Une caractéristique qui distingue le SARS-CoV-2 des autres coronavirus comme par ex. Le SRAS-CoV-2 est un deuxième site de clivage de la protéine S. Le clivage de la furine au site S1/S2 a probablement lieu lorsque les virions sont libérés par l'appareil de Golgi ou les lysosomes. Il amorce la protéine S pour une deuxième coupe au site S2 par TMPRSS2. Certaines mutations au sein de ce site sont également caractéristiques des variantes préoccupantes du SRAS-CoV-2 alpha (B.1.1.7), bêta (B.1.351), delta (B.1.617.2) et omicron (B.1.1.529) . ⁽⁴⁰⁾

Le figure 06 explique le cycle de réplication du SRAS-CoV-2 avec les inhibiteurs possibles et leurs cibles respectives. Cette compilation est basée sur la littérature actuelle, mais nous ne prétendons pas à son exactitude.



Figur 06 :Cycle de réplication du SRAS-CoV-2

VIII. Variabilités génétiques du SARS-CoV-2 :

La variabilité génétique des virus présente un intérêt considérable sur le plan médical et biologique, car elle a un impact important non seulement sur la prévention et le diagnostic des maladies infectieuses, mais aussi pour les potentielles perspectives de thérapie. Les mutations, délétions et recombinaisons sont considérées comme les origines de la variabilité génétique du SARS-CoV-2. Les mutations sont le fondement de l'évolution et la source de la variation génétique puisqu'elles peuvent fournir la variabilité nécessaire sur laquelle la sélection naturelle peut agir et générer de la diversité (36). Les virus à ARN sont particulièrement susceptibles d'avoir des taux de mutation élevé pendant la réplication du génome et sont le plus souvent sans effets. Parfois, ces taux élevés sont corrélés à une transmissibilité et / ou un échappement immunitaire accrue, des caractéristiques qui sont considérées comme bénéfiques pour les virus (37).

Il est connu que dans la plupart des virus à ARN, l'ARN polymérase ARN dépendante n'a pas d'activité correctrice, à quelques exceptions dont les coronavirus tels que le SARS-CoV-2. En plus des mutations, la recombinaison génomique est un événement courant du processus de réplication chez les coronavirus et peut jouer un rôle important dans la génération de la diversité (38). La recombinaison est dirigée par la protéine non structurale nsp14 3-5' exoribonuclease (Nsp14-ExoN). Il a été démontré que l'inactivation génétique *in vitro* de Nsp14-ExoN diminuait de manière significative la fréquence et les modèles modifiés de

recombinaison dans les cellules infectées et les virions libérés (38). Ainsi, le taux élevé de mutations observé dans les virus à ARN, dû à l'absence ou la déficience de l'activité de relecture conduit à une hétérogénéité génétique qui les aide à s'adapter et à surmonter les défis environnementaux tels que le changement d'hôte, le traitement antiviral et les réponses immunitaires, mais d'un autre côté, l'accumulation de mutations délétères excessives peut entraîner des erreurs qui peuvent conduire à l'extinction de l'espèce virale (39)(40). Ainsi, l'environnement peut exercer une pression sélective sur les mécanismes impliqués dans l'ajustement du taux de mutation en contrôlant le processus de réplication des organismes à grand génome, notamment les coronavirus comme le SRAS-CoV-2 qui, parmi d'autres virus à ARN, contiennent des génomes plus grands et présentent une activité 3' -5' ExoN différente de celle des virus à génome plus court où cette activité est absente (41).

Les mutations les plus importantes SARS-CoV 2 ont un impact sur :

- La transmissibilité des souches
- La sévérité de la maladie
- L'efficacité des vaccins
- Le diagnostic virologique

L'impact des nouveaux variants du SARS-CoV-2 sur les performances des tests PCR n'est pas significatif à ce jour car la plupart des tests PCR utilisés dans le monde continuent de détecter l'infection, y compris le nouveau variant Omicron en se basant sur plusieurs cibles virales dont les plus utilisées sont situés dans les gènes : S (Spike), E (enveloppe), N (nucléocapside) et RdRp (ARN polymérase ARN dépendante de l'ORF1ab) (42).

IX. REPONSE IMMUNITAIRE A L'INFECTION PAR SARS-CoV-2 ET IMMUNOPATHOLOGIE DU COVID-19:

1. Réponse immunitaire innée:

Dès les premiers signes d'infection, la réponse immunitaire innée constitue une barrière primordiale contre les dommages causés par la multiplication virale. Déclenchée par la reconnaissance de caractéristiques moléculaires virales ou cellulaires, cette réponse a tendance à produire des cytokines pro-inflammatoires, des chimiokines et des interférons de type I (IFN) ce qui permet par la suite le recrutement d'autres cellules immunitaires ainsi la mobilisation et la coordination de la réponse requise pour contenir et éradiquer l'infection (43).

Certes, l'entrée du virus dans la cellule hôte déclenche la stimulation de la réponse immunitaire. Les cellules du système immunitaire inné rencontrent d'abord le virus via les

cellules présentatrices d'antigènes (CPA), telles que les cellules dendritiques et les macrophages, qui constituent la première ligne du système immunitaire. Les CPA possèdent des récepteurs de reconnaissance de motifs PRRs (*Pattern Recognition Receptors*) notamment des récepteurs de type TLR (*Toll- Like Receptor*), situées dans la membrane plasmique ou dans la membrane endosomale. Ils reconnaissent l'ARNg du SARS-CoV-2 et induisent une cascade de signalisation pour générer des cellules effectrices du système immunitaire.

D'ailleurs, chacune des PRRs peut induire une réponse biologique différente en fonction de l'activation ultérieure de la protéine (43).

En effet, suite à une exposition contaminante, le SARS-CoV-2 infecte les cellules épithéliales et immunitaires résidentes alvéolaires à travers la combinaison de la protéine *Spike* virale et de l'ACE2, ce qui amène la partie intracellulaire de l'ACE2 à activer l'enzyme de conversion du TNF α (*Tumor Necrosis Factor*) ou TACE (*TNF α converting enzyme*) responsable de la sécrétion de TNF α . De plus, la reconnaissance de la protéine *Spike* par les TLR-4 des monocytes conduit à la transduction du signal NF- κ B (*Nuclear factor-kappaB*) qui provoque la sécrétion de l'interleukine-6 (IL-6) responsable d'une inflammation locale (9)(43).

Outre, l'activation du récepteur endosomale TLR-3 à travers la reconnaissance du génome viral induit l'activation de la protéine adaptatrice MyD88 (*Myeloid differentiation factor 88*) qui conduit directement au recrutement de la protéine adaptatrice TRIF (*TIRcontaining adapter inducing IFN β*) activant par la suite les facteurs de transcription IRF-3 (*Interferon regulatory factor-3*) qui migrent vers le noyau nucléaire et entraîne la transcription des gènes de l'IFN, et des IFN-dépendant. Par ailleurs, l'activation d'autres récepteurs endosomaux TLR-7 et TLR-8 conduit de la même façon au recrutement de l'adaptateur MyD88 qui déclenchera l'activation des facteurs de transcription IRF-7 stimulant ainsi l'expression de plusieurs gènes pro-inflammatoires notamment IFN- α , IFN- β et IFN γ . En parallèle, l'activation de la voie de NF- κ B stimule des événements séquentiels de phosphorylation permettant la phosphorylation de IKK α et IKK β (*Inhibitor of Nuclear factor-kappaB kinase*), qui sont des kinases cruciales impliquées dans la phosphorylation de la protéine I κ B inhibitrice qui est liée aux sous-unités NF- κ B p50 et p65. En effet, la phosphorylation de I κ B marque cette protéine pour l'ubiquitination et pour la dégradation protéasomique, libérant ainsi les dimères pour qu'ils se déplacent dans le noyau et se lient à des régions amplificatrices spécifiques et initient l'expression des cytokines pro-inflammatoires dont le pro-IL-1 stimulés, notamment pro-IL-1 β , pro-IL-18, TNF et IL-6 (Figure 09) (27).

En plus, le virus est également reconnu par le complexe inflammasome NLRP3 cytoplasmique, qui se compose d'un récepteur (NLRP3) de type NOD (*Nucleotide-Binding*

Oligomerization Domain), d'un adaptateur (ASC ou *apoptosis-associated speck-like protein*) et d'un effecteur caspase-1 (Casp-1) (48). L'activation de l'inflammasome NLRP3 est définie par l'oligomérisation de NLRP3 qui recrute l'ASC, amenant à l'activation de la Casp-1 et à la libération des formes matures d'IL-1 β et d'IL-18 (49). Ainsi, les cytokines IL-1 β , IL-18 et TNF se lient à des récepteurs spécifiques et favorisent non seulement la translocation nucléaire de NF- κ B mais aussi la phosphorylation de p38 MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*) ce qui entraîne une grande expression de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires (Figure 09) (47). D'une autre part, L'IL-6 se lie aux récepteurs IL6-R et gp130 pour activer la voie JAK/STAT-3 (*Janus Kinase /Signal Transducers and Activator of Transcription-3*) et contribuer ensuite au syndrome de libération des cytokines observés chez les patients COVID-19 (Figure 09) (47). Par conséquent, cette sécrétion des cytokines pro-inflammatoires est la réponse initiale de défense contre l'infection virale contre SARS-CoV2. Cependant, l'inefficacité de la réponse immunitaire initiale entraîne une amplification de la réponse inflammatoire, responsable d'une aggravation clinique chez certains patients, et s'accompagne de plusieurs signes d'hyperactivation du système immunitaire (9), notamment une libération excessive de cytokines pro-inflammatoires et des chimiokines parmi elles : CXCL17 (capable de recruter les macrophages alvéolaires), CCL2 et CCL8 (associées au recrutement des polynucléaires neutrophiles) CCL7 (recrutant les monocytes) et CXCL9/CXCL16 (recrutant les lymphocytes T et NK) (Figure 09) (9) (43).

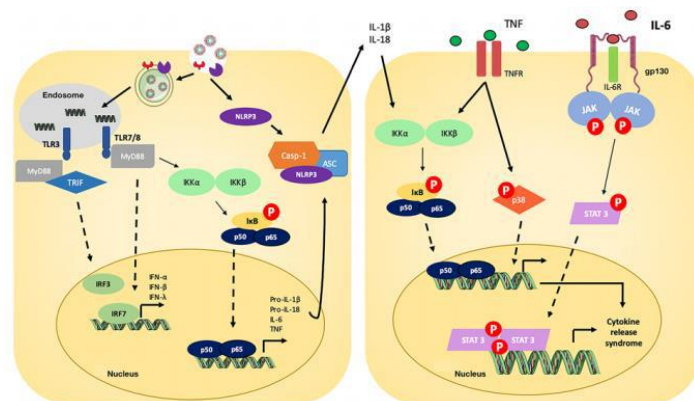


Figure 07 : Activation des voies de signalisations et libération des cytokines suite à l'infection par SARS-CoV-2 (46).

2. Réponse immunitaire adaptative :

La reconnaissance des antigènes viraux par les CPA entraîne une activation des cellules T, B et NK (*Natural killer*), déclenchant une réponse lymphocytaire B mémoire convergant à une production d'anticorps spécifiques et neutralisants, et une réponse lymphocytaire T et NK

antivirale avec expression de marqueurs d'exhaustion, ainsi qu'une apoptose lymphocytaire (Figure 10) (8).

