

Année 2021

N°: MM0142021

**MEMOIRE DE MASTER**

MASTER DE « **Biotechnologie Médicale** »

OPTION: « **Biomédicale** »

Intitulé

**Evaluation des performances analytiques (sensibilité et  
spécificité) du test d'amplification rapide Abbott ID NOW  
COVID-19 pour la détection du SARS-CoV-2**

Soutenu 20 Décembre 2021 par :  
**Rania BOUKRIT**

**Devant le jury composé de :**

**Pr. OUADGHIRI Mouna**, Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, Présidente

**Dr. OMARI Youssef**, Médecin Biologiste, Laboratoire Ibn Nafiss, Rabat, Encadrant

**Pr. BAHJI Mostafa**, Médecin Biologiste, Laboratoire International, Sidi Kacem, Examineur

## *Avant-propos*

*Le travail présenté dans ce projet de fin d'études est réalisé dans le cadre d'obtention du diplôme de Master de Biotechnologie Médicale à la faculté de Médecine et Pharmacie de Rabat, option Biomédicale, sous la direction du Pr. IBRAHIMI Azzedine, et sous la coordination du Pr. OUADGHIRI Mouna.*

*Les différentes étapes expérimentales de ce projet ont été élaborées au Laboratoire Ibn Nafiss d'analyses médicale, au sein de l'unité qRT-PCR COVID-19 à Rabat, sous l'encadrement du Dr. OMARI Youssef.*

# Remerciements

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

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

*J'adresse mes sincères remerciements au **Pr. IBRAHIMI Azzedine** chef du laboratoire de Biotechnologie médicale à la faculté de médecine et pharmacie Rabat. Veuillez trouver ici l'expression de ma respectueuse considération et ma profonde admiration pour toutes vos qualités scientifiques et humaines.*

*Je ne manquerai pas de remercier notre coordinatrice de ce Master, et présidente de cette thèse, **Pr. OUADGHIRI Mouna**. Qu'elle trouve ici l'expression de mon respect.*

*Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements au **Dr. OMARI Youssef**, Médecin Biologiste du Laboratoire Ibn Nafiss de Rabat. Je lui suis reconnaissante pour sa contribution et pour sa sympathie. Vous trouverez ici l'expression de ma profonde gratitude.*

*Je remercie également **Pr. BAHJI Mostafa**, Médecin Biologiste du Laboratoire International de Sidi Kacem, pour avoir accepté de lire, critiquer et instruire cette thèse. Vous trouverez ici l'expression de mon infinie reconnaissance.*

*Je tiens à remercier **Mme. KARTTI Souad** et **Mr. BOURICHA El Mehdi**, les membres du Laboratoire MedBiotech pour leur soutien et pour le temps conséquent qu'ils m'ont accordé.*

*Un remerciement particulier à **ELKHATTABI Kaoutar**. Vos encouragements inlassables, votre amabilité, votre gentillesse méritent toute admiration.*

*Un grand merci à mes collègues, les techniciens de l'unité biologie moléculaire qRT-PCR COVID du Laboratoire Ibn Nafiss, qui m'ont apportée énormément du support, qu'il soit d'ordre technique ou moral.*

*Enfin, merci à chacun qui a contribué au succès de mon stage et qui m'a aidée lors de la rédaction de ce travail.*

## Dédicace

*A mes chers parents, **BOUKRIT Siham** et **BOUKRIT Mohamed** pour tous leurs sacrifices, leur amour, soutien et leur prières tout au long de mes études. Veuillez trouver dans ce travail l'expression de mon respect le plus profond et mon affection la plus sincère.*

*A la mémoire de ma chère grand-mère **ELHANDOUZ Amina**, aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour elle. Qu'Allah lui fasse miséricorde.*

*A mon cher grand père **BOUKRIT Houcine**, je vous remercie pour tout le soutien et amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagnera toujours. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.*

*A mes adorables tantes, **Sabrina, Safae, Salma, Ikbal, Ijla**, sans votre aide, vos conseils et vos encouragements ce travail n'aurait vu le jour.*

*A Tout le reste de la famille **BOUKRIT**, Je vous dédie ce modeste travail et je prie Dieu qu'il vous garde.*

*A ma très chère cousine **CHARBI Hanane**, je te remercie énormément pour ton soutien quotidien.*

# Résumé

Lors de la pandémie COVID-19, la détection du SARS-CoV-2 repose principalement sur des tests d'amplification quantitative par polymérase en temps réel (qRT-PCR) effectués dans des laboratoires certifiés. Certes, ces tests qRT-PCR sont très sensibles et spécifiques, néanmoins ils nécessitent des analyseurs coûteux et complexes manipulés par des laborantins hautement qualifiés, de plus ils exigent généralement un délai d'exécution allant de 4h jusqu'à 6h ce qui peut entraîner un retard d'application des mesures sanitaires. Ainsi, des tests de diagnostic rapide ont été développés, tel que le test Abbott ID NOW COVID-19 basé sur l'amplification isotherme médiée par la boucle de transcription inverse (RT-LAMP) et qui est réalisé à l'aide d'un petit automate portable fournissant des résultats en 5 minutes en cas de positivité et un résultat final en 13 minutes pour les négatifs.

L'objectif de ce travail est d'évaluer la performance du test moléculaire rapide ID NOW COVID-19 en termes de sensibilité et spécificité. Il s'agit donc d'une étude observationnelle et comparative, utilisant une collection de 31 écouvillons nasopharyngés prélevés au Laboratoire *Ibn Nafiss* à l'intérieur de l'unité biologie moléculaire à Rabat.

L'algorithme de diagnostic dans notre étude était le dépistage des échantillons par le test moléculaire rapide RT-LAMP ID NOW-COVID-19, suivi d'une confirmation de tous les échantillons par la technique de référence qRT-PCR réalisé sur thermocycleur qTOWER.

Après analyse des données, le test moléculaire rapide ID NOW COVID-19 a donné une sensibilité de 98.9%, et une spécificité de 100%. Il ressortait donc, dans notre étude que ce test possède une excellente spécificité et une très bonne sensibilité.

***Titre :*** *Evaluation des performances analytiques (sensibilité et spécificité) du test d'amplification rapide Abbott ID NOW COVID-19 pour la détection du SARS-COV-2.*

***Auteur:*** *BOUKRIT Rania*

***Mots clés :*** *SARS-CoV-2, diagnostic, qRT-PCR, RT-LAMP, ID NOW, sensibilité, spécificité*

# *Abstract*

During the COVID-19 pandemic, the detection of SARS-CoV-2 relied essentially on quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) tests performed in certified laboratories. Although the RT-PCR test is highly sensitive and specific, it requires expensive and complex analyzers manipulated by a highly trained technician, it also requires sometimes a turnaround time of up to 6 hours, which can lead to delays in the application of sanitary measures. Thus, rapid diagnostic tests have been developed, such as the ABBOTT ID NOW COVID-19 based on isothermal amplification mediated by the reverse transcription loop (RT-LAMP) and which is performed using a small device providing results in 5 minutes in case of positivity and in 13 minutes in case of negative results.

The objective of this work is to evaluate the performance of the ID NOW COVID-19 rapid molecular test in terms of sensitivity and specificity. It was therefore an observational and comparative study, using a collection of 31 nasopharyngeal swabs taken at the *Ibn Nafiss* Laboratory within the molecular biology unit in Rabat.

The diagnostic algorithm in our study was the screening of samples by the rapid molecular test RT-LAMP ID NOW-COVID-19, followed by a confirmation of all samples by the reference technique RT-PCR performed on qTOWER thermocycler.

After data analysis, the ID NOW COVID-19 rapid molecular test gave a sensitivity of 98.9% and a specificity of 100%. Thus, in our study, this test has an excellent specificity and a very good sensitivity.

***Title:*** Evaluation of the analytical performance (sensitivity and specificity) of the Abbott ID NOW COVID-19 rapid amplification test for SARS-COV-2 detection.

***Author:*** BOUKRIT Rania

***Keywords:*** SARS-CoV-2, diagnosis, RT-PCR, RT-LAMP ID NOW, sensitivity, specificity

# ملخص

خلال جائحة كوفيد 19 يعتمد الكشف عن فيروس كورونا المستجد سارس كوف 2 بشكل اساسي على تقنية الاستنساخ العكسي في الوقت الحقيقي-التفاعل البوليميري المتسلسل (RT-PCR) وهي إحدى أدق الاساليب المستخدمة للكشف عن هذا الفيروس والتي تجرى داخل مختبرات معتمدة. وبطبيعة الحال، تنسم هذه الفحوصات بحساسية عالية ومحددة من شأنها توفير تشخيص موثوق، الا انها تتطلب ليس فقط اجهزة باهظة التكاليف بل ايضا طاقم تقني مؤهل تأهيلا عاليا، بالإضافة الى انها تحتاج مهلة زمنية قد تصل احيانا إلى 6 ساعة لإصدار نتائج نهائية الامر الذي قد يؤدي الى تأخير في تطبيق التدابير الصحية الوقائية. ونتيجة لذلك، تم وضع اختبارات تشخيصية سريعة، مثل ID NOW كوفيد 19 والذي يتم تنفيذه باستخدام جهاز محمول صغير يوفر نتائج في غضون 5 دقائق في حالة نتيجة إيجابية وفي غضون 13 دقيقة في حالة نتيجة سلبية .

والهدف من هذا العمل هو تقييم أداء هذا الاختبار السريع من حيث الحساسية والخصوصية، باستخدام 31 عينة من إفرازات الانف تم جمعها في مختبر ابن نافيس داخل وحدة البيولوجيا الجزيئية في الرباط. فقد كانت استراتيجية هذه الدراسة كالتالي: فحص العينات عن طريق الكشف السريع، تلاه تأكيد بواسطة تقنية RT-PCR المرجعية التي أجريت على جهاز qTOWER .

وبعد تحليل البيانات، أعطى الاختبار الجزيئي السريع ID NOW كوفيد 19 حساسية قدرها 98.9%، وخصوصية قدرها 100% فقد ظهر في دراستنا ان هذا الاختبار خصوصية وحساسية ممتازين .

**العنوان:** تقييم الأداء التحليلي (الحساسية والخصوصية) للاختبار التضخيم ID NOW كوفيد 19 للكشف السريع عن فيروس كورونا المستجد سارس كوف 2.