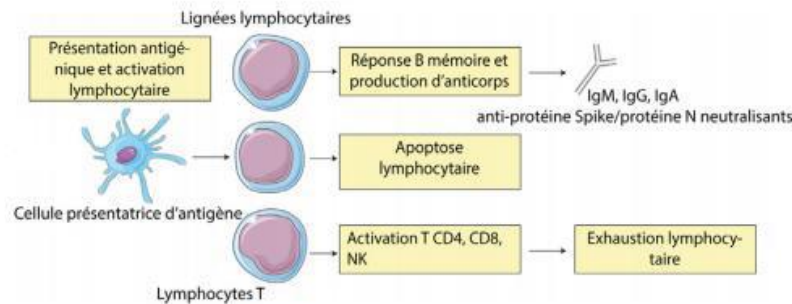


Figure 08: Réponse immunitaire adaptative (8).

La réponse immunitaire adaptative humorale et cellulaire lors de l'infection SARS-CoV2 est dirigée contre de très nombreux antigènes du virus (protéine S et ses composants, nucléocapside, ORF9b, nsp5, et autres (Figure 11), la réactivité semblant plus forte contre certaines protéines par exemple contre la protéine S entière que contre le RBD (22).

	ORF1a	ORF1b	S	ORF3	Env	MP	ORF6	ORF7a	ORF7b	ORF8a	ORF8b	NC	ORF9b	ORF10
Anticorps			■		■	■								
Anticorps Neutralisants			■											
Réponse CD4+	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
Réponse CD8+	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	

Figure 09: Protéines du SARS-CoV-2 ciblées par la réponse immunitaire adaptative (22).

• **2.1 Réponse immunitaire cellulaire:**

Les cellules T jouent un rôle fondamental dans les infections virales : les cellules T CD4 fournissent une aide aux cellules B pour la production d'anticorps et coordonnent la réponse des autres cellules immunitaires, tandis que les cellules T CD8 tuent les cellules infectées pour réduire la charge virale de l'infection (50).

La CPA présentera l'antigène du SARS-CoV-2 aux cellules T-helper CD4+ via le CMH (*Complexe Majeur d'Histocomptabilité*) de classe 1 conduisant à la libération de l'IL-12 comme molécule co-stimulatrice, stimulant d'avantage l'activation des cellules Th1 qui sécrètent du GM-CSF (*Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor*), produisant encore plus de monocytes CD14+CD16+ avec des taux élevés d'IL-6. L'augmentation de la sous-population de monocytes CD14+IL-1β+ favorise la production accrue d'IL-1β. Ainsi, dans le cas d'infection par le SARS-CoV-2, les cellules Th17 produiront de l'IL-17 pour recruter davantage de monocytes, de macrophages et de neutrophiles au site de l'infection et stimuler d'autres

cascades de cytokines, telles et chimiokines pro-inflammatoires, notamment IL-1, IL-6, IL-8, IL-21, TNF- β et MCP (*Monocyte chemoattractant protein*) (Figure 12) (23).

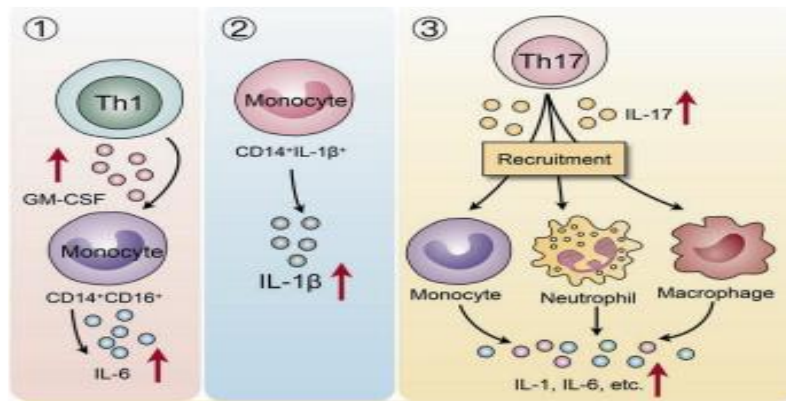


Figure 10: Réponse immunitaire des cellules T4 (50).

Ensuite, l'activation des cellules Th1 pourrait stimuler les cellules T CD8, ces derniers représentent environ 80 % des cellules ardentes infiltrées dans l'interstitium pulmonaire dans les cas de syndrome respiratoire aiguë chez les patients infectés par le SARS-CoV-2, elles sont cytotoxiques et vont cibler ainsi tuer les cellules infectées par le virus. Dans le même temps, les cellules T CD4 peuvent stimuler les réponses immunitaires humores en activant les lymphocytes B dépendants des cellules T (23).

- **2.2 La réponse immunitaire humorale :**

La neutralisation de l'infection par les anticorps est un mécanisme de protection contre les virus. Dans le cas des virus enveloppés, les anticorps peuvent recruter des cellules effectrices ou le complément, permettant ainsi la destruction des cellules infectées ou la lyse des particules virales (8). En fait, la réponse immunitaire humorale est essentielle à la clairance des virus cytopathiques et constitue un élément majeur de la réponse mémoire qui prévient la réinfection.

Le SARS-CoV-2 suscite une réponse robuste des lymphocytes B, qui est démontrée par la détection d'immunoglobuline (Ig) spécifique. La réponse humorale initiale, spécifique du SARS-CoV-2, est généralement dominée par des niveaux accrus du taux des anticorps d'isotype IgA (51). La primo-infection est caractérisée aussi par la présence d'anticorps IgM détectables 3 à 7 jours après le début de l'infection.

En outre, la réponse humorale secondaire est identifiée par l'élévation des IgG spécifiques, s'accompagnant souvent d'une augmentation des IgM (52). En effet, au cours de la troisième semaine suivant l'apparition des premiers symptômes, la totalité (100%) des patients développent une réponse humorale avec une production d'IgG spécifiques de la protéine S, et

environs (84%) des patients produit des IgM spécifiques du virus, indiquant ainsi que les séroconversions pour les IgG et pour les IgM sont détectables de façon concomitante (Figure 13) (51).

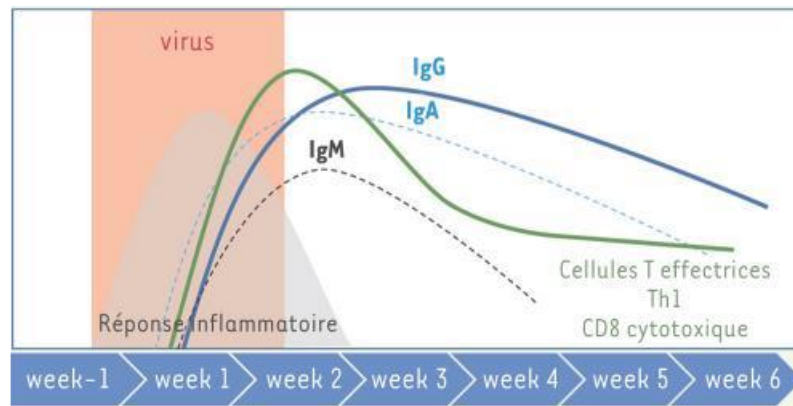


Figure 11: Cinétique des réponses humorales et cellulaires contre le SARS-CoV-2 (51).

3. Immunopathologie du COVID-19 :

L'induction d'une immunité robuste des cellules T est probablement essentielle pour un contrôle efficace du virus. Cependant, les réponses dérégulées des cellules T peuvent entraîner une immunopathologie et contribuer à la gravité de la maladie chez les patients COVID-19. Ainsi, parmi les mécanismes potentiels de l'immunopathologie induite par le SARS-CoV-2 (Figure 14) (53):

- L'expression des récepteurs ACE2 sur les lymphocytes, en particulier sur les cellules T, favorise l'entrée du SARS-CoV-2 dans les lymphocytes provoquant leur altération.
- L'augmentation concomitante des niveaux de cytokines inflammatoires favorise la déplétion et l'épuisement des lymphocytes T.
- Le SARS-CoV-2 endommage directement les organes lymphatiques, notamment la rate et les ganglions lymphatiques, induisant une lymphopénie qui peut entraîner une infection par un microbe favorisant ainsi l'activation et le recrutement des neutrophiles dans le sang.
- L'augmentation des niveaux d'acide lactique inhibe la prolifération et le dysfonctionnement des lymphocytes.

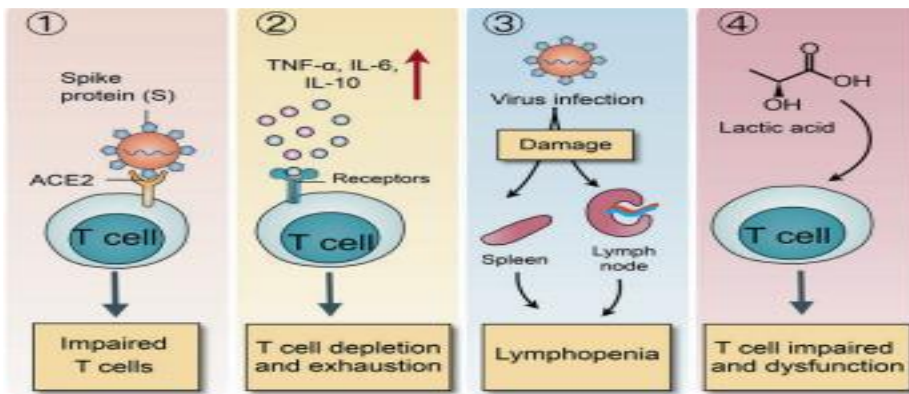


Figure 12: Les mécanismes potentiels de l'immunopathologie induite par le SARS-CoV-2 (50).

X.PHYSIOPATHOLOGIE DU COVID-19 :

L'infection par le SARS-CoV-2 régule l'expression du récepteur ACE2 qui participe dans le rétrocontrôle négatif du système rénine-angiotensine et agit comme une protéine de clairance de l'angiotensine II ayant un effet vasoconstricteur, pro-fibrosant, pro-inflammatoire.

Dans l'espace extracellulaire, l'angiotensine-I (Ang-I) est convertie en Angiotensine-II (Ang -II) par l'ACE qui est par la suite capable de clivage supplémentaire de l'Ang-II en Ang (1-7), ce dernier se lie aux récepteurs MasR à la surface des cellules et favorise ainsi les effets anti-inflammatoires, vasodilatateurs et anti-fibrotiques (47).

Étant donné que l'ACE2 est régulé à la baisse pendant l'infection virale, cet événement conduit à l'accumulation d'Ang-II et à sa liaison aux récepteurs AT1R (*Angiotensine Type 1 Receptor*) sur la membrane cellulaire qui signalent par la voie JAK-STAT et induisent la fibrose, l'expression de gènes pro-inflammatoires et la vasoconstriction (Figure 15) (47).