**المؤلف:** بوكريت رانيا

**كلمات رئيسية:** فيروس كورونا المستجد سارس كوف 2- تقنية الاستنساخ العكسي في الوقت الحقيقي- ID NOW كوفيد 19- الحساسية-الخصوصية

## Liste des abréviations

<b>ACE2</b>	Angiotensine Converting Enzyme 2
<b>ADNc</b>	Acide désoxyribonucléique complémentaire
<b>Ang</b>	Angiotensine
<b>ARN</b>	Acide Ribonucléique
<b>ARNg</b>	Acide ribonucléique génomique
<b>ASC</b>	Apoptosis-associated speck-like protein
<b>AT1R</b>	Angiotensine Type 1 Receptor
<b>BIP</b>	Backward Inner Primer
<b>Casp-1</b>	Caspase-1
<b>3CLpro</b>	3C-like proteinase
<b>CLIA</b>	<i>ChemiLuminescence Immuno-Assay</i>
<b>CMH</b>	Complexe Majeur d'Histocomptabilité
<b>CPA</b>	Cellules présentatrices d'antigènes
<b>Ct</b>	Cycle threshold
<b>CTD</b>	Domaine C-terminal
<b>DMV</b>	Vésicules à double membrane
<b>ELISA</b>	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
<b>EPI</b>	Equipements de protection individuelle
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>FIP</b>	Forward Inner Primer
<b>FN</b>	Faux négatif
<b>FP</b>	Faux positif
<b>GM-CSF</b>	Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor
<b>HAT</b>	Human-Airway Trypsin
<b>HCOV</b>	Coronavirus humains
<b>HE</b>	Hémagglutinine-estérase
<b>HR</b>	Heptad repeat
<b>IC</b>	Intracellulaire
<b>IFITM</b>	Interferon-Inducible Transmembrane Proteins
<b>IFN</b>	Interférons
<b>Ig</b>	Immunoglobuline
<b>IKK</b>	Inhibitor of Nuclear factor-kappaB kinase
<b>IL</b>	Interleukine
<b>IRF</b>	Interferon regulatory factor
<b>LFA</b>	Lateral Flow Assay
<b>MCP</b>	Monocyte chemoattractant protein
<b>ME</b>	Microscopie électronique

<b>MERS-CoV</b>	Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus
<b>Mpro</b>	Main protease
<b>MyD88</b>	Myeloid differentiation factor 88
<b>NF-kB</b>	Nuclear factor-kappaB
<b>NK</b>	Natural killer
<b>NOD</b>	Nucleotide-Binding Oligomerization Domain
<b>NTD</b>	Domaine N-terminal
<b>OC</b>	Organ Cultures
<b>OMS</b>	Organisation mondiale de la santé
<b>ORF</b>	Open Reading Frame
<b>PLpro</b>	Papaine-like protease
<b>Protéine E</b>	Protéine d'enveloppe
<b>PF</b>	Peptide de fusion
<b>Protéine M</b>	Protéine de membrane
<b>Protéine nsp</b>	Protéines non structurales
<b>Protéine S</b>	Protéine Spike
<b>PRRs</b>	Pattern Recognition Receptors
<b>qRT PCR</b>	Quantitative Real time Polymerase Chain Reaction
<b>R0</b>	Taux de reproduction de base
<b>RBD</b>	Receptor Binding Domain
<b>RdRP</b>	ARN polymérase ARN-dépendante
<b>RE</b>	Réticulum endoplasmique
<b>RTC</b>	Complexe réplicase-transcriptase
<b>RT-LAMP</b>	Real Time Loop-Mediated isothermal amplification
<b>SARS-CoV</b>	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus
<b>SDRA</b>	Syndrôme de détresse respiratoire aigue
<b>SNPs</b>	Single Nucleotide Polymorphism
<b>TACE</b>	TNF $\alpha$ converting enzyme
<b>TLR</b>	Toll- Like Receptor
<b>TM</b>	Transmembranaire
<b>TMPRSS2</b>	Tansembrane Protease, Serine Subfamily Member 2
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Tumor Necrosis Factor
<b>TRIF</b>	Tir-containing adapter inducing IFN $\beta$
<b>TRS</b>	Transcriptional regulatory sequence
<b>UTR</b>	Untranslated region
<b>VN</b>	Vrai négatif
<b>VP</b>	Vrai positif

# *Liste des tableaux*

<b>Tableau 1:</b> Classification des coronavirus responsables d'infections humaines .....	4
<b>Tableau 2:</b> Les fonctions des protéines non structurales. ....	10
<b>Tableau 3:</b> Classification des états des patients COVID-19.....	26
<b>Tableau 4:</b> Résultats identifiés à partir des détections de l'ARN viral et des anticorps sérologiques (IgM et IgG).....	32
<b>Tableau 5:</b> Les réactifs du kit PCR GeneProof SARS-CoV-2. ....	34
<b>Tableau 6:</b> Les cibles de la qRT-PCR SARS-CoV-2.....	35
<b>Tableau 7:</b> Interprétation des résultats qRT-PCR SARS-CoV-2.....	38
<b>Tableau 8:</b> Les résultats qRT-PCR SARS-CoV-2. ....	38
<b>Tableau 9:</b> Les résultats du RT-LAMP ID NOW COVID-19.....	39
<b>Tableau 10:</b> Résultats de la catégorisation des tests RT-LAMP ID NOW.....	39
<b>Tableau 11:</b> Performance du test rapide RT-LAMP COVID-19.....	40

# Liste des figures

<b>Figure 1:</b> L'aspect d'un coronavirus en ME .....	5
<b>Figure 2:</b> Les cellules alvéolaires humaines de type II infectées par le SARS-CoV-2 .....	5
<b>Figure 3:</b> La structure schématique du SARS-CoV-2 .....	6
<b>Figure 4:</b> L'organisation génomique du SARS-CoV-2 .....	6
<b>Figure 5:</b> Représentation schématique de la structure tridimensionnelle (3D) de la protéine S. .....	8
<b>Figure 6:</b> Représentation schématique de la structure (1D) de la protéine S.....	8
<b>Figure 7:</b> Génome viral et protéines non structurales du SARS-CoV-2.....	9
<b>Figure 8:</b> Les deux voies d'entrée du SARS-CoV-2 .....	11
<b>Figure 9:</b> L'entrée du SARS-CoV-2 via les endosomes .....	12
<b>Figure 10:</b> Cycle viral du SARS-CoV-2.....	14
<b>Figure 11:</b> Activation des voies de signalisations et libération des cytokines suite à l'infection par SARS-CoV-2 .....	16
<b>Figure 12:</b> Réponse immunitaire adaptative. ....	16
<b>Figure 13:</b> Protéines du SARS-CoV-2 ciblées par la réponse immunitaire adaptative. ....	17
<b>Figure 14:</b> Réponse immunitaire des cellules T4. ....	17
<b>Figure 15:</b> Cinétique des réponses humorales et cellulaires contre le SARS-CoV-2.....	18
<b>Figure 16:</b> Les mécanismes potentiels de l'immunopathologie induite par le SARS-CoV-2....	19
<b>Figure 17:</b> Les mécanismes impliqués dans la physiopathologie du COVID-19 .....	20
<b>Figure 18:</b> Evolution quotidienne des cas confirmés au Maroc entre le 02 mars et le 02 aout 2020 .....	22
<b>Figure 19:</b> La charge virale en fonction de la chronologie d'infection .....	24
<b>Figure 20:</b> Transsmion par aérosol et par formites.....	24
<b>Figure 21:</b> Principe de la PCR en temps réel .....	28
<b>Figure 22:</b> Représentation graphique des résultats du qRT-PCR .....	29
<b>Figure 23:</b> Principe de la technique RT-LAMP .....	31
<b>Figure 24:</b> Test immunochromatographique COVID-19 sur bandelette de nitrocellulose .....	32
<b>Figure 25:</b> Milieu de transport M4RT et écouvillon de prélèvement nasopharyngé. ....	33
<b>Figure 26:</b> L'extracteur automatique Genrui NE-01 A® .....	34
<b>Figure 27:</b> Réactifs du Kit GeneProof SARS-CoV-2 PCR .....	35
<b>Figure 28:</b> Thermocycleur qTOWER.....	35

<b>Figure 29:</b> Profil d'amplification SARS-CoV-2 .....	36
<b>Figure 30:</b> Automate et cartouches de réactifs ID NOW COVID-19 .....	36
<b>Figure 31:</b> Les réactifs du kit ID NOW COVID-19 et leurs emplacements dans ID NOW....	37
<b>Figure 32:</b> Ecouvillon du contrôle positif .....	37
<b>Figure 33:</b> Les courbes d'amplification .....	39

# Liste des annexes

<b>Annexe I :</b> Protocole de l'extraction d'ARN via Genrui Nucleic acid extraction kit (NE-01 A).....	47
<b>Annexe II :</b> Protocole de préparation de Master Mix réactionnel et dépôt de l'échantillon d'ARN viral.....	49
<b>Annexe III :</b> Protocole du test moléculaire rapide ID NOW COVID-19.....	50

# *Table des matières*

Avant-propos	
Remerciements	
Dédicaces	
Résumé	
Abstract	
ملخص	
Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Listes des figures	
Listes des annexes	
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
<b>PARTIE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	<b>2</b>
I. HISTORIQUE.....	2
II. CLASSIFICATION.....	3
III. PARTICULES CIRCULANTS DU SARS-CoV-2.....	4
IV. STRUCTURE DU SARS-CoV-2.....	5
1. Génome viral .....	5
1.1 Organisation du génome .....	6
2. Protéines structurales .....	7
2.1 La protéine N.....	7
2.2 La protéine S.....	8
2.3 La protéine M .....	9
2.4 La protéine E .....	9
3. Les protéines non structurales .....	9
V. CYCLE VIRAL .....	10
1. L'entrée du SARS-CoV-2 dans la cellule hôte.....	10
1.1 La voie d'entrée via la surface cellulaire .....	11
1.2 La voie d'entrée via les endosomes .....	12
2. La réplication du génome viral et synthèse des protéines virales : .....	13
VI. REPONSE IMMUNITAIRE A L'INFECTION PAR SARS-CoV-2 ET IMMUNOPATHOLOGIE DU COVID-19: .....	14
1. Réponse immunitaire innée:.....	14
2. Réponse immunitaire adaptative : .....	16
2.1 Réponse immunitaire cellulaire:.....	17
2.2 La réponse immunitaire humorale : .....	18
3. Immunopathologie du COVID-19 .....	19

VII. PHYSIOPATHOLOGIE DU COVID-19 .....	19
VIII. EPIDEMIOLOGIE .....	20
1. Réservoir et origine du SARS-CoV-2.....	20
2. Répartition mondiale .....	21
3. Répartition nationale.....	21
4. Les indicateurs épidémiologiques du SARS-CoV-2 .....	22
4.1 Le taux de létalité et le taux de mortalité.....	22
4.2 Taux de reproduction et facteur de dispersion .....	23
4.3 La période de contagiosité et la charge virale .....	23
4.4 La période d'incubation .....	24
5. Mode de transsmion.....	24
5.1 Transsmion par aérosols .....	24
5.2 Transmission par formites .....	25
5.3 Transmission par les selles et autres liquides biologiques.....	25
5.4 Transmission de la mère à l'enfant.....	25
5.5 Transmission nosocomiale .....	25
6. Symptomologie et complications .....	26
IX. DIAGNOSTIC VIROLOGIQUE DE L'INFECTION PAR SARS-CoV-2 .....	27
1. Diagnostic moléculaire .....	28
1.1 La détection du génome viral SARS-CoV-2 par qRT-PCR .....	28
1.2 La détection du génome viral SARS-CoV-2 par RT-LAMP .....	29
2. Diagnostic sérologique .....	31
<b>PARTIE II : PARTIE EXPERIMENTALE.....</b>	<b>33</b>
1. Type et lieu d'étude .....	33
2. L'analyse qRT-PCR COVID-19 .....	33
2.1 Echantillonnage .....	33
2.2 Extraction de l'ARN viral du SARS-CoV-2 :.....	33
2.3 Préparation du Mix réactionnel pour qRT-PCR SARS-CoV-2 et dépôt d'ARN viral .....	34
2.4 Amplification et détection en temps réel .....	35
3. L'analyse RT-LAMP ID NOW COVID-19.....	36
<b>PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>38</b>
I. RESULTATS DES qRT-PCR SARS-CoV-2.....	38
II. RESULTATS DES RT-LAMP ID NOW COVID-19 .....	39
III. RESULTAT DE LA PERFORMANCE DU TEST RAPIDE RT-LAMP ID NOW .....	39

IV. DISCUSSION.....	40
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>41</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>43</b>

## INTRODUCTION

À la fin du mois de décembre 2019, un nouveau coronavirus SARS-CoV-2 (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*) appartenant à la famille des *Coronaviridae* a provoqué une série d'infections respiratoires aiguës survenues à Wuhan, en Chine. La maladie causée par ce virus, appelée maladie à coronavirus 19 abrégé en COVID-19, s'est propagée dans le monde à un rythme alarmant et a été déclarée pandémie par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) le 11 Mars 2020 [1].

En effet, dans le contexte de la propagation du SARS-CoV-2, il est nécessaire d'identifier rapidement et précisément les patients infectés. Ainsi, le diagnostic virologique est basé essentiellement sur la technique conventionnelle à haute performance qui est l'amplification par polymérase en temps réel (RT-PCR). Cependant, cette méthode nécessite des équipements dédiés et une formation spécialisée des opérateurs, de plus l'obtention des résultats s'étale de 4h jusqu'à 6h, ce qui est par conséquent n'est pas adapté à la prise en charge des patients dans les services d'urgence. Par la suite, comme alternative les tests antigéniques ont été proposés, cependant ils manquent de sensibilité, et les résultats doivent être interprétés avec une très grande prudence [2] [3].

En revanche, un outil prometteur pour l'identification rapide des patients COVID-19 s'est développé et est le test moléculaire ID NOW COVID-19 réalisé sur un appareil facile à manipuler fournissant des résultats en 15 minutes et repose sur le principe d'amplification isotherme de l'acide nucléique RT-LAMP (*Real Time Loop-Mediated isothermal amplification*) [3]. Cependant, sa performance a été remise en question par rapport à sa fiabilité. D'ailleurs, l'objectif de ce travail, est l'évaluation de la performance analytique du test rapide ID NOW COVID-19 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 ID NOW COVID-19 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 I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

### 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 [4]. 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 [4].

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 [4].

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 [4].

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 [5]. 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 229<sup>E</sup>, 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 [4][5].

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 [4].

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 » [4]. 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* [6][7].

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* [4]. 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 [7].

## II. CLASSIFICATION :

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* [8][9].

Selon la taxonomie actuelle, la sous-famille *Coronavirinae* est subdivisé en quatre genres nommés Alpha-, Beta-, Gamma- et Deltacoronavirus [9]. 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) [10].

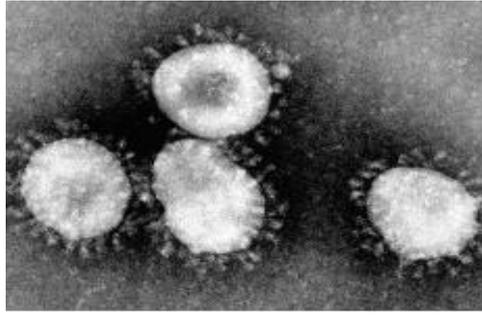
Actuellement, sept coronavirus sont capables d'infecter l'homme ; les HCoV-229E et HCoV-NL63 appartiennent au genre *Alphacoronavirus* et les autres coronavirus humains appartiennent au genre *Betacoronavirus* qui est lui-même subdivisé en quatre clades nommés clade A, clade B, clade C et clade D, dont les HCoV-HKU1 et –OC43 sont inclus dans le clade A, le SARS-CoV et le MERS-CoV appartiennent aux clades B et C respectivement (Tableau1) [9].

**Tableau 1:** Classification des coronavirus responsables d'infections humaines [9][11].

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

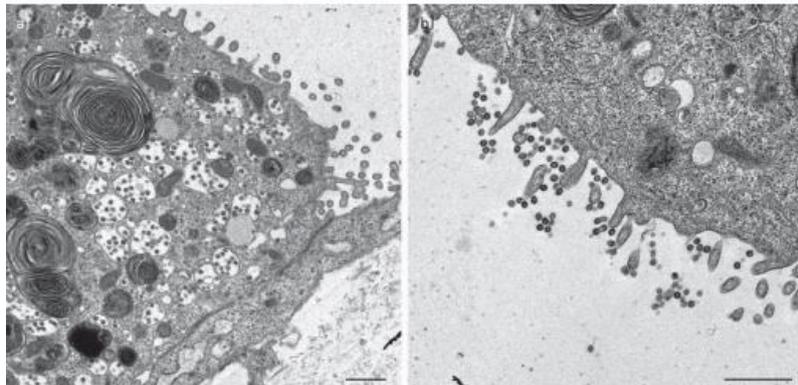
### III. PARTICULES CIRCULANTS DU SARS-CoV-2 :

Une observation d'une particule de coronavirus en microscopie électronique permet de distinguer des projections d'environ 20 nm ancrée sur la membrane virale conférant au coronavirus son aspect de couronne. C'est cet aspect particulier qui est à l'origine du nom de ce virus, le terme « corona » en latin, signifiant « couronne » (Figure 1) [10].



**Figure 1:** L'aspect d'un coronavirus en ME [10].

En effet, les cellules cibles du SARS-CoV-2 sont des cellules épithéliales : épithélium cilié de la muqueuse nasale, de la trachée, des bronches ou des alvéoles pulmonaires. De plus, le virus infecte préférentiellement les cellules alvéolaires de type II que les cellules de type I. Pour cette raison, les cellules alvéolaires humaines de type II ont été isolées, cultivées in vitro, puis infectées par le SARS-CoV-2 (Figure 2). Les particules virales sont visibles dans des vésicules à double membrane dans les cellules de type II et le long des microvillosités apicales [12].



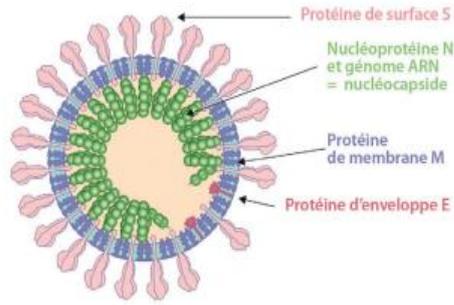
**Figure 2:** Les cellules alvéolaires humaines de type II infectées par le SARS-CoV-2 [12].

#### IV. STRUCTURE DU SARS-CoV-2 :

##### 1. Génome viral :

Les coronavirus sont des virus enveloppés sphériques dont la taille varie de 80 à 200 nanomètres [9]. En fait, le génome du coronavirus est le plus grand génome des virus à ARN répertoriés à ce jour, et cette très grande taille du génome permet l'émergence des variants [10].

La capside virale est formée par la nucléoprotéine (N) et le génome (ARNg) est contenu dans l'enveloppe virale ayant une symétrie hélicoïdale. Trois protéines structurales sont incrustées à la surface des particules virales : la protéine de membrane (M), la protéine d'enveloppe (E) et la protéine *Spike* (S) qui est responsable non seulement de l'aspect en couronne visible en microscopie électronique mais aussi de la dénomination de cette famille virale (Figure 3) [6].



**Figure 3:** La structure schématique du SARS-CoV-2 [13].

Le génome du SARS-CoV-2 a une taille qui varie de 29,8 kb à 29,9 kb. Il s'agit d'ARN monocaténaire linéaire non segmenté, positivement polarisé, comprenant une région codante divisée en deux tiers [9]:

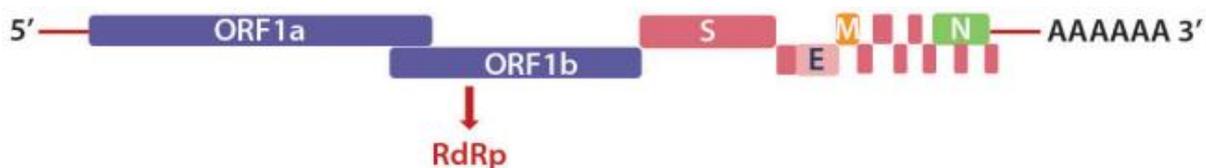
- les deux tiers 5' soit environ 18 à 20kb du génome codent pour un vaste gène réplicase qui sera traduit en deux polyprotéines clivées par la suite en 16 protéines non structurales indispensables à la réplication virale.
- les deux tiers 3' restant du génome code essentiellement pour les protéines de structures du virus dont 4 glycoprotéines membranaires.