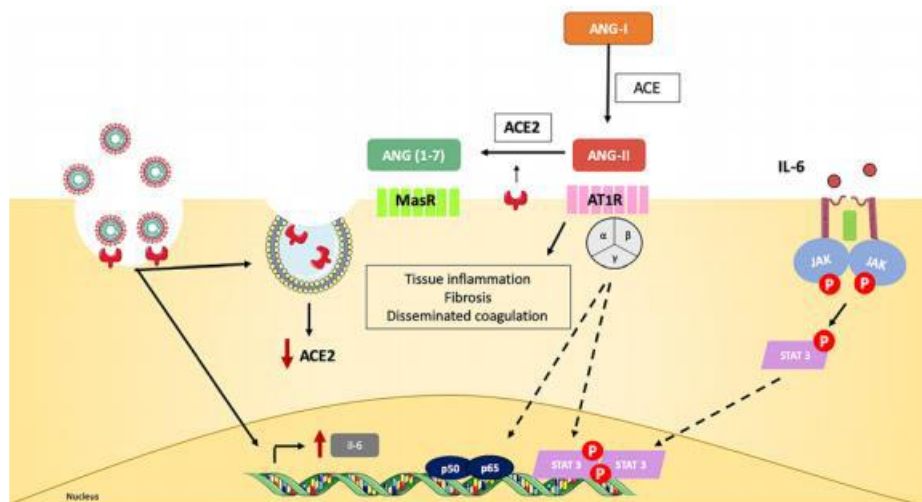


Figure 13: Les mécanismes impliqués dans la physiopathologie du COVID-19 (46).

Il a été démontré que la forme grave de la COVID-19 est associée à une pneumonie interstitielle et aux dommages alvéolaires, qui peuvent précipiter un syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA). De plus, une perfusion sanguine réduite peut entraîner un

dysfonctionnement d'un ou plusieurs organes, et provoquant parfois un syndrome de défaillance multiviscérale menant au décès (47).

Actuellement, les données disponibles indiquent que le développement de cette forme sévère de COVID-19 pourrait être causé par la survenue d'un syndrome de libération de cytokines proinflammatoires. Ce phénomène d'inflammation massive entraîne une augmentation significative de la perméabilité vasculaire c'est-à-dire l'entrée de fluides et de cellules sanguines dans les alvéoles induisant une aggravation de la dyspnée et la détresse respiratoire (47).

XI. DIAGNOSTIC VIROLOGIQUE DE L'INFECTION PAR SARS-CoV-2 :

Le diagnostic virologique est un outil incontournable pour gérer la nouvelle pandémie causée par le SARS-CoV-2. En effet, la confirmation du diagnostic doit répondre à l'urgence de la situation tout en respectant les règles de bonnes pratiques au laboratoire. En effet, plusieurs indications sont présentes pour les tests de diagnostic virologique (65):

- Confirmer l'infection chez toutes les personnes qui répondent à la définition du cas suspect.
- Proposer la levée de la quarantaine chez les cas confirmés et cliniquement guéris.
- Dépister les personnes qui ont été en contact avec un cas confirmé.
- Effectuer un diagnostic différentiel notamment chez les personnes vulnérables. En plus des investigations cliniques, biologiques et radiologiques, qui contribuent également au diagnostic du COVID-19, la confirmation de cette maladie virale repose essentiellement sur deux types de tests disponibles en routine (66):
- La détection du génome viral du SARS-CoV-2 dans les voies aériennes supérieures désigné diagnostic moléculaire.
- La recherche de la réponse des anticorps dans un prélèvement sanguin désigné diagnostic sérologique.

1. Diagnostic moléculaire :

1.1 La détection du génome viral SARS-CoV-2 par qRT-PCR :

Le diagnostic moléculaire représente le test de référence de dépistage du SARS-CoV-2, basé sur la détection de l'ARN viral par PCR quantitative en temps réel sur prélèvements rhino-pharyngés. Cette technique repose sur l'amplification du génome à l'aide d'un appareil appelé « thermocycleur » permettant de faire varier la température au cours du temps (67). Dans cette

approche, une étape de reverse transcription de l'ARN en brins d'acide désoxyribonucléique complémentaire (ADNc) est préalablement nécessaire. La PCR permet ensuite d'amplifier en 2^n copies (n =nombre de cycles) la séquence spécifique d'ADNc (11).

Dans le cas du COVID-19, la qRT-PCR repose sur l'amplification des gènes conservés du SARS-CoV-2, principalement les gènes (N, RdRp, E, S) et cela selon les trois étapes (Figure 19) (67)[43] :

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

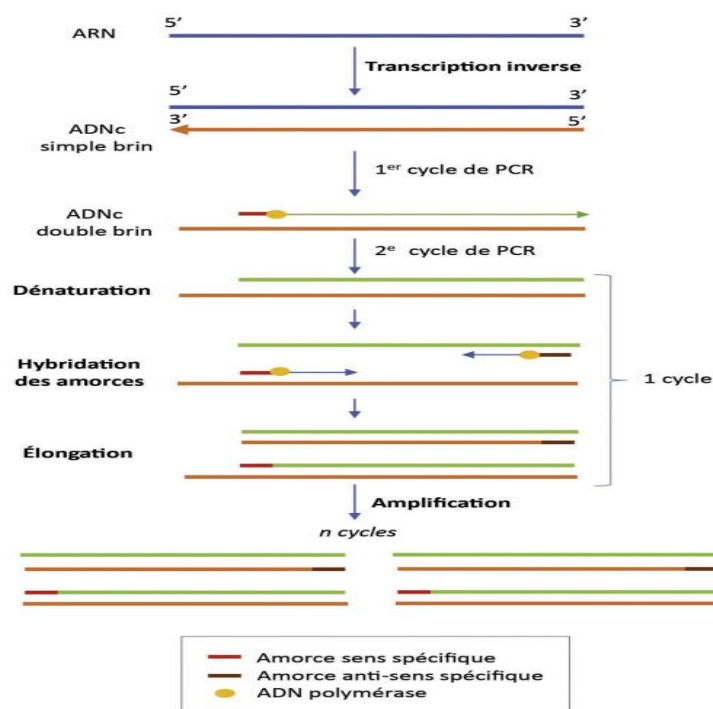


Figure 14: Principe de la qPCR en temps réel (68).

Les étapes d'hybridation et d'élongation sont répétées 30 à 40 fois, ce qui permet d'obtenir un grand nombre de copies du fragment nucléotidique cible (19). Dans chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN est mesurée grâce à un marqueur fluorescent. L'émission

de fluorescence est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits (67).

La qRT-PCR amplifie au cours des cycles la quantité de l'ARN viral présent dans l'échantillon de test jusqu'à la rendre détectable. Pour un test, un nombre de cycles seuil appelé « *Cycle threshold* » ou « Ct » est défini, et qui correspond au nombre de cycles nécessaires pour amplifier l'ARN viral à un niveau détectable, graphiquement Ct est l'intersection entre une courbe d'amplification durant la phase exponentielle et une ligne de base (Figure 20) (69).

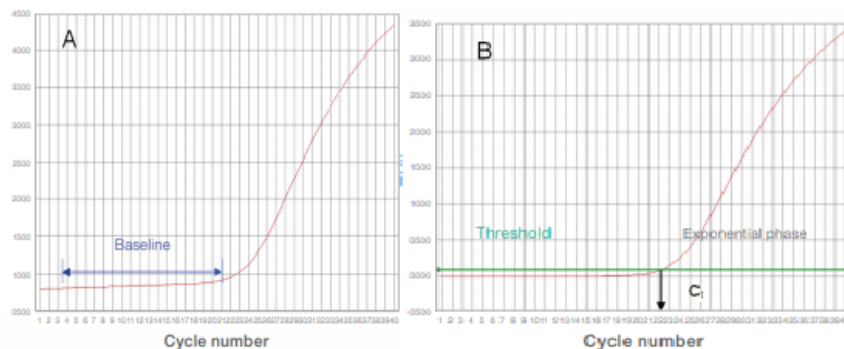


Figure 15: Représentation graphique des résultats du qRT-PCR (66).

Par conséquent, la valeur du Ct est le reflet de la quantité d'ARN viral dans le prélèvement, et est inversement proportionnelle à la charge virale : plus la valeur de Ct est élevée, plus la charge virale est faible. En revanche, cette valeur peut être variable selon le processus analytique ou selon la technique de RT-PCR utilisés (69).

1.2 La détection du génome viral SARS-CoV-2 par RT-LAMP :

Une autre méthode diagnostique reposant sur une approche moléculaire demeure disponible pour détecter le virus du SARS-CoV-2, et est l'amplification isotherme médiée par la boucle de transcription inverse ciblant le gène RdRp. Cette technique a été validée par la FDA (*Food and Drug Administration*) aux États-Unis, permettant d'obtenir des premiers résultats en 5 minutes en cas de positivité et un résultat final en 13 minutes pour les négatifs, l'ensemble du processus automatisé est réalisé à l'aide d'un petit automate portable (ID NOW™ COVID 19) (70). La technique RT-LAMP a été développée en 2000, est une méthode d'amplification des acides nucléiques connue pour sa simplicité et rapidité. Dernièrement, elle a été largement utilisée pour l'isolement du virus de la grippe, du syndrome respiratoire du Moyen-Orient-CoV, du virus Ebola, et d'une variété d'autres agents pathogènes, finalement est utilisé aussi pour détecter le SARS-CoV-2 chez les personnes atteintes de COVID-19 (57).

Cette technique est basée sur l'autocyclage et la forte activité de déplacement des brins d'ADNc médiée par la polymérase *Bst* de *Geobacillus stearothermophilus*, dans des conditions

isothermes à 60-65 °C, l'optimum pour l'activité de la polymérase (63). La réaction peut être réalisée en incubant la polymérase *Bst*, la transcriptase inverse et quatre amorces qui regroupent:

- Deux amorces internes ayant à la fois une séquence sens et anti-sens de telle sorte qu'elles contribuent à la formation d'une boucle (62):
 - Forward Inner Primer : FIP
 - Backward Inner Primer : BIP
- Deux amorces externes jouent un rôle dans le déplacement des brins au cours du processus d'amplification (62):
 - Forward Outer Primer : F3
 - Backward Outer Primer : B3

La méthode RT-LAMP commence par liaison de l'amorce interne BIP à la séquence cible à l'extrémité 3' de la matrice d'ARN et avec l'activité de la transcriptase inverse, une copie du brin d'ADNc est synthétisée. Ensuite, grâce à l'ADN polymérase, les amorces B3 se fixent sur le côté des matrices, génèrent un nouveau brin d'ADNc, tout en libérant simultanément le brin d'ADNc précédemment formé par le BIP. Ce brin unique d'ADNc est ensuite bouclé à son extrémité et se lie à lui-même. Puis, l'amorce interne FIP se lie à l'extrémité 5' du brin et synthétise un brin complémentaire par l'ADN polymérase. Tandis que l'amorce F3 se lie à la région située à l'extérieur du FIP et son extrémité 3' devient le point de départ de la synthèse tout en libérant simultanément le brin d'ADN précédemment formé par la FIP. La boucle continue à fonctionner comme une structure en haltère lorsque l'amorce FIP ou BIP initie la synthèse de l'ADNc à l'emplacement de la séquence cible suivante. Le cycle peut commencer soit du côté avant, soit du côté arrière du brin. Lorsqu'il démarre, le brin subit une synthèse d'ADN auto-amorcée pendant l'étape d'élongation du processus d'amplification (Figure 21) (64).

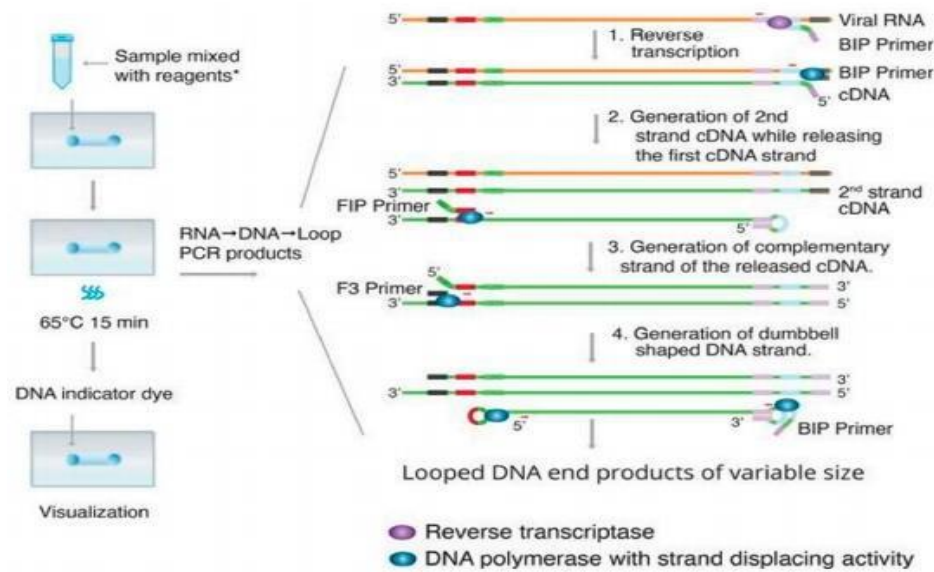


Figure 16: Principe de la technique RT-LAMP (63).

2. Diagnostic sérologique :

Le diagnostic sérologique n'est pas recommandé dans le cadre d'un dépistage initial de l'infection par le SARS-CoV-2, mais plutôt indiqué chez les patients infectés, n'ayant pas bénéficié précocement d'un test PCR. La sérologie peut donc constituer un diagnostic de rattrapage lors de l'aggravation de l'état de ces patients, si la PCR est négative, aussi indiqué chez les patients asymptomatiques lors de détection des personnes contact après une PCR négative. Contrairement aux tests PCR qui révèlent également la quantité de virus dans l'échantillon, la sérologie ne fournit pas une idée sur le niveau de contagion chez un patient, (74). En effet, comme expliqué précédemment, suite à une infection par le SARS-CoV-2, une réponse immunitaire adaptative humorale est développée. Ainsi, les tests sérologiques, permettent la détection des anticorps anti-SARS-CoV-2 (IgG et IgM) produits par l'organisme et dirigés spécifiquement contre les antigènes viraux (11).

De nombreux tests sérologiques ont été mis au point depuis le début de la pandémie de COVID-19 :

- Des tests quantitatifs : réalisés en laboratoire sur un prélèvement sanguin veineux tel que le dosage d'immunoabsorption par enzyme liée désigné ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) ou le dosage immunologique des IgG spécifiques anti-S1 et S2 de SARS-CoV2 par chimiluminescence désigné CLIA (*ChemiLuminescence Immuno-Assay*) (71) (72).

- Des tests qualitatifs : appelés communément dosage à flux latéral ou LFA (*Lateral Flow Assay*) pouvant être réalisés sans passer par un laboratoire sur un prélèvement sanguin à travers une piqûre au doigt et sont basés sur l'immunochromatographie appliquée sur bandelette de nitrocellulose, et permettent d'établir un diagnostic rapide en quelques minutes (<15 minutes) (Figure 22) (71) (72) .

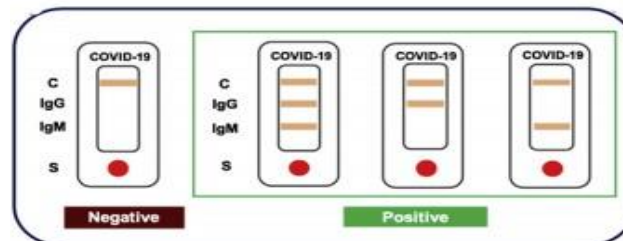


Figure 17: Test immunochromatographique COVID-19 sur bandelette de nitrocellulose (50)

Un résultat sérologique positif prouve qu'une personne a été exposée antérieurement au SARS-CoV-2, qu'elle ait eu des symptômes ou non, mais ne fournit guère d'informations, sur son statut infectieux actuel (73).

PARTIE PRATIQUE

MATERIELS ET METHODES

1. Echantillons :

Cette étude a été réalisée au centre de dépistage de Covid19 (Laboratoire Central de l'EPH nouvel hôpital d'Adrar) sur des échantillons prélevés par écouvillonnage nasopharyngés déchargés dans un milieu de transport virologique, pour la détection qualitative du Génome du SRAS-COV-2 par test antigénique et RT-PCR elle a porté sur 50 échantillons.

2. Type et lieu d'étude :

Il s'agit d'une étude observationnelle et comparative effectués sur 50 échantillons. L'ensemble du processus expérimental a été réalisé au Laboratoire de nouvel hôpital d'Adrar unité biologie moléculaire.

3. Milieu de transport (PBS):

Babio Phosphate Buffered Saline (PBS) est un liquide stérile prêt à l'emploi utilisé pour collecter, transporter en toute sécurité et diluer des échantillons cliniques. Ceci peut être réalisé avec Babio® Phosphate Buffered Saline (PBS).

Le liquide est non nutritif, de sorte que l'échantillon transporté peut être stocké longtemps dans un état non nutritif. Le phosphate dans le liquide agit comme un tampon. Le chlorure de sodium et le chlorure de potassium maintiennent l'équilibre de la pression osmotique du liquide et régulent la perméabilité des membranes cellulaires biologiques.



Figure 18: Milieu de transport PBS et écouvillon de prélèvement nasopharyngé.

I. qRT-PCR SARS-CoV-2 (kit TaqPath™ COVID-19 CE-IVD RT-PCR)

1. Extraction des acides nucléiques :

Au centre de dépistage de Covid19 l'extraction des acides nucléiques du SARS-CoV-2 est effectuée d'une façon automatisée en utilisant l'extracteur (**KingFisher Duo Prime**) et par méthode manuel en utilisant le réactif (applied biosystems 5X MagMAX™ Pathogen RNA/DNA kit) en fonction de la disponibilité des réactifs correspondants. Pour cette étude, nous avons effectuée l'extraction sur l'extracteur **KingFisher Duo Prime** uniquement pour avoir un rendement homogène de l'extraction.

1.1- KingFisher Duo Prime :

Il offre une extraction et une purification constantes de l'ADN, de l'ARN, des protéines et des cellules, Le principe de la méthode est une extraction par billes magnétiques, avec un chauffage/refroidissement rapide. Utilisation d'un processus simple (lier, laver, éluer), Tout d'abord, un tampon lyse les particules ou les cellules pathogènes pour libérer l'acide nucléique. Après adsorption sur la surface de la phase solide des billes magnétiques, les impuretés sont séparées de la phase liquide, et finalement l'acide nucléique est purifié pour un total de temps de 24 min



Figure: 19 Extracteur KingFisher Duo Prime

2. Amplification des acides nucléiques :

2.1- Préparation du Mix réactionnel pour qRT-PCR SARS-CoV-2 et dépôt d'ARN viral (kit TaqPath™ COVID-19 CE-IVD RT-PCR) :

Le TaqPath™ COVID-19 CE-IVD RT-PCR Kit contient les réactifs et les témoins pour un test de réaction en chaîne par polymérase en temps réel après transcription inverse (RT-PCR), destiné a la détection qualitative d'acide nucléique a partir de SARS-CoV-2 dans

des échantillons obtenu par écouvillon nasopharyngé, aspiration Nasopharyngé et lavage bronchoalveolaire (LBA) de personnes suspectées d'avoir le COVID-19. (**Tableau 04**) (**Figure 25**).

Il fournit un Master Mix prêt à l'emploi, en plus d'un positif contrôle **CP** qui va être testé dans un puits séparé des échantillons expérimentaux et servira de contrôle pour déterminer si les conditions de la réaction sont optimales, le kit est doté aussi un contrôle interne CI (MS2) qui est utilisé lors de l'extraction comme contrôle pour l'ensemble du processus diagnostique, c'est-à-dire l'efficacité de l'extraction de l'ARN, de l'étape de RT et de l'amplification par PCR (inhibition de la PCR).

Tableau 04 : Les réactifs de kit de TaqPath™ COVID-19 CE-VD RT-PCR (74)

Composant	Contenu	Quantité	Volume par tube ou flacon	Numéro de référence de l'unité	Stockage	Durée de conservation ^[1]
TaqPath™ COVID-19 RT-PCR Kit	TaqPath™ COVID-19 Assay Multiplex (Gene ORF1ab, N Protein, S Protein, MS2)	1 tube	1 500 µl (1 000 réactions)	100093311	-30 °C à -10 °C	12 mois
	MS2 Phage Control	10 tubes	1 ml	100093312	-30 °C à -10 °C	12 mois
TaqPath™ COVID-19 Control		10 tubes	10 µl (1 x 10 ⁴ copies/µl)	100093314	≤ -70 °C	12 mois
TaqPath™ COVID-19 Control Dilution Buffer		10 tubes	250 µl	100093291	-30 °C à -10 °C	9 mois
TaqPath™ 1-Step Multiplex Master Mix (No ROX™)		1 flacon	10 ml	A48111	-30 °C à -10 °C	12 mois



Figure 20: Réactif du Kit TaqPath™ COVID-19 CE-VD RT-PCR.

2.2- Amplification et détection en temps réel :

La détection du SARS-CoV-2 a été accomplie en utilisant le kit de **TaqPath™ COVID-19 CE-VD RT-PCR** qui cible des séquences spécifiques du génome du virus (ORF1ab, gène S et gène N) en une seule réaction. En effet, le mécanisme de ciblage multiplex assure une haute sensibilité de la détection du SARS-CoV2.

La présence d'ORF1ab est indiquée par l'augmentation de la fluorescence dans le canal FAM tandis que l'augmentation de la fluorescence dans le canal VIC confirme la présence du gène N, et l'augmentation de la fluorescence dans le canal ABY confirme la présence du gène S et l'amplification positive du contrôle interne MS2 se traduit par la fluorescence du fluorophore JUN (**Tableau 05**).

Tableau 05: Les cibles de la qRT-PCR SARS-CoV-2.

Reporter Fluorophore	Détecteur
FAM	ORF1ab
VIC	Gène N
ABY	Gène S
JUN	MS2

L'amplification qRT-PCR des échantillons d'ARN viral des patients suspect COVID-19 est réalisée à l'aide du thermocycleur **QuantStudio™ 5** d'Applied Biosystems™ (**Figure 26**) équipé d'un bloc d'échantillons SBS à 96 puits. Cela le rend approprié pour l'utilisation de tubes individuels de 0,2 ml, de 8 barrettes à puits et de plaques de titration de 96 puits.