#### 1.1 Organisation du génome :

Le génome du SARS-CoV-2 possède une extrémité 5' coiffée et une queue polyadénylée (polyA) en 3' (Figure 4).

L'extrémité 5' contient également une séquence régulatrice de transcription (*transcriptional regulatory sequence TRS*) leader et une région non traduite (*untranslated region UTR*) contenant plusieurs structures secondaires nécessaires à la réplication et à la transcription, ces structures sont également présentes dans 3'UTR [6].

L'ordre des gènes est inchangé parmi tous les membres de la famille des coronavirus, et est sous forme **5'-réplicase-S-E-M-N-3'** (Figure 4). Chaque gène est précédé d'une séquence régulatrice de la transcription TRS nécessaire à l'expression de chacun de ces gènes [6].



**Figure 4:** L'organisation génomique du SARS-CoV-2 [13].

D'une part, les deux-tiers 5' de l'ARN viral du SARS-CoV-2 sont constitués de deux cadres de lecture ouverts ou ORF (*Open Reading Frame*), nommés ORF1a et ORF1b (Figure 4):

- **L'ORF1a** : produit le polypeptide 1a (pp1a, 440-500 kDa) qui est clivé en 11 protéines non structurales (nsp). Le décalage de cadre de -1 ribosome se produit en amont du codon stop de l'ORF1a, permettant la poursuite de la traduction de l'ORF1b [14].
- **L'ORF1b** : produit un grand polypeptide (pp1ab, 740-810 kDa) qui est coupé en 5 nsps, ce clivage protéolytique est médié par les protéases virales nsp3 et nsp5 qui abritent respectivement un domaine protéase de type papaine et un domaine protéase de type 3C. D'ailleurs, l'ORF1b code le complexe de réplication-transcription qui est médié par nsp12, possédant une activité ARN polymérase ARN-dépendante (RdRP) [14].
- **L'ORF1ab** : est le plus grand ORF, il correspond à la fusion des ORF1a et ORF1b, et permet la traduction de la polyprotéine pp1ab grâce à un nœud de phase efficace à 25%. Cette polyprotéine est ensuite clivée par des protéases virales en 16 nsp nommées nsp1 à nsp16 impliquées dans le complexe de réplication et de transcription des coronavirus [14].

D'une autre part, le tiers 3' restant du génome est constitué par au moins quatre cadres de lecture ouverts :

- **L'ORF2, ORF4, ORF5, ORF9** : codent respectivement les gènes des protéines structurales (S, E, M et N).
- **L'ORF3, ORF6, ORF7, ORF8 et ORF10** : codent les gènes des protéines accessoires du SARS-CoV-2 [14].

## 2. Protéines structurales :

### 2.1 La protéine N :

La capsid virale du SARS-CoV-2 est formée par une nucléoprotéine (N) (419 acides aminés et 45.63 kDa [15]) qui est étroitement liée à l'ARN génomique (ARNg) et qui participe dans son encapsidation, favorisant ainsi son incorporation en stabilisant la structure en hélice de l'ARNg. Elle est également impliquée dans le processus de réplication de l'ARN. La protéine N est fortement phosphorylée et probablement cela entraîne des changements structurels augmentant ainsi l'affinité pour l'ARN viral [16].

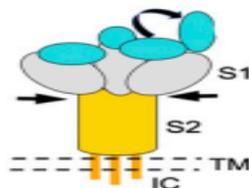
La nucléocapside est entourée d'une bicouche lipidique dérivée de la cellule hôte, dans laquelle sont enchâssées les trois protéines d'enveloppe S, M et E [6], et on note l'absence de l'hémagglutinine-estérase (HE) qui est une caractéristique commune des *Betacoronavirus* du clade A [17].

## 2.2 La protéine S :

La protéine S (*Spike*) est une glycoprotéine de grande taille (1273 acides aminés et de 141.18kDa [15]) , qui forme des extensions (spicules) à la surface de la particule virale [18]. Elle s'agit d'une protéine transmembranaire de type I fortement N-glycosylée, qui s'assemble en homotrimères à la surface de la particule virale, et lie le répéteur cellulaire du virus et lui permet de pénétrer dans la cellule [6].

La protéine S est composée par ; un ectodomaine, une ancre transmembranaire (TM) à passage unique et une queue intracellulaire (IC). Chaque monomère de la protéine S est divisé en deux sous-unités (Figure 5) [19]:

- **La sous-unité S1** d'attachement (partie globulaire) composée d'un domaine N-terminal (NTD) impliqué dans la fixation des sucres, et d'un domaine C-terminal (CTD) contenant le domaine de liaison au récepteur cellulaire RBD (*Receptor Binding Domain*)( Figure 6) [19].
- **La sous-unité S2** (partie en forme de tige) contient les quatre éléments requis pour la fusion membranaire virale ; un peptide de fusion (PF), deux répétitions heptadique HR1 (*heptad repeat 1*) et HR2 (*heptad repeat 2*), un domaine TM (Figure 6) [6][19].



**Figure 5:** Représentation schématique de la structure tridimensionnelle (3D) de la protéine S [18].



**Figure 6:** Représentation schématique de la structure (1D) de la protéine S [19].

Ainsi, la protéine S joue une double fonction dans l'entrée virale en permettant d'une part la liaison du récepteur cellulaire (S1) et d'autre part la fusion de l'enveloppe virale avec les membranes des cellules cibles (S2), d'où son rôle non seulement dans le tropisme cellulaire mais également dans la pathogénicité [6]. Par ailleurs, elle est la cible principale de la réponse immunitaire cellulaire et humorale, induisant la formation d'anticorps neutralisants. De ce fait, elle présente des régions hypervariables, lui permettant d'échapper à la pression immunitaire, et d'étendre son tropisme cellulaire lorsque cela est nécessaire [10].

### 2.3 La protéine M :

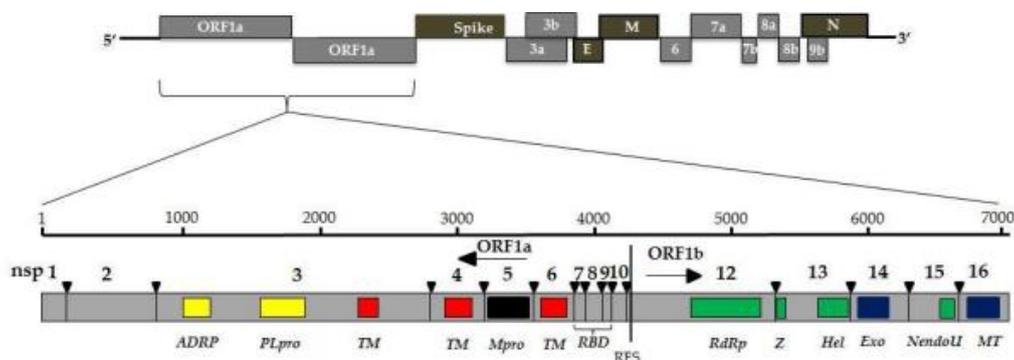
Cette protéine matricielle (222 acides aminés et de 25.14kDa [15]), doit son nom à son rôle dans les interactions entre l'enveloppe et la ribonucléoprotéine [16]. La protéine de membrane est la plus abondante de l'enveloppe et joue un rôle majeur dans l'assemblage des virions. Elle est capable d'interagir avec elle-même et avec toutes les autres protéines structurales [11]. La protéine M du SARS-CoV-2 est N-glycosylée. L'extrémité N-terminale, également appelée ectodomaine, est située à l'extérieur de la particule virale, tant dis que l'extrémité C-terminale qui constitue environ la moitié de la protéine, se situe à l'intérieur de la particule virale, et est donc nommée endodomaine [6].

### 2.4 La protéine E :

La protéine E est une protéine peu abondante (75 acides aminés et de 8.37 kDa [15]), elle n'est présente qu'en faibles quantités et est susceptible de former des canaux ioniques. Elle n'est pas obligatoire pour la réplication virale mais par contre est essentielle pour l'infectivité et la pathogénèse. Elle possède une extrémité N-terminale courte, suivie d'un domaine transmembranaire puis d'une extrémité C-terminale constituant la majorité de la protéine. La protéine E ne possède pas de peptide signal clivable ce qui indique que c'est une protéine transmembranaire de type II [6].

## 3. Les protéines non structurales :

Les protéines non structurales des coronavirus sont composées des ORF1a et ORF1b chevauchantes, ces derniers sont traduits en deux polyprotéines (pp1a et pp1ab) (Figure7) [6] qui vont être clivées par des protéases pour former le complexe ARN réplicase-transcriptase, constitué de 16 nsp (ORF1a : nsp1 à 11, ORF1b: nsp12 à 16) [20].



**Figure 7:** Génome viral et protéines non structurales du SARS-CoV-2 [21].

En effet, le génome du virus code pour 2 cystéine protéases, une protéase de type papaine (papaine-like protease (PLpro)) et une protéase de type sérine appartenant à la famille de la chymotrypsine (3C-like proteinase (3CLpro) ou Main protease (Mpro)) qui sont codées dans nsp3 et nsp5 respectivement. Ces protéases clivent les polypeptides pp1a et pplab, plus précisément la PLpro permet la libération des nsp1, nsp2 et nsp3, et la 3CLpro permet la libération des nsp4 à nsp16. Enfin, les nsps jouent un rôle important dans de nombreux processus des virus et des cellules hôtes (Tableau 2) [21].