Figure 21: Thermocycleur **QuantStudio™ 5** d'Applied Biosystems™.

Les systèmes de PCR en temps réel QuantStudio 5 est calibré en usine pour une installation rapide et une utilisation immédiate. Ce système détecte des différences de quantité cible aussi faibles que 1,5 fois, il prend en charge les consommables 96 puits (0,2 ml ou 0,1 ml). Le système dispose également de capacités de multiplexage pour jusqu'à 6 cibles.

Tableau 6 : Protocole thermique d'amplification (TaqPath™ COVID-19 CE-VD RT-PCR).

Etape	Température	Durée	Nombre de cycle
Incubation UNG	25 °C	2 minutes	1
Transcription inversé	53 °C	10 minutes	1
Activation	95 °C	2 minutes	1
Dénaturation	95 °C	3 second	40
Hybridation/élongation	60 °C	30 second	

2.3- Préparation de mélange réactionnel (Mix) :

Utilisez cette procédure si vous avez extrait l'échantillon d'ARN à l'aide d'un échantillon d'entrée d'origine volume entre 200 µL et 400 µL. Un volume d'entrée d'échantillon > 400 µL n'a pas été Testé avec le kit TaqPath™ COVID-19 CE-IVD RT-PCR.

1. S'ils sont congelés, décongeler les réactifs sur de la glace.
2. Vortexez doucement les réactifs, puis centrifugez brièvement pour recueillir le liquide au fond du tube.
3. Diluer TaqPath™ COVID-19 Control (1 × 10⁴ copies/µL) dans un stock de travail de 25 copies/µL :
 - a- Pipeter 98 µL de tampon de dilution de contrôle TaqPath™ COVID-19 dans un tube de microcentrifugeuse, puis ajoutez 2 µL de contrôle TaqPath™ COVID-19. Mélanger bien, puis centrifuger brièvement.
 - b- Pipeter 87,5 µL de tampon de dilution de contrôle TaqPath™ COVID-19 dans un second tube de microcentrifugeuse, puis ajouter 12,5 µL de la dilution créée dans sous-étape **3a**. Bien mélanger, puis centrifuger brièvement.

Remarque : Le contrôle TaqPath™ COVID-19 ne contient pas le control interne MS2.

4. Préparez le mélange réactionnel :

a- Pour chaque exécution, combinez les composants suivants en quantité suffisante pour le nombre d'échantillons d'ARN à tester plus un contrôle positif et un négatif Contrôler.

Tableau 07 : Préparation du Mix (TaqPath™ COVID-19 CE-VD RT-PCR).

Composant	Volume par échantillon ou témoin	Volume pour n échantillon plus 2 témoins	Volume pour 94 échantillon plus 2 témoins
TaqPath™ 1-Step Multiplex Master Mix (No ROX™) (4X)	6.25 ul	6.875 x (n+2) ul	660 ul
COVID-19 Real Time PCR Assay Multiplex	1.25 ul	1.375 x (n+2) ul	132 ul
Eau nuclease-free	12.50 ul	13.75 x (n+2) ul	1320 ul
Volume total du mélange réactionnel	20.0 ul	-	2112

5. Mettre en place la plaque de réaction :

a- Pipeter 20,0 µL du mélange réactionnel préparé à l'étape 4 dans chaque puits d'un MicroAmp™ Plaque de réaction optique rapide à 96 puits avec code-barres, 0,1 ml ou un MicroAmp™ Plaque de réaction optique à 96 puits avec code-barres, 0,2 ml. Des plaques sans code-barres peuvent être utilisées

b- Vortexez doucement la plaque scellée contenant l'échantillon d'ARN purifié et Contrôle négatif de la procédure d'extraction d'ARN, puis centrifugé brièvement pour recueillir le liquide au fond de la plaque.

c- Desceller la plaque contenant l'échantillon d'ARN purifié et le contrôle négatif de la procédure d'extraction d'ARN. Ajoutez l'un ou l'autre des échantillons d'ARN, négatif Control, ou Positive Control à chaque puits de la plaque de réaction selon **Tableau 08**.

Tableau 08 : Plaque de réaction (TaqPath™ COVID-19 CE-VD RT-PCR).

Composant	Volume par réaction		
	Réaction de l'échantillon	Témoin positif (TaqPath™ COVID-19 Control)	Réaction de témoin négatif
Mélange réactionnel	15.0 ul	15.0 ul	15.0 ul
Échantillon purifié d'acide nucléique	10.0 ul	-	-
Témoin positif (TaqPath™ COVID-19 Control)	-	2.0	-
Eau nuclease-free	-	8.0	-

Témoign négatif	-	-	10.0 ul
Volume totale	25.0 ul	25.0 ul	25.0 ul

II. Test rapide Antigénique (NADAL® COVID-19 Ag)

II.1 Domaine d'application :

Le test rapide NADAL® COVID-19 Antigen qui est également un test immunologique chromatographique à flux latéral détecte les fragments de protéines du virus et donc sa présence physique directe dans l'organisme. Il est réalisé à l'aide d'un écouvillonnage effectué dans la sphère buccale ou nasopharyngée. Celui-ci est enrichi d'une solution tampon, puis pipeté sur la cassette de test. Un résultat qualitatif est disponible en moins de 20 minutes. (75)

II.2 Principe :

Le test NADAL® COVID-19 Ag est un immunodosage chromatographique à flux latéral pour la détection qualitative des antigènes nucléoprotéiques viraux du SARS-CoV-2 dans des échantillons humains nasopharyngés et oropharyngés. Les anticorps anti-SARS-CoV-2 sont immobilisés dans la zone de test (T) de la membrane. Un échantillon est ajouté à un tube d'extraction contenant un tampon, afin de libérer les antigènes du SARS-CoV-2. Pendant le test, les antigènes extraits se lient aux anticorps anti-SARS-CoV-2 qui sont conjugués à des particules colorées immobilisées sur la zone de dépôt de l'échantillon de la cassette. Le mélange migre par capillarité chromatographique le long de la membrane et réagit avec les réactifs sur la membrane. (75)

Les complexes sont ensuite immobilisés par des anticorps anti-SARS-CoV-2 dans la zone de test (T). Les particules colorées excédentaires sont immobilisées dans la zone de contrôle (C). La présence d'une ligne colorée dans la zone de test (T) indique un résultat positif. L'absence d'une ligne colorée dans la zone de test (T) indique un résultat négatif. (75)

L'apparition d'une ligne colorée dans la zone de contrôle (C) sert de procédure de contrôle et indique qu'un volume suffisant d'échantillon a été ajouté et que la membrane a été suffisamment imbibée. (75)

II.3 Réactifs et matériel utilisés

- 50 cassettes NADAL® COVID-19 Ag : Contient de l'azide de sodium comme conservateur : <0,1%
- 50 écouvillons stériles,
- 50 tubes d'extraction avec bouchons compte-gouttes

- 2 flacons de tampon (de 7 mL chacun) : La solution tampon contient de l'azide de sodium comme conservateur : <0,1 mg/mL
- 1 support pour tube de réactif

II.4 Matériel supplémentaire nécessaire :

Chronomètre

II.5 Conservation et stabilité :

Les kits doivent être conservés entre 2°C et 30°C jusqu'à la date de péremption indiquée. Les cassettes sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'emballage d'origine. La cassette de test doit rester dans son emballage d'origine jusqu'à son utilisation. Ne pas congeler les kits de test. Ne pas utiliser les tests après la date de péremption figurant sur l'emballage. Protéger les composants du kit de toute contamination. Ne pas utiliser les composants du test s'ils présentent des signes de contamination microbienne ou de précipitation. La contamination biologique des doseurs, récipients ou réactifs peut entraîner des résultats erronés. (75)

II.6 Recueil et préparation des échantillons :

a- Prélèvement oropharyngé :

- insérer doucement un écouvillon stérile dans le pharynx et recueillir les sécrétions en frottant l'écouvillon plusieurs fois contre la paroi postérieure rougeie du pharynx et les deux piliers des amygdales. Éviter de toucher la langue, les dents et les gencives.(75)

b- Prélèvement nasopharyngé :

- **Insérer** l'écouvillon dans la narine, parallèlement au palais (pas vers le haut) jusqu'à rencontrer une résistance ou que la distance soit équivalente à celle de l'oreille à la narine du patient, ce qui indique un contact avec le nasopharynx. (75)
- **Frotter** et faire tourner doucement l'écouvillon. Laisser l'écouvillon en place pendant plusieurs secondes pour absorber les sécrétions. (75)
- **Retirer** lentement l'écouvillon en le faisant tourner. Les prélèvements peuvent être effectués dans les deux narines à l'aide du même écouvillon, mais il n'est pas nécessaire d'effectuer un prélèvement des deux côtés, si l'extrémité de l'écouvillon est saturée de liquide après le premier prélèvement. (75)

II.7 Procédure du test :

Amener tous les tests, échantillons, solutions et/ou contrôles à température ambiante (entre 15°C et 30°C) avant la réalisation du test.

1. Placer un tube d'extraction propre, étiqueté avec l'identification du patient ou du contrôle, dans la zone désignée du support pour tube de réactif.
2. Mélanger doucement le tampon en faisant pivoter le flacon avec précaution.
3. Tenir le flacon de tampon à la verticale, et sans toucher le bord du tube, ajouter 10 gouttes dans le tube d'extraction.
4. Insérer l'écouvillon avec l'échantillon prélevé dans le tube. Faire tourner l'écouvillon et le presser 10 à 15 fois en comprimant la paroi du tube d'extraction contre l'écouvillon pour extraire les antigènes contenus dans l'écouvillon.
5. Laisser reposer la solution pendant 2 minutes.
6. Retirer l'écouvillon, en le pressant fermement contre la paroi du tube pour libérer autant de liquide que possible. Éliminer l'écouvillon conformément aux directives relatives à la manipulation des agents infectieux.
7. Retirer la cassette de son emballage et l'utiliser dès que possible. Les meilleurs résultats sont obtenus si le test est exécuté immédiatement après l'ouverture de l'emballage. Étiqueter la cassette de test avec l'identification du patient ou du contrôle.
8. Placer la cassette de test sur une surface propre et plane.
9. Fixer un bouchon compte-gouttes sur le tube d'extraction, retourner le tube et déposer 2 gouttes de la solution extraite dans le puits de dépôt (S) de la cassette
10. Démarrer le chronomètre.
11. Attendre que la/les ligne(s) colorée(s) apparaisse(nt). Lire le résultat du test après exactement 15 minutes. Ne plus interpréter le résultat après plus de 15 minutes.

RESULTATS ET DISCUSSION

I. qRT-PCR SARS-CoV-2:

La validation des résultats qRT-PCR SARS-CoV-2 est faite en se basant sur la détection ou la non détection des gènes ciblés, permettant donc de conclure la positivité/négativité des échantillons. L'interprétation des résultats est effectuée par l' *Applied Biosystems™ COVID-19 Interpretive Software*.

I.1 Contrôle qualité et validité des résultats

Un témoin négatif et un témoin positif sont traités à chaque analyse.

La validation des résultats est effectuée automatiquement par l' *Applied Biosystems™ COVID-19 Interpretive Software* en fonction de la performance des témoins positifs et négatifs.

Tableau 09 : Interprétation des résultats qRT-PCR SARS-CoV-2 (TaqPath™ COVID-19 CE-VD RT-PCR). (74).

ORF1ab	Gène N	Gène S	MS2	Statut	Résultat	Action
NEG	NEG	NEG	NEG	Non valide	S/O	Répétez le test. Si le résultat du test répété n'est pas valide, envisagez de prélever un nouvel échantillon
NEG	NEG	NEG	POS	Valide	SARS-CoV-2 Non détecté	Signalez les résultats au prestataire de soins de santé. Envisagez de tester d'autres virus.
Une seule cible SARS-CoV-2 = POS			POS ou NEG	Valide	Non concluant pour le SARSCoV-2	Répétez le test. Si le résultat du test répété n'est toujours pas concluant, des tests de confirmation supplémentaires doivent être effectués en cas d'indication clinique.
Deux cibles SARS-CoV-2 ou plus = POS			POS ou NEG	Valide	Positif pour le SARS-CoV-2	Signalez les résultats au prestataire de soins de santé et aux autorités sanitaires publiques compétentes, le cas échéant.

I.2 Résultats :

Les résultats qRT-PCR SARS-CoV-2 sont obtenus à l'aide du logiciel *Applied Biosystems™ COVID-19 Interpretive Software* (**Tableau 10**). Au total, les 50 échantillons testés sont positifs.

Tableau 10: Les résultats des tests qRT-PCR SARS-CoV-2.

Echantillon n° :	Ct			Résultats
	Gène S	ORF1ab	Gène N	
01	31	28	30	POSITIF
02	32	30	31	POSITIF
03	20	25	37	POSITIF
04	23	24	30	POSITIF
05	33	31	34	POSITIF
06	35	37	34	POSITIF
07	31	29	31	POSITIF
08	33	26	32	POSITIF
09	29	24	29	POSITIF
10	33	34	30	POSITIF
11	31	33	35	POSITIF
12	29	30	33	POSITIF
13	22	30	28	POSITIF
14	Nég	31	30	POSITIF
15	34	36	35	POSITIF
16	33	32	30	POSITIF
17	34	29	33	POSITIF
18	28	33	21	POSITIF
19	30	28	20	POSITIF
20	37	36	34	POSITIF
21	29	25	24	POSITIF
22	33	34	22	POSITIF
23	21	18	29	POSITIF
24	Nég	22	22	POSITIF
25	34	29	33	POSITIF
26	37	31	35	POSITIF
27	36	30	30	POSITIF
28	34	37	36	POSITIF
29	35	28	29	POSITIF
30	30	33	31	POSITIF
31	29	31	33	POSITIF
32	35	30	33	POSITIF
33	29	27	30	POSITIF
34	36	36	34	POSITIF
35	31	34	35	POSITIF
36	32	30	37	POSITIF
37	34	30	29	POSITIF
38	Nég	28	33	POSITIF
39	35	31	28	POSITIF
40	29	24	30	POSITIF
41	34	33	34	POSITIF
42	33	29	35	POSITIF
43	37	33	33	POSITIF
44	31	34	35	POSITIF
45	29	31	32	POSITIF
46	28	32	32	POSITIF
47	32	33	35	POSITIF
48	Nég	29	30	POSITIF
49	31	31	34	POSITIF

50	29	32	33	POSITIF
----	----	----	----	---------

Ces résultats sont présentés sous forme des courbes d'amplification des gènes détectés (**Figure 27**), (**Figure 28**), et sous forme des valeurs Ct permettant d'estimer approximativement la charge virale des échantillons positifs : Ct (ORF1ab) < 25 : charge virale élevée ; Ct (ORF1ab) = 25 à 35 : charge virale intermédiaire ; Ct (ORF1ab) > 35 : charge virale basse. (**Tableau 11**)

Tableau 11: Les résultats des tests qRT-PCR SARS-CoV-2 selon le leur charge virale

Nombre de tests POSITIF	charge virale élevée	charge virale intermédiaire	charge virale basse
50	07	38	05

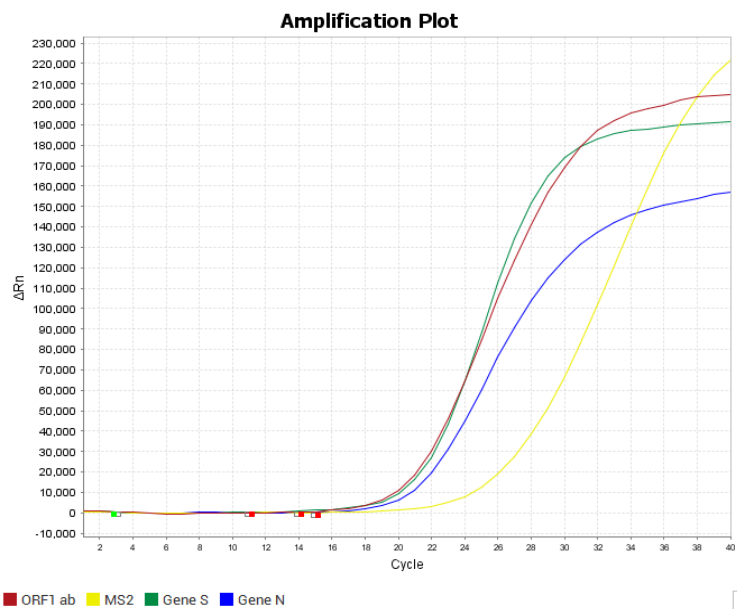


Figure 22: Résultat positif ; toutes les cibles (CI, S, N, ORF1ab) sont positifs.

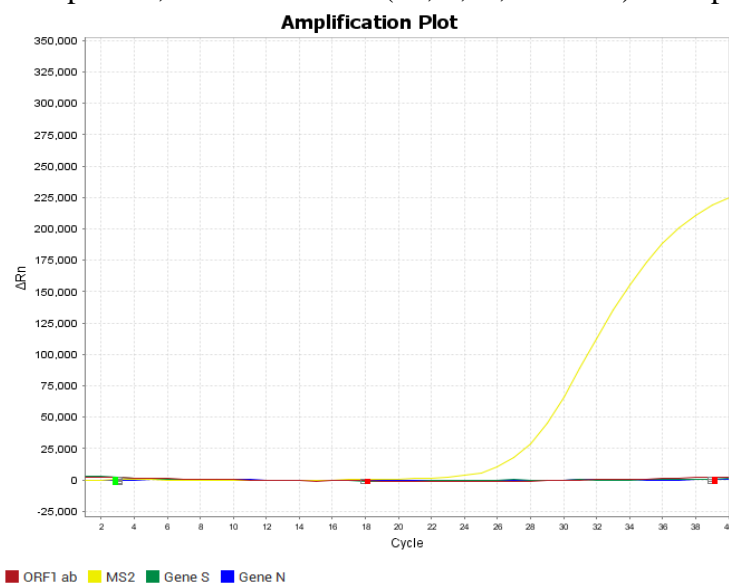


Figure 23 : Résultat négatif ; les cibles (S, N, ORF1ab) sont négatifs, (MS2) est positif

II. TEST ANTIGENIQUE NADAL :

II.1 Contrôle qualité et validité des résultats :

La lecture des résultats vous offre la possibilité de déterminer la présence des antigènes du virus SARS-CoV-2.0

a- TEST Positif : Deux lignes de couleur apparaissent dans la fenêtre de lecture. Une ligne apparaît dans la zone de contrôle (C) et une autre ligne apparaît dans la zone de test (T).

Remarque : L'intensité de couleur de la ligne dans la zone de test (T) peut varier en fonction de la concentration des antigènes nucléoprotéiques viraux du SARS-CoV-2 présents dans l'échantillon. Toute apparition de couleur dans la zone de test (T) doit être considérée comme un résultat positif. Notez que ce test est uniquement un test qualitatif et qu'il ne peut déterminer la concentration en analytes dans l'échantillon (**Figure 29**) (75).

b- TEST Négatif : Une seule ligne colorée apparaît dans la zone de contrôle (C). Aucune ligne colorée n'apparaît dans la zone de test (T) (**Figure 29**) (75).

c- TEST Non valide La ligne de contrôle (C) n'apparaît pas. Les résultats des tests qui n'ont pas formé de ligne de contrôle, après le temps d'évaluation imparti, doivent être rejetés. Contrôler la procédure d'exécution du test et renouveler le test avec une nouvelle cassette. Si le problème persiste, cesser immédiatement d'utiliser le kit de test et contacter votre distributeur (**Figure 29**) (75).

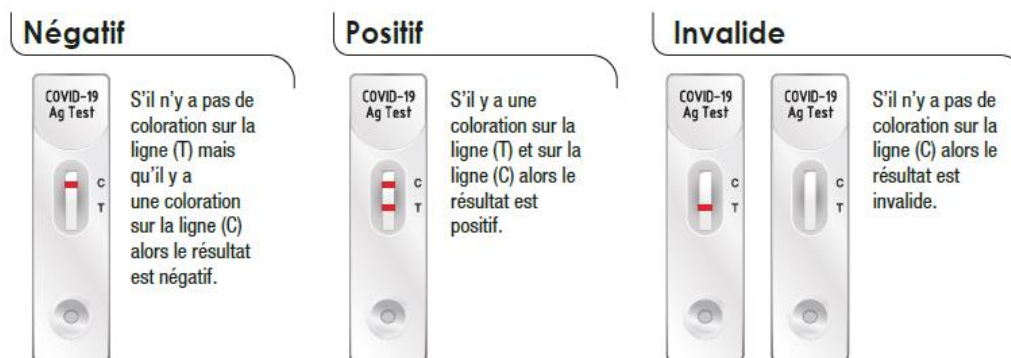


Figure : 24 Interprétation des résultats de test antigénique NADAL

II.2 Résultat :

Parmi les 50 prélèvements naso-pharyngés dont le RT-PCR est positif, 47 prélèvements sont aussi positifs par Test antigénique NADAL, et 03 prélèvements sont négatifs. (**Tableau 12**)

Dans le processus de diagnostic COVID-19, l'utilisation de nouveaux outils nécessite de mesurer leur performance par rapport à une référence gold standard (qRT-PCR). (76)

Tableau 12: Les résultats du test antigénique NADAL.

	Patients malades	Patients non malades
Test positif	Vrai positif (VP) VP= 47	Faux positif (FP) FP= 0
Test négatif	Faux négatif (FN) FN= 0	Vrai négatif (VN) VN= 03

Tableau 13: Résultats du test antigénique et la charge virale des échantillons.