**Tableau 2:** Les fonctions des protéines non structurales [20].

<b>Les protéines non structurales (nsp)</b>	<b>Fonctions</b>
<b>nsp 1 et nsp 3</b>	Inhibition de la signalisation de l'interféron et blocage de la réponse immunitaire innée de l'hôte par la promotion de la dégradation cellulaire, et aussi blocage de la traduction de l'ARN de l'hôte.
<b>nsp 2</b>	Liaison à la protéine de pro-inhibition.
<b>nsp 3 et nsp 5</b>	Favorise l'expression des cytokines et le clivage de la polyprotéine virale.
<b>nsp 4 et nsp 6</b>	Contribuer à la structure des vésicules à double membrane (DMV) en tant que protéine d'échafaudage transmembranaire.
<b>Complexe nsp7/nsp8</b>	Pince de processivité pour l'ARN polymérase par le complexe hexadécamérique des bras.
<b>nsp 9</b>	Protéine phosphatase liant l'ARN.
<b>nsp 10, nsp 16 et nsp 14</b>	Stimulation de l'activité de l'exoribonuclease (l'ExoN) et du 2'O-méthyltransférase (2'- O-MT).
<b>nsp 12</b>	Enzyme de réplication (ARN polymérase ARN-dépendante).
<b>nsp 13</b>	ARN hélicase, 5' triphosphatase
<b>nsp 14</b>	Correction d'épreuves du génome viral
<b>nsp 15</b>	Endoribonucléase virale et protéase de type chymotrypsine.
<b>nsp 16</b>	Éviter la reconnaissance de MDA5 et inhiber la régulation de l'immunité innée

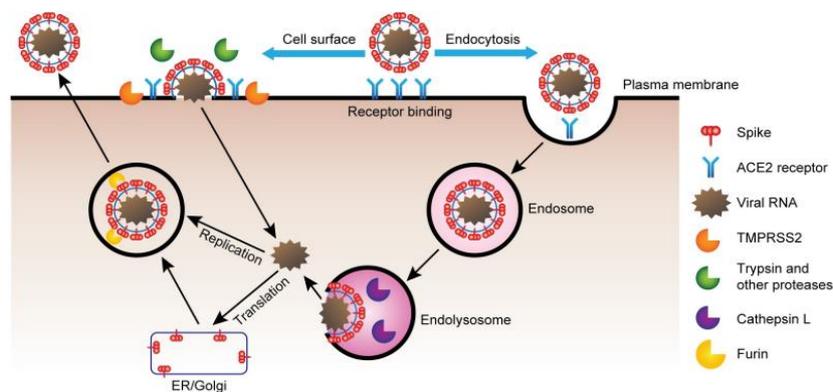
## V. CYCLE VIRAL :

### 1. L'entrée du SARS-CoV-2 dans la cellule hôte:

Généralement, la voie d'entrée des virus est définie par les interactions entre les particules virales et les récepteurs à la surface cellulaire [6]. Et étant donné que le SARS-CoV-2 est un

virus enveloppé donc après sa liaison initiale au récepteur, l'enveloppe virale doit fusionner avec les membranes de la cellule hôte pour libérer la nucléocapside dans la cellule cible. Cette fusion est stimulée par la protéine S qui subit de larges réarrangements conformationnels en raison du clivage protéolytique médiée par des protéases de surface cellulaire ou des protéases endosomales. En effet, il a été confirmé que le SARS-CoV-2 pénètre la cellule hôte par deux voies distinctes (Figure 8) ; (i) la voie de la surface cellulaire, (ii) la voie endocytique dans les compartiments endosomal-lysosomal [22].

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



**Figure 8:** Les deux voies d'entrée du SARS-CoV-2 [21].

En fait, l'entrée cellulaire du SARS-CoV-2 dépend essentiellement de la protéine S qui s'attache spécifiquement au récepteur cellulaire ACE2 (*Angiotensine Converting Enzyme 2*), grâce à une interaction de haute affinité environ  $\sim 10$  fois plus grande par rapport au SARS-CoV-1, ce qui peut faciliter l'invasion du virus dans les cellules et permettre sa propagation dans divers tissus [23]. L'ACE2 est une metalloprotéase impliquée dans la dégradation de l'angiotensine 2 en angiotensine 1-7 [7]. Il s'agit d'une protéine très fréquemment présente sur les membranes cellulaires, on la retrouve dans des cellules des alvéoles pulmonaires, de l'œsophage, des intestins, du pancréas, des parois artérielles et du cœur [24]. Récemment, une équipe internationale de chercheurs a trouvé que les cellules épithéliales nasales en particulier les cellules gobelets (sécrétrices) et les cellules ciliées présentent le taux le plus élevé d'ACE2 dans l'ensemble des voies respiratoires [21].

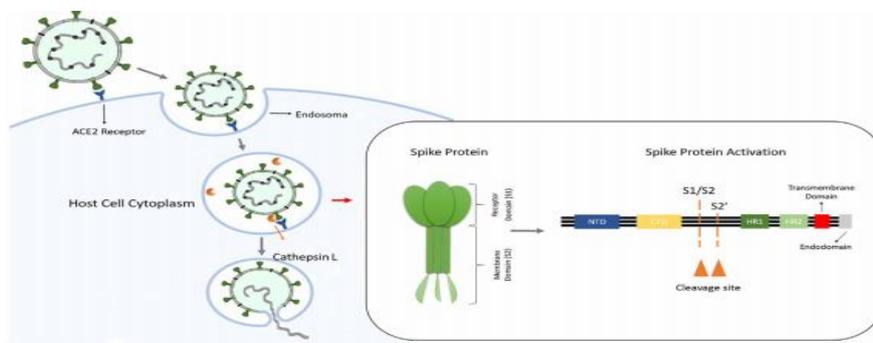
### 1.1 La voie d'entrée via la surface cellulaire :

La liaison de la sous unité S1 (partie globulaire) au récepteur ACE2 entraîne un changement de conformation qui expose la sous unité S2 (partie en forme de tige) et permet la fusion membranaire qui nécessite l'activation de la protéine S par le clivage protéolytique réalisée à

la surface cellulaire grâce à la protéase membranaire TMPRSS2 (*Transmembrane Protease, Serine Subfamily Member 2*) au niveau de deux sites [21]: un premier situé au niveau de l'arginine 667 à la jonction entre S1/S2 qui semble faciliter le second clivage au niveau de l'arginine 797 du site de clivage S2' [6][22]. En plus de TMPRSS2, d'autres protéases peuvent également activer la protéine *spike* telles que la trypsine et la HAT (*Human-Airway Trypsin*) pour favoriser la fusion à travers la voie cellulaire (Figure 8). Cependant, seule la TMPRSS2 est capable d'induire l'infection des cellules à la surface cellulaire tandis que la HAT pourrait jouer un rôle dans la propagation du virus. Outre, l'activation par TMPRSS2 protège la protéine S de l'inhibition par les IFITM (*Interferon-Inducible Transmembrane Proteins*), des protéines cellulaires induites par l'interféron qui inhibent l'entrée cellulaire de plusieurs virus enveloppés [6].

### 1.2 La voie d'entrée via les endosomes:

Après avoir interagi avec l'ACE2 dans la cellule hôte, le virus peut également entrer dans la cellule via les endosomes c'est-à-dire de vésicules intracellulaires dont l'activité dépend du pH interne [24]. Tout d'abord, la partie S1 de la protéine S se lie à l'ACE2 au niveau de la membrane cellulaire, puis la partie S2 sert de médiateur à la fusion. Cette fusion se produit après que la protéine S est activée par la protéase endosomale *cathepsine L* à travers un clivage de la frontière S1/S2 et de la position de la S2' (Figure 9).



**Figure 9:** L'entrée du SARS-CoV-2 via les endosomes [23].

En outre, la protéine *spike* de SARS-CoV-2 comprend un site de clivage compatible avec l'action de la furine une pro-protéine convertase qui permet au sous-unités S1/S2 d'être clivée dès la biosynthèse virale et avant la libération des nouveaux virus dans l'environnement extracellulaire ce qui pourrait majorer le potentiel infectant du virus (Figure 8) [22].

Enfin, l'ARN viral libéré par l'entrée médiée soit par TMPRSS2 ou par les protéases endosomales est répliqué sous forme de copies partielles ou complètes du génome et traduit

dans le réticulum endoplasmique (RE) pour former de nouveaux virions SARS-CoV-2 [22] (Figure 8).

## 2. La réplication du génome viral et synthèse des protéines virales :

La stratégie de réplication des coronavirus est différente des autres virus à ARN simple brin de polarité positive. En effet, l'ensemble des étapes de la réplication (transcription de l'ARN, synthèse des protéines virales et assemblage des virions) se déroulent dans le cytoplasme des cellules infectées [16].

La pénétration du virus dans la cellule résulte en la décapsidation et le largage de la nucléocapside dans le cytosol de la cellule hôte, ainsi le génome viral sert de matrice pour la machinerie cellulaire dans le but de la synthèse d'un ARN de polarité négative, de même taille que l'ARNg [16]. Et donc, pour la réplication de son génome et la transcription de ses gènes, le SARS-CoV-2 utilise un large complexe réplique-transcriptase (RTC) formée dans des vésicules à double membrane (DMV) [6]. Ce complexe est principalement composé d'un assemblage de sous-unités contenant une ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp) ou nsp12, nsp7 et nsp8, ces deux dernières augmentent la liaison et la processivité du modèle RdRp [17].

Après l'assemblage du RTC, la synthèse d'un ARN viral de polarité négative (-) est utilisée comme matrice pour la synthèse de nouveaux ARN génomiques de polarité positive (+) et d'ARN subgénomiques messagers. Ainsi, au cours du processus de la transcription, 7 à 9 ARNs subgénomiques sont produits, incluant ceux des protéines structurales (Figure 10) [20].

Par conséquent, le RTC permet de reproduire l'ARN viral et d'autre part, par le biais de la formation d'ARN subgénomiques, la production de protéines de structure des nouveaux virions [7]. Une fois que le génome viral est répliqué et que les ARNs subgénomiques sont synthétisés, ils sont par la suite traduits en protéines structurales telles que les protéines S, M, et E. Ces protéines sont insérées dans la membrane du RE puis déplacées vers le compartiment intermédiaire réticulum endoplasmique-Golgi où les particules virales sont assemblées. Pendant ce temps, le programme génomique préalablement répliqué peut directement joindre la protéine N à la forme de la nucléocapside et se déplacer dans l'ERGIC. Dans ce compartiment, la nucléocapside va s'assembler avec les glycoprotéines d'enveloppe ce qui permet aux nouvelles particules virales de bourgeonner et de former de petites vésicules qui sont expulsées hors de la cellule par exocytose (Figure 10) [21].