Echantillon	Charge virale	Test antigénique
01	intermédiaire	POSITIF
02	intermédiaire	POSITIF
03	Elevée	POSITIF
04	Elevée	POSITIF
05	intermédiaire	POSITIF
06	Basse	POSITIF
07	intermédiaire	POSITIF
08	intermédiaire	POSITIF
09	Elevée	POSITIF
10	intermédiaire	POSITIF
11	intermédiaire	POSITIF
12	intermédiaire	POSITIF
13	intermédiaire	POSITIF
14	intermédiaire	POSITIF
15	Basse	NEGATIF
16	intermédiaire	POSITIF
17	intermédiaire	POSITIF
18	intermédiaire	POSITIF
19	intermédiaire	POSITIF
20	Basse	NEGATIF
21	Elevée	POSITIF
22	intermédiaire	POSITIF
23	Elevée	POSITIF
24	Elevée	POSITIF
25	intermédiaire	POSITIF
26	intermédiaire	POSITIF
27	intermédiaire	POSITIF
28	Basse	POSITIF
29	intermédiaire	POSITIF
30	intermédiaire	POSITIF
31	intermédiaire	POSITIF
32	intermédiaire	POSITIF
33	intermédiaire	POSITIF
34	Basse	NEGATIF

35	intermédiaire	POSITIF
36	intermédiaire	POSITIF
37	intermédiaire	POSITIF
38	intermédiaire	POSITIF
39	intermédiaire	POSITIF
40	Elevée	POSITIF
41	intermédiaire	POSITIF
42	intermédiaire	POSITIF
43	intermédiaire	POSITIF
44	intermédiaire	POSITIF
45	intermédiaire	POSITIF
46	intermédiaire	POSITIF
47	intermédiaire	POSITIF
48	intermédiaire	POSITIF
49	intermédiaire	POSITIF
50	intermédiaire	POSITIF

Ainsi, l'évaluation des performances du **TEST NADAL® COVID-19 Ag** pour la détection d'antigène nucléoprotéiques viraux du SARS-CoV-2 reposera sur l'évaluation à la fois de la sensibilité et de la spécificité qui s'expriment en termes de probabilité et par un pourcentage (76).

- **La sensibilité** = $VP / VP + FN$: est la probabilité du résultat positif du test chez les sujets porteurs de la maladie telle qu'elle est définie par le gold standard appelée également taux de vrais positifs (76).
- **La spécificité** = $VN / FP + VN$: est la probabilité du résultat négatif de test chez les patients définis comme non malades appelée également taux de vrais négatifs (76).

Pour l'ensemble des échantillons sélectionnés pour l'étude des performances TEST NADAL® COVID-19 Ag (**Tableau 14**) :

Tableau 14 : Performance du **TEST NADAL® COVID-19 Ag**

		Test de référence (qRT PCR)	
		Positif 47	Négatif 03
TEST NADAL® COVID-19 Ag	Positif 47	VP 47	FP 00
	Négatifs 03	FN 00	VN 03
		Sensibilité 94%	Spécificité 100%

III. DISCUSSION :

Cette étude déroulée au laboratoire au centre de dépistage de COVID19 de nouvel EPH D'ADRAR, son but était d'expérimenter la démarche diagnostic COVID-19 et d'évaluer la performance du **TEST NADAL® COVID-19 Ag** en termes de sensibilité et de spécificité.

L'évaluation de la performance de test de dépistage a été faite selon le schéma suivant: Tous les échantillons ont été testés au **TEST NADAL® COVID-19 Ag**. Et tous les échantillons ont été confirmés par la qRT-PCR selon la stratégie diagnostique décrite dans notre étude.

A l'échelle mondiale, certaines études se sont intéressées à l'évaluation de la performance du **TEST NADAL® COVID-19 Ag** :

Dans une étude menée par (Gannon CK Mak, Stephen SY Lau , Kitty KY Wong , Nancy LS Chow , CS Lau , Edman TK Lam , Rickjason CW Chan , Dominic NC Tsang) du 16 mars 2020 et le 15 août 2020 au laboratoire de santé publique (PHLSB) à Hong Kong. Evaluant le même test étudié dans notre travail. L'étude a été effectuée sur 280 échantillons. Les performances du **TEST NADAL® COVID-19 Ag** ont été évaluées et les résultats ont montré une sensibilité de 77,8 % à 100 %. (77).

Dans une autre étude menée par (Niko Kohmer , Tuna Toptan , Christiane Pallas , Onur Karaca , Annika Pfeiffer , Sandra Westhaus, Marek Widera , Annemarie Berger, Sebastian Hoehl , Martin Kammel , Sandra Ciesek and Holger F. Rabenau) en Novembre 2020 a l'institut de virologie médicale, hôpital universitaire, université Goethe de Francfort (Allemagne) . Évaluant les performances des tests antigéniques dont l'une concerne le même test évalué par notre étude. Les performances du Test **TEST NADAL® COVID-19 Ag** ont été évaluées en utilisant un panel de 100 échantillons, la sensibilité du test était de 71%. (78)

Toutes ces études ont montré une sensibilité inférieure à celle mentionnée par le fabricant, qui est de **80,21%**. (**NADAL® COVID-19 Ag Test (test cassette)**)

En ce qui concerne notre étude, le **TEST NADAL® COVID-19 Ag** a été utilisé sur 50 échantillons, la sensibilité retrouvée était de 98.9%. Cette valeur est largement supérieure à celles démontrées dans les études suscitées. Néanmoins, en termes de spécificité qui était à

l'ordre de 100% non seulement dans notre étude mais ce pourcentage est similairement partagé dans l'ensemble des études discuté

Aussi, Notre étude a démontré une bonne corrélation entre la charge virale es tests qRT-PCR et la sensibilité des tests antigéniques, cela signifie que la sensibilité de test **NADAL® COVID-19 Ag** dépend de la charge virale. Il convient de noter que bien que nos données aient indiqué que le kit **NADAL® COVID-19 Ag** était capable de détecter le virus SARS-COV-2.

CONCLUSION

CONCLUSION :

En conclusion, le **TEST NADAL® COVID-19 Ag** est un test qui combine à la fois une haute performance pour le diagnostic du COVID-19 et une haute simplicité de réalisation. De plus, il permet une détection virale plus rapidement, par rapport à la qRT-PCR. Cependant, en même temps, nous devons comprendre qu'en raison de la limitation de la sensibilité basée sur la détection, il existe toujours un certain pourcentage de résultats faux négatifs. Lors du dépistage d'individus asymptomatiques dans des environnements connus pour avoir une faible prévalence, comme l'école, le lieu de travail et les grands rassemblements, donc les résultats négatifs par **TEST NADAL® COVID-19 Ag** doivent être confirmés par le qRT-PCR.

À ce jour, qRT-PCR reste la méthode de laboratoire standard pour diagnostiquer la COVID-19

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

- 1- Zhu, N.; Zhang, D.; Wang, W.; Li, X.; Yang, B.; Song, J.; Zhao, X.; Huang, B.; Shi, W.; Lu, R.; et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* 2020, 382, 727–733. [CrossRef]
- 2- Sohrabi, C.; Alsafi, Z.; O’Neill, N.; Khan, M.; Kerwan, A.; Al-Jabir, A.; Iosifidis, C.; Agha, R. World Health Organization declares global emergency: A review of the 2019 novel coronavirus (COVID-19). *Int. J. Surg.* 2020, 76, 71–76. [CrossRef]
- 3- Tarek Alouane, et al. Genomic Diversity and Hotspot Mutations in 30,983 SARS-CoV-2 Genomes: Moving Toward a Universal Vaccine for the “Confined Virus”?. *Pathogens* 2020, 9, 829; doi:10.3390/pathogens9100829
- 4- L. Zou, F. Ruan, M. Huang, L. Liang, H. Huang, Z. Hong, J. Yu, M. Kang, Y. Song, J. Xia, SARS-CoV-2 viral load in upper respiratory specimens of infected patients, *New England Journal of Medicine*, 382 (2020) 1177-1179.
- 5- D. Wang, B. Hu, C. Hu, F. Zhu, X. Liu, J. Zhang, B. Wang, H. Xiang, Z. Cheng, Y. Xiong, Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus–infected pneumonia in Wuhan, China, *JAMA*, 323 (2020) 1061-1069.
- 6- Institut Pasteur Algerie [En ligne]. Disponible: <https://www.pasteur.fr/fr/institut-pasteur-algerie> [Consulté: 29-03-2022].
- 7- S. Nimesh, S. Bharat, M. Abhay, N. Neeti, and P. Archana, “Corona Virus: An Immunological Perspective Review,” *Int. J. Immunol. Immunother.*, vol. 7, no. 2, 2020.
- 8- A. Bonnin, “Caractérisation de la protéine S du coronavirus humain 229E,” 2018.
- 9- V. Bonny, A. Maillard, C. Mousseaux, L. Plaçais, and Q. Richier, “COVID-19: Pathogenesis of a multi-faceted disease,” *Rev. Med. Interne*, vol. 41, no. 6, pp. 375–389, 2020.
- 10- N. Kin and A. Vabret, “Les infections à coronavirus humains,” *Rev. Francoph. des Lab.*, vol. 2016, no. 487, pp. 25–33, 2016.
- 11- C. Lefeuvre, É. Przyrowski, and V. Aulaire-Marchais, “Virological aspects and diagnosis of SARS-CoV-2 coronavirus,” *Actual. Pharm.*, vol. 59, no. 599, pp. 18–23, 2020.
- 12- A. Vabret, J. Dina, E. Brison, J. Brouard, and F. Freymuth, “Coronavirus humains (HCoV),” *Pathol. Biol.*, vol. 57, no. 2, pp. 149–160, 2009.
- 13- M. Segondy, “Dossier scientifique Les coronavirus humains,” *RFL Rev. Francoph. des Lab.*, vol. 2020, no. January, pp. 32–39, 2020.
- 14- R. J. Mason, “Pathogenesis of COVID-19 from a cell biology perspective,” *Eur. Respir. J.*, vol. 55, no. 4, pp. 9–11, 2020
- 15- “Aspects virologiques et diagnostic du coronavirus Sars-CoV-2,” no. January, 2020.
- 16- D. Kim, J. Y. Lee, J. S. Yang, J. W. Kim, V. N. Kim, and H. Chang, “The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome,” *Cell*, vol. 181, no. 4, pp. 914–921.e10, 2020
- 17- W. Feng *et al.*, “Molecular Diagnosis of COVID-19: Challenges and Research Needs,” *Anal. Chem.*, vol. 92, no. 15, pp. 10196–10209, 2020
- 18- J. Collomb, Approche moléculaire et physico-chimique de la détection du coronavirus entérique bovin dans l’environnement To cite this version : HAL Id: tel-01747168 soutenance et mis à disposition de l’ensemble de la Contact : ddoc-thesescontact@univ-lorraine.fr. 2018.

- 19- R. D. U. Maroc, U. M. V. D. E. Rabat, F. D. E. Medecine, and E. T. D. E. Pharmacie, “Docteur en Médecine,” 2020.
- 20- I. Tratner, “SRAS : 1 . Le virus,” 2003.
- 21- J. Shang *et al.*, “Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 117, no. 21, pp. 1–8, 2020.
- 22- S. T. Jean-Daniel Lelièvre, Agnès Gautheret-Dejean, Karine Petitprez and Les, *Aspects immunologiques et virologiques de l’infection par le SARS-CoV-2*. 2020.
- 23- I. Astuti and Ysrafil, “Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): An overview of viral structure and host response,” *Diabetes Metab. Syndr. Clin. Res. Rev.*, vol. 14, no. 4, pp. 407–412, 2020.
- 24- Rice, G.I., Thomas, D.A., Grant, P.J., Turner, A.J., Hooper, N.M., 2004. Evaluation of angiotensin-converting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism. *Biochem. J.* 383 (Pt 1), 45–51.
- 25- Zhang, L., Zetter, M.A., Guerra, E.C., Hernandez, V.S., Mahata, S.K., Eiden, L.E., 2021. ACE2 in the second act of COVID-19 syndrome: peptide dysregulation and possible correction with oestrogen. *J. Neuroendocrinol.* 33 (2), e12935.
- 26- M Hoffmann , H Kleine-Weber , S Schroeder , et al. , SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor, *Cell* 181 (2020) 271–280 e8 .
- 27- A. Gupta, et al., Extrapulmonary manifestations of COVID-19, *Nat Med* 26 (7) (2020) 1017–1032.
- 28- D Bestle , MR Heindl , H Limburg , et al. , TMPRSS2 and furin are both essential for proteolytic activation of SARS-CoV-2 in human airway cells, *Life Sci. Alliance* 3 (2020).
- 29- H Chakraborty , S Bhattacharjya , Mechanistic insights of host cell fusion of SARS–CoV-1 and SARS-CoV-2 from atomic resolution structure and membrane dynamics, *Biophys. Chem.* 265 (2020) 106438 .
- 30- B Coutard , C Valle , X de Lamballerie , et al. , The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade, *Antiviral Res.* 176 (2020) 104742 .
- 31- M Hoffmann , H Kleine-Weber , Pohlmann S A Multibasic , Cleavage site in the spike protein of SARS-CoV-2 is essential for infection of human lung cells, *Mol. Cell* 78 (2020) 779-84 e5 .
- 32- F Wu , S Zhao , B Yu , et al. , A new coronavirus associated with human respiratory disease in China, *Nature* 579 (2020) 265–269 .
- 33- Q Wang , J Wu , H Wang , et al. , Structural basis for RNA replication by the SARS–CoV-2 polymerase, *Cell* 182 (2020) 417–428 e13
- 34- S Buratta , B Tancini , K Sagini , et al. , Lysosomal exocytosis, exosome release and secretory autophagy: the autophagic- and endo-lysosomal systems go extracellular, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) .
- 35- Trends in Immunology, December 2020, Vol. 41, No. 12
- 36- C.F. Baer, Does mutation rate depend on itself, *PLoS Biol.* 6 (2) (2008) e52, <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060052>.
- 37- Sanjuan, R., Nebot, M.R., Chirico, N., Mansky, L.M., Belshaw, R., 2010. Viral mutation

- rates. *J. Virol.* 84, 9733–9748.
- 38- J. Gribble, et al., The Coronavirus Proofreading Exoribonuclease Mediates Extensive Viral Recombination, Preprint at bioRxiv, 2020, <https://doi.org/10.1101/2020.04.23.057786>.
- 39- J.W. Drake, Rates of spontaneous mutation among RNA viruses, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90 (1993) 4171–4175.
- 40- M. Eigen, Error catastrophe and antiviral strategy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (2002) 13374–13376.
- 41- A.E. Gorbalenya, L. Enjuanes, J. Ziebuhr, E.J. Snijder, Nidovirales: evolving the largest RNA virus genome, *Virus Res.* 117 (2006) 17–37.
- 42- Public Health England. SARS-CoV-2 lateral flow antigen tests: evaluation of VUI-202012/01. [cited 2020 23 December]. Available from: <https://www.gov.uk/government/publications/sars-cov-2-lateral-flow-antigen-tests-evaluation-of-vui-20201201/sars-cov-2-lateral-flow-antigen-tests-evaluation-of-vui-20201201>.
- 43- I. Astuti and Ysrafil, “Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): An overview of viral structure and host response,” *Diabetes Metab. Syndr. Clin. Res. Rev.*, vol. 14, no. 4, pp. 407–412, 2020.
- 44- N. Murgolo *et al.*, “SARS-CoV-2 tropism, entry, replication, and propagation: Considerations for drug discovery and development,” *PLoS Pathog.*, vol. 17, no. 2, pp. 1–18, 2021.
- 45- S. Nimesh, S. Bharat, M. Abhay, N. Neeti, and P. Archana, “Corona Virus: An Immunological Perspective Review,” *Int. J. Immunol. Immunother.*, vol. 7, no. 2, May 2020.
- 46- A. Rousseau, J. R. Fenolland, and M. Labetoulle, “SARS-CoV-2, COVID-19 and the eye: An update on published data,” *J. Fr. Ophthalmol.*, vol. 43, no. 7, pp. 642–652, 2020
- 47- D. S. Battagello, G. Dragunas, M. O. Klein, A. L. P. Ayub, F. J. Velloso, and R. G. Correa, “Unpuzzling COVID-19: Tissue-related signaling pathways associated with SARS-CoV-2 infection and transmission,” *Clin. Sci.*, vol. 134, no. 16, pp. 2137–2160, 2020.
- 48- K. V. Swanson, M. Deng, and J. P. Y. Ting, “The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics,” *Nature Reviews Immunology*, vol. 19, no. 8. Nature Publishing Group, pp. 477–489, 01-Aug-2019.
- 49- “Inflammasome (NLPR3) -.” [En ligne]. Disponible: <http://gbsleiden.com/inflammasome-nlpr3/>. [Consulté: 29-Jun-2021].
- 50- N. Vabret *et al.*, “Immunology of COVID-19: Current State of the Science,” *Immunity*, vol. 52, no. 6, pp. 910–941, 2020.
- 51- B. Combadière, “Immunité adaptative contre le virus SARS-CoV-2,” *Médecine/Sciences*, vol. 36, no. 10, pp. 908–913, 2020.
- 52- L. Zhang and H. Guo, “Biomarkers of COVID-19 and technologies to combat SARS-CoV-2,” *Adv. Biomark. Sci. Technol.*, vol. 2, pp. 1–23, 2020.
- 53- L. Yang *et al.*, “COVID-19: immunopathogenesis and Immunotherapeutics,” *Signal Transduct. Target. Ther.*, vol. 5, no. 1, pp. 1–8, 2020.

- 54- A. ACHOURI, "Place de la serologie dans l'infection au sars-cOv-2," 2020.
- 55- "Suivez la propagation de la COVID-19 à travers le monde | Le Devoir." [En ligne]. Disponible: https://www.ledevoir.com/documents/special/20-03_covid19-carte-dynamique/index.html. [Consulté: 04-Jun-2021].
- 56- RAPPORT DE SITUATION SUR L'EPIDEMIE DU COVID-19 EN ALGERIE, Rapport N° 542 ; Date du rapport : 21 septembre 2021 ; Date des Données : 20 septembre 2021
- 57- M. et al Mahmoud, "Et Diagnostic Biologique," no. January, 2020.
- 58- T. Traitements, V. Situation, and L. Qu, "Fiche épidémiologique et clinique de la COVID-19," no. 1, 2021
- 59- T. D. R. A. Sars-cov- and T. D. R. A. Covid-, "Ct RT-PCR ET CONTAGIOSITÉ SÉROLOGIE POST VACCINALE TDR Ag COVID-19," 2020
- 60- "Épidémiologie – COVID Reference." [En ligne]. Disponible: https://covidreference.com/epidemiology_fr. [Consulté: 04-Jun-2021].
- 61- "COVID-19 : ce qu'il faut savoir." [En ligne]. Disponible: <https://www.who.int/fr/news-room/q-a-detail/coronavirus-disease-covid-19>. [Consulté : 04-Jun-2021].
- 62- M. M. Parida, S. Sannarangaiah, P. K. Dash, P. V. L. Rao, and K. Morita, "Loop mediated isothermal amplification (LAMP): A new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases," *Rev.Med. Virol.*, vol. 18, no. 6, pp. 407–421, 2008.
- 63- S. Panno *et al.*, "Loop mediated isothermal amplification: Principles and applications in plant virology," *Plants*, vol. 9, no. 4, pp. 1–28, 2020.
- 64- N. N. T. Nguyen, C. McCarthy, D. Lantigua, and G. Camci-Unal, "Development of Diagnostic Tests for Detection of SARS-CoV-2," *Diagnostics*, vol. 10, no. 11, p. 905, 2020.
- 65- T. Lamia *et al.*, "Sars-cov-2 infection virological diagnosis [Diagnostic virologique de l'infection par le sars-cov-2]," *Tunisie Medicale*, vol. 98, no. 4, pp. 304–308, 2020.
- 66- C. H. Mustapha, "Diagnostic virologique de COVID-19," pp. 1–3, 2020.
- 67- "Amplification génique par PCR en temps réel -." [En ligne]. Disponible: <https://microbiologiemedicale.fr/biologie-moleculaire-amplification-genique-pcr-temps-reel/>. [Disponible: 11-Jun-2021].
- 68- P. Red, "MicroTest™ M4RT ®."
- 69- RT-Pcr, "Real-time PCR : Understanding C t," no. C, 2000
- 70- S. Hantz, "Diagnostic biologique de l'infection à Sars-CoV-2 : stratégies et interprétation des résultats," *Rev. Francoph. des Lab.*, vol. 2020, no. 526, pp. 48–56, 2020.
- 71- "Aspects Virologiques Et Diagnostiques," no. January, 2020
- 72- J.-L. Gala, O. Nyabi, J.-F. Durant, N. Chibani, and M. Bentahir, "Méthodes diagnostiques du COVID-19," no. 1, pp. 228–235, 2020
- 73- S. M. Lamia Thabet, Selma Mhalla, Neila Hannachi, Hla Karray Hakim, Abdelhalim Trabelsi, Hamdi Dhaouadi, "Stratégie du Diagnostic virologique du SARS-CoV-2," pp.1–7, 2020
- 74- TaqPath™ COVID-19 CE-IVD RT-PCR Kit INSTRUCTIONS FOR USE, Catalog Number A48067, Publication Number MAN0019215, Revision E.0
- 75- NADAL® COVID-19 Ag Test (test cassette) REF 243103N-20 Version 1.2, 2020-09-02
- 76- "Sensibilité et spécificité d'un test diagnostique / Société Française de Médecine

d'Urgence - SFMU.” [En ligne]. Disponible: <https://www.sfm.u.org/fr/vieprofessionnelle/outils-professionnels/ebm/sesp>. [Consulté: 14-Aug-2021].

- 77- Analytical sensitivity and clinical sensitivity of the three rapid antigen detection kits for detection of SARS-CoV-2 virus Gannon CK Mak *, Stephen SY Lau , Kitty KY Wong , Nancy LS Chow , CS Lau , Edman TK Lam , Rickjason CW Chan , Dominic NC Tsang
- 78- (The Comparative Clinical Performance of Four SARS-CoV-2 Rapid Antigen Tests and Their Correlation to Infectivity In Vitro Niko Kohmer 1,†, Tuna Toptan 1,† , Christiane Pallas 1, Onur Karaca 1, Annika Pfeiffer 1 , Sandra Westhaus 1, Marek Widera 1 , Annemarie Berger 1, Sebastian Hoehl 1 , Martin Kammel 2,3, Sandra Ciesek 1,4,5,* ,† and Holger F. Rabenau 1