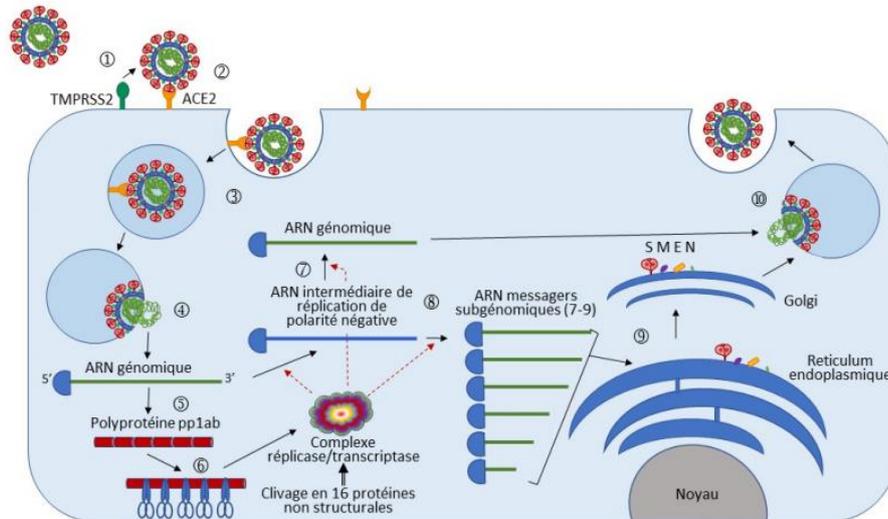


Figure 10: Cycle viral du SARS-CoV-2 [19].

## VI. 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 [21].

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 plasmatique 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 [21].

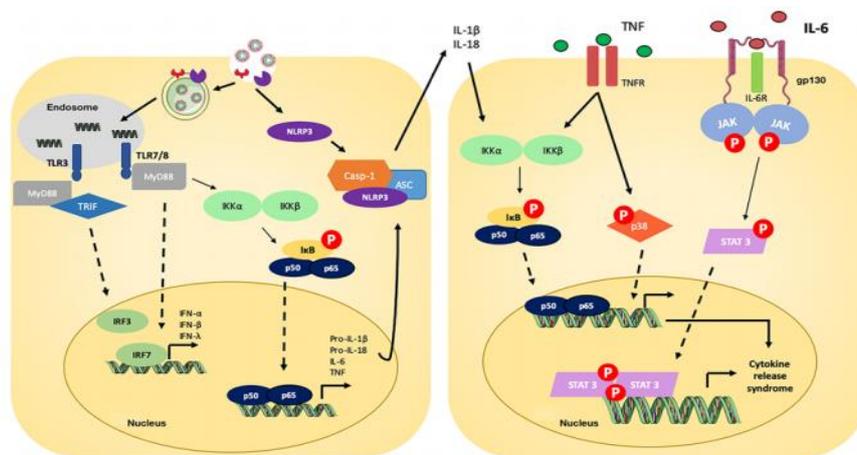
En effet, suite à une exposition contaminante, le SARS-CoV-2 infecte les cellules épithéliales et immunitaires résidentes alvéolaires à travers la combinaison de la protéine *Spike* virale et de l'ACE2, ce qui amène la partie intracellulaire de l'ACE2 à activer l'enzyme de

conversion du TNF $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor*) ou TACE (*TNF $\alpha$  converting enzyme*) responsable de la sécrétion de TNF $\alpha$ . De plus, la reconnaissance de la protéine *Spike* par les TLR-4 des monocytes conduit à la transduction du signal NF- $\kappa$ B (*Nuclear factor-kappaB*) qui provoque la sécrétion de l'interleukine-6 (IL-6) responsable d'une inflammation locale [7] [21].

Outre, l'activation du récepteur endosomal 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 (*Tir-containing adapter inducing IFN $\beta$* ) 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- $\alpha$ , IFN- $\beta$  et IFN $\gamma$ . En parallèle, l'activation de la voie de NF- $\kappa$ B stimule des événements séquentiels de phosphorylation permettant la phosphorylation de IKK $\alpha$  et IKK $\beta$  (*Inhibitor of Nuclear factor-kappaB kinase*), qui sont des kinases cruciales impliquées dans la phosphorylation de la protéine I $\kappa$ B inhibitrice qui est liée aux sous-unités NF- $\kappa$ B p50 et p65. En effet, la phosphorylation de I $\kappa$ B marque cette protéine pour l'ubiquitination et pour la dégradation protéasomique, libérant ainsi les dimères p50/p65 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 $\beta$ , pro-IL-18, TNF et IL-6 (Figure 11) [25].

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) [26]. 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 $\beta$  et d'IL-18 [27]. Ainsi, les cytokines IL-1 $\beta$ , IL-18 et TNF se lient à des récepteurs spécifiques et favorisent non seulement la translocation nucléaire de NF- $\kappa$ 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 11) [25]. 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 11) [25]. Par conséquent, cette sécrétion des cytokines pro-inflammatoires est la

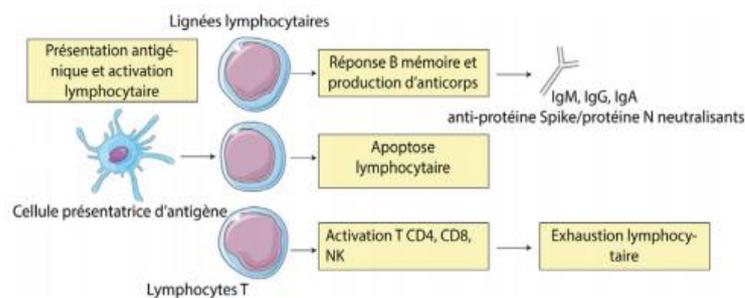
réponse initiale de défense contre l'infection virale contre SARS-CoV-2. Cependant, l'inefficacité de la réponse immunitaire initiale entraîne une amplification de la réponse inflammatoire, responsable d'une aggravation clinique chez certains patients, et s'accompagne de plusieurs signes d'hyperactivation du système immunitaire [7], 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 11) [7] [21] .



**Figure 11:** Activation des voies de signalisations et libération des cytokines suite à l'infection par SARS-CoV-2 [24].

## 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 12) [6].



**Figure 12:** Réponse immunitaire adaptative [6].

La réponse immunitaire adaptative humorale et cellulaire lors de l'infection SARS-CoV-2 est dirigée contre de très nombreux antigènes du virus (protéine S et ses composants,

nucléocapside, ORF9b, nsp5, et autres (Figure 13), la réactivité semblant plus forte contre certaines protéines par exemple contre la protéine S entière que contre le RBD [20].

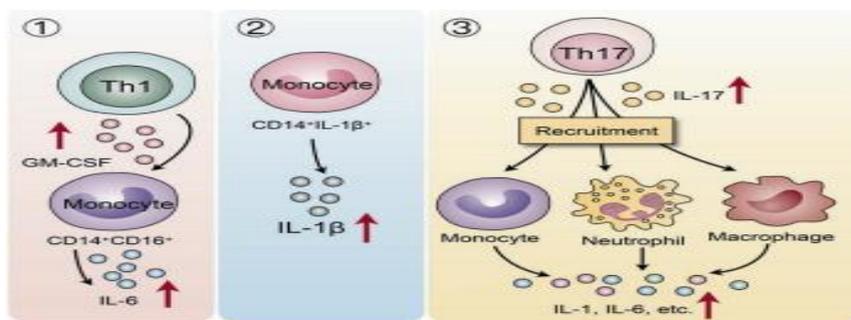
	ORF1a	ORF1b	S	ORF3	Env	MP	ORF6	ORF7a	ORF7b	ORF8a	ORF8b	NC	ORF9b	ORF10
Anticorps			■		■	■								
Anticorps Neutralisants			■											
Réponse CD4+	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
Réponse CD8+	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	

**Figure 13:** Protéines du SARS-CoV-2 ciblées par la réponse immunitaire adaptative [19].

### 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 [28].

La CPA présentera l'antigène du SARS-CoV-2 aux cellules T-helper CD4+ via le CMH (*Complexe Majeur d'Histocompatibilité*) 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 14) [21].



**Figure 14:** Réponse immunitaire des cellules T4 [28].

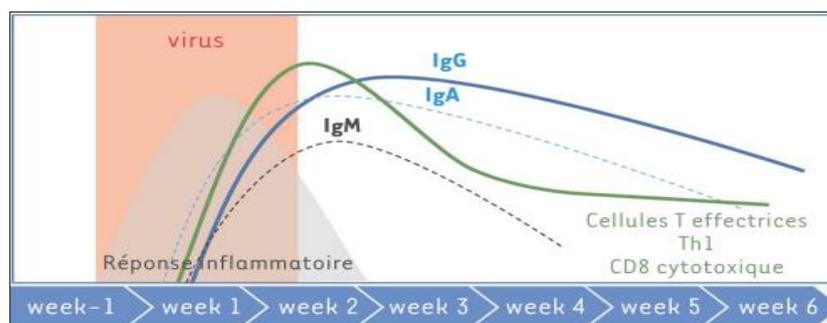
Ensuite, l'activation des cellules Th1 pourrait stimuler les cellules T CD8, ces derniers représentent environ 80 % des cellules ardentes infiltrées dans l'interstitium pulmonaire dans les cas de syndrome respiratoire aiguë chez les patients infectés par le SARS-CoV-2, elles sont cytotoxiques et vont 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 [21].

## 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 [6]. 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 [29]. 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 [30]. 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 15) [29].

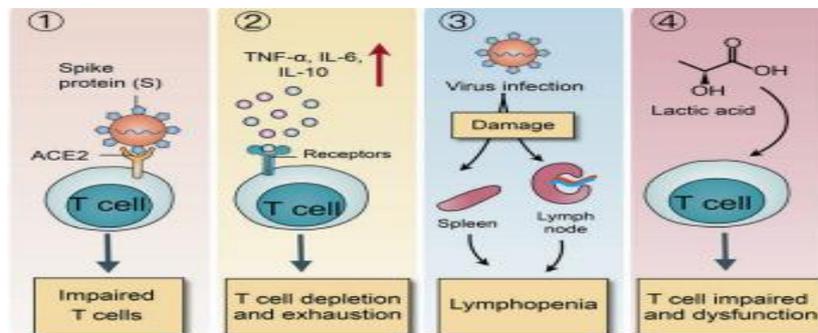


**Figure 15:** Cinétique des réponses humorales et cellulaires contre le SARS-CoV-2 [29].

### 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 dérégées 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 16) [31]:

- (1) 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.
- (2) L'augmentation concomitante des niveaux de cytokines inflammatoires favorise la déplétion et l'épuisement des lymphocytes T.
- (3) 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.
- (4) L'augmentation des niveaux d'acide lactique inhibe la prolifération et le dysfonctionnement des lymphocytes.



**Figure 16:** Les mécanismes potentiels de l'immunopathologie induite par le SARS-CoV-2 [28].

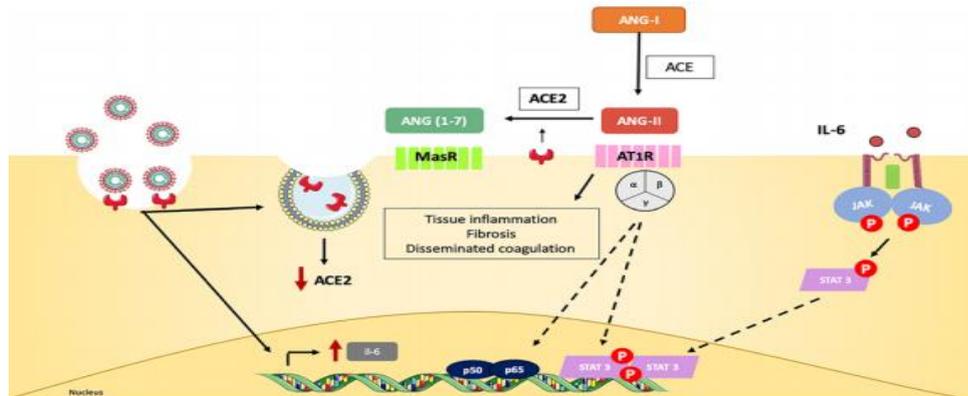
## VII. PHYSIOPATHOLOGIE DU COVID-19 :

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 [25].

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 17) [25].



**Figure 17:** Les mécanismes impliqués dans la physiopathologie du COVID-19 [24].

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 [25].

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 [25].

## VIII. EPIDEMIOLOGIE :

### 1. Réservoir et origine du SARS-CoV-2 :

L'infection aiguë indéterminée des voies respiratoires par SARS-CoV-2 est probablement liée à un marché de fruits de mer. Par la suite, plusieurs études ont suggéré que la chauve-souris pourrait être le réservoir potentiel. Cependant, jusqu'à présent, il n'y a aucune preuve formelle que le SARS-CoV-2 provient du marché de Wuhan [32].

La recherche du réservoir naturel et d'éventuels hôtes intermédiaires avec, en particulier, l'identification de l'ancêtre commun le plus récent a été réalisée par différentes équipes [20]. L'étude menée par la comparaison de 103 génomes de SARS-CoV-2 avec ceux de SARS-CoV-1 et de coronavirus animaux (4 de chauve-souris, 7 de pangolin), a indiqué que la souche de coronavirus RaGT13 de chauve-souris était la plus proche du SARS-CoV-2 avec une similarité

de séquence nucléotidique de 96,2% [20], ce qui a suggéré que le coronavirus de chauve-souris et le SARS-CoV-2 humain pourraient partager le même ancêtre, bien que les chauves-souris ne soient pas disponibles à la vente sur ce marché de poissons [32]. De plus, le pourcentage d'identité de séquences nucléotidique obtenu à partir de la comparaison des génomes du SARS-CoV-2 et du SARS-CoV-1 est compris entre 75 et 80 % [20].

## 2. Répartition mondiale :

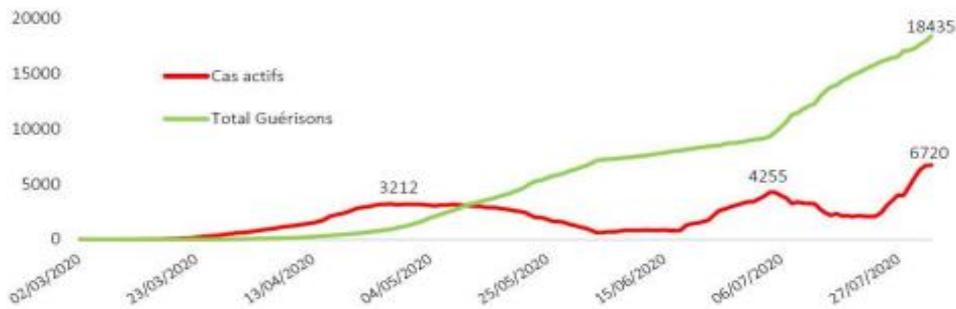
Les cas COVID-19 se sont propagés rapidement dans le monde, c'est pourquoi l'OMS a déclaré la maladie COVID-19 comme une pandémie. En fait, dans certains pays asiatiques, comme la Chine, la Corée, le Vietnam et la Thaïlande ont adopté des mesures de contrôle strict pour contenir l'épidémie, néanmoins vers la fin d'avril 2020, 3 millions de cas et 200 000 décès avaient été signalés dans le monde, et fin août 2020, plus de 25 millions d'infections et 800 000 décès étaient survenus [32].

Dans la plupart des pays, au pic de l'épidémie le nombre de cas confirmés a augmenté de façon exponentielle. Actuellement, le SARS-CoV-2 est présent dans plus de 190 pays sur cinq continents [33]. Dans la plupart des pays, la tranche d'âge comprise entre 20 et 59 ans compte le nombre de cas le plus élevé [32].

## 3. Répartition nationale :

Dès la déclaration relative à ce nouveau virus autant qu'une pandémie, le Maroc a développé son plan national de surveillance et de riposte [34].

Au niveau national, le premier cas importé a été détecté le 02/03/2020, alors que le premier cas de transmission locale a été enregistré le 13/03/2020. Jusqu'au 03/04/2020, le Maroc avait enregistré un total de 844 cas de COVID-19, dont 83,1% sont des cas autochtones [34]. Ainsi, l'augmentation progressive du nombre de cas confirmés a conduit notre pays à la mise en place des mesures de distanciation sociale, consistant en : la fermeture des frontières terrestres, aériennes et maritimes depuis le 15/03/2020 ; l'arrêt des études pour tous les niveaux scolaires et universitaires à partir du 16/03/2020 ; l'arrêt des prières au niveau des mosquées depuis le 16/03/2020 ; ainsi que le confinement progressif de la population depuis le 20 mars 2020 [34]. Par la suite, le nombre cumulé des confirmations a atteint 25.537 cas durant la période du 02/03/2020 au 02/08/2020. [34] (Figure 18).



**Figure 18:** Evolution quotidienne des cas confirmés au Maroc entre le 02 mars et le 02 aout 2020 [44].

Les formes graves (sévères à critiques) ont, parallèlement augmenté significativement avec l'augmentation des nombres des cas. Du 15/06 au 02/08, le nombre de cas pris en charge en services de réanimation et soins intensifs est passé de 11 à 88 [34].

En effet, suivant l'évolution de l'épidémie au Maroc, il y a eu 518 458 cas de contamination et 9 135 décès liés au coronavirus depuis son début jusqu'au 05/2021 [35].

#### 4. Les indicateurs épidémiologiques du SARS-CoV-2 :

##### 4.1 Le taux de létalité et le taux de mortalité:

Le taux de létalité d'une infection représente la probabilité qu'une personne infectée meure, qu'elle se rende ou non à l'hôpital, tant dis que le taux de létalité des cas cliniques, concerne quant à lui la possibilité que la personne infectée décède dans un hôpital ou une clinique. Ce taux est donc plus élevé que le taux de létalité de l'infection, car les personnes COVID-19 qui se présentent à l'hôpital sont généralement plus gravement malades [36].

De plus, lorsque les pays se trouvent à des stades différents de l'épidémie, il est difficile de comparer les taux de létalité. Ceci s'explique par les variations existant entre les pays et qui sont dues généralement à l'étendue de la population touchée, aux nombres des tests effectués sur la population, à la structure d'âge, à l'état de santé de la population, et à l'infrastructure des systèmes de santé de chaque pays [32].

Un autre paramètre clé pour déterminer la gravité d'une pandémie est le taux de mortalité liée à l'infection. En raison du taux élevé d'infections non compliquées, les cas symptomatiques ne reflètent pas le nombre total d'infections. Ainsi, le taux de létalité sera beaucoup plus élevé que le taux de mortalité.

Une modélisation a été réalisée le 30/03/2020, à partir de 44 672 cas confirmés à travers le monde dont 1 023 décès, et a estimé un taux de létalité ajusté de 1,4 %, atteignant 6,4 % dans la population âgée de plus de soixante ans [36].

#### 4.2 Taux de reproduction et facteur de dispersion:

Le taux de reproduction est l'un des indicateurs pour estimer le niveau de transmission du virus au sein d'une population, il permet donc d'apprécier le potentiel de contagiosité d'un agent infectieux [37]. De ce fait, le taux de reproduction de base ( $R_0$ ), fait référence au nombre moyen de sujets auxquels un malade risque de transmettre la maladie dans une population non immunisée contre le virus. Par conséquent, si le  $R_0$  est supérieur à 1, alors la maladie a tendance de s'étendre d'elle-même en l'absence d'action. A l'heure actuelle, l'estimation générale du  $R_0$  pour le SARS-CoV-2 est comprise entre 2 et 3. Cet indice est susceptible d'être sensiblement réduit grâce au confinement [36].

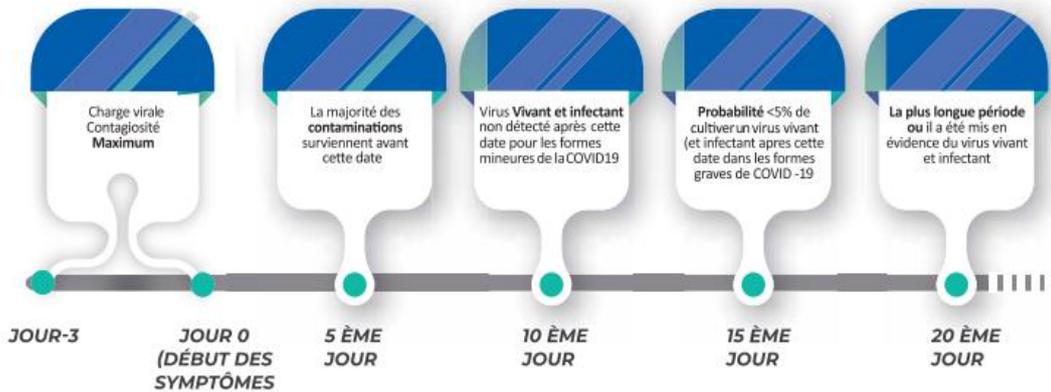
D'ailleurs, la dynamique hétérogène de la transmission du virus a été révélée grâce à l'étude de grandes épidémies. En effet, des auteurs ont rapporté que 15 à 24 % des cas de COVID-19 sont à l'origine de 80% de l'ensemble des cas secondaires. Cette hétérogénéité de la propagation du virus est illustrée par un autre indicateur, le facteur de dispersion ( $k$ ) [32].

Plus la valeur du facteur de dispersion ( $k$ ) est faible, plus la variance des taux de transmission entre les individus est élevée. Selon les estimations actuelles ( $k = 0,1$ ) soit environ 60 % des infections ne seront pas transmises, tandis que 10 % des infections sont responsables de plus de 80 % des transmissions [32].

#### 4.3 La période de contagiosité et la charge virale :

La période de contagiosité est la durée pendant laquelle la personne infectée peut transmettre la maladie à une autre personne. En effet, la période de contagiosité maximale du SARS-CoV-2 se situe approximativement autour de la journée d'apparition des symptômes, débutant quelques jours avant et décline de manière graduelle pendant les jours suivants [37].

Par ailleurs, la charge virale semble être un marqueur épidémiologique important à la fois de l'infectiosité et de contagiosité. Pour le SARS-CoV-2, la charge virale dans les voies respiratoires supérieures atteint son maximum autour de l'apparition des symptômes et le virus infectieux persiste pendant 10 jours dans le cas de COVID-19 légère à modérée, et 15 jours chez les patients gravement malades et immunodéprimés. Un intervalle de 20 jours compter de l'apparition des symptômes, est associé à la mise en évidence du virus vivant et infectant [38] (Figure 19). Et des fois, après guérison dans un délai allant jusqu'à 45 jours, il y a eu persistance d'une charge virale faiblement détectée.



**Figure 19:** La charge virale en fonction de la chronologie d'infection [47].

#### 4.4 La période d'incubation :

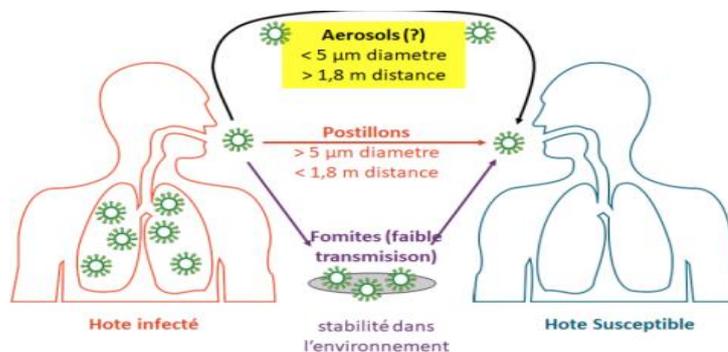
La période d'incubation, est l'intervalle entre la date d'un premier contact potentiel avec un patient suspect ou confirmé de COVID-19 et la date d'apparition des signes cliniques. La période d'incubation du SARS-CoV-2 varie de 2 à 14 jours, avec un temps médian de 5 jours. Des périodes d'incubation allant jusqu'à 17 jours ont été rapportées chez les personnes âgées et les enfants [36].

### 5. Mode de transmission :

#### 5.1 Transsmion par aérosols :

Il est admis que la principale voie de transmission du SARS-CoV-2 est interhumaine [36]. Le virus est excrété par les voies respiratoires et peut se retrouver dans des aérosols expulsés par la personne infectée. Selon leur taille, ces particules pourront se déposer dans le nez, la gorge, les bronches ou se rendre jusqu'aux alvéoles pulmonaires. Ces aérosols de proximité sont émis en quantité variable quand la personne respire, parle, tousse, éternue, etc.

Les données expérimentales et épidémiologiques existantes soutiennent une transmission par aérosols à proximité, c'est-à-dire à moins de deux mètres, mais cela n'exclut pas que dans certain cas les aérosols puissent parcourir de longues distance. La distance maximale demeure imprécise, mais il est peu probable que ce soit au-delà de quelques mètres (Figure 20) [37].



**Figure 20:** Transsmion par aérosol et par formites [46].

### 5.2 Transmission par fomites :

Un fomite est tout objet inanimé qui, lorsqu'il est contaminé ou exposé à des agents infectieux tels qu'un virus, peut transmettre une maladie à une autre personne, par exemple des boutons d'ascenseur, des robinets de toilettes, etc [39].

Les gouttelettes et les aérosols de plus gros diamètre projetés par une personne infectée peuvent se déposer sur les surfaces environnantes. La survie du SARS-CoV-2 sur les différentes surfaces varie selon les facteurs environnementaux (température, humidité relative et rayonnement) et le type de surface. Bien que les preuves à l'appui de la transmission par les fomites ne soit pas très robuste, cela reste possible à proximité des personnes qui sont contagieuses, ce risque pouvant être influencé par les pratiques de désinfection, l'hygiène, le respect des mesures sanitaires [37].

### 5.3 Transmission par les selles et autres liquides biologiques :

L'isolement d'ARN viral dans les selles et le sang a évoqué la possibilité d'une contamination oro-fécale ou sanguine mais qui n'a pas été démontrée à ce jour. Également, bien que l'ARN viral ait été identifié dans l'urine, le plasma ou le sérum, une transmission à travers ces fluides corporels n'a pas été enregistrée [37].

### 5.4 Transmission de la mère à l'enfant :

Jusqu'à présent, la transmission verticale n'a pas été confirmée, cependant plusieurs cas de transmission postnatale ont été rapportés [36].

En effet, l'ARN viral a été détecté dans des prélèvements nasopharyngés chez 7 % de nouveau-nés dont la mère était positive au SARS-CoV-2. Dans des rares cas, le virus a été détecté dans le placenta de mères atteintes par la COVID-19. Toutefois, aucun cas n'a été confirmé par la détection du SARS-CoV-2 dans le tissu ou le sang du cordon ombilical [37].

À ce jour, aucune preuve scientifique n'indique que COVID-19 se transmet par l'allaitement. En revanche, deux études de cas ont rapporté la détection par RT-PCR de fragments du virus non viables dans le lait maternel de deux femmes [37].

### 5.5 Transmission nosocomiale :

Au cours de la phase initiale de l'épidémie de Wuhan, les transmissions dans les établissements de soins, tant nosocomiales que chez le personnel de santé, ont été signalées. Dans la plupart des milieux, l'infection des patients témoins était inconnue et la transmission était liée à des procédures d'urgence, par exemple l'intubation [32].

## 6. Symptomologie et complications :

Les caractéristiques cliniques du COVID-19 sont diverses, allant de l'état asymptomatique à une atteinte respiratoire haute bénigne jusqu'au SDRA et dysfonctionnement de plusieurs organes.

Le taux d'infections asymptomatiques a été estimé avec des taux allant de 27 à 40 %. Dans l'ensemble, environ 90 % des infections sont sans complications ou présentent des symptômes légers à modérés et n'entraînant pas d'hospitalisation. Toutefois, l'âge avancé, l'hypertension, les maladies cardiaques ou pulmonaires chroniques et l'immunodépression sont des facteurs de risque qui conduisent à des états sévère à critique de la maladie (Tableau 3) [32].

**Tableau 3:** Classification des états des patients COVID-19 [49].

<b>Asymptomatiques</b>	Sans aucun symptôme clinique, mais pouvant excréter des quantités importantes de virus.
<b>Légers</b>	Symptômes d'infection aiguë des voies respiratoires supérieures.
<b>Modéré</b>	Pneumonie et pas d'hypoxie perceptible.
<b>Sévère</b>	Pneumonie avec hypoxie.
<b>Critique</b>	SDRA.

Les taux d'hospitalisation varient entre 4 et 7 % dans les différentes populations, 25% des patients hospitalisés nécessitent des soins intensifs avec un taux élevé de transplantation d'organe (75% de ventilation invasive, 25% transplantation rénale) [32].

Environ 97 % des patients présentent des symptômes dans les 10 jours suivant l'exposition au virus [37]. Selon l'OMS en relation avec la maladie COVID-19 [40]:

### ➤ **Les symptômes les plus courants comprennent :**

- Fièvre
- Toux, généralement sèche
- Fatigue ou asthénie

### ➤ **Les symptômes moins courants sont :**

- Perte du goût et de l'odorat
- Congestion nasale
- Conjonctivite (yeux rouges)
- Mal de gorge et maux de tête

- Douleurs musculaires ou articulaires
- Nausées ou vomissements
- Diarrhée

Certes, COVID-19 est une maladie principalement respiratoire, mais elle peut se présenter comme une maladie inflammatoire, occasionner des thromboses et provoquer des lésions neurologiques, digestives, cardiaques, hépatiques, oculaires, et cutanées [17]:

Les atteintes neurologiques correspondent à une atteinte encéphalitique directe du virus ou à des symptômes inflammatoires postinfectieux aspécifiques, se manifestant par une encéphalite ou par une polyradiculonévrite [17].

Les atteintes digestives peuvent être présentes de manière isolée, notamment chez le sujet âgé ou le jeune enfant, ou associées à d'autres manifestations [17].

Les atteintes dermatologiques sont des manifestations de type vascularite des petits vaisseaux, caractérisées par des engelures et parfois par des évolutions bulleuses [17].

## **IX. 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 [41]:

- 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 [42]:

- 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.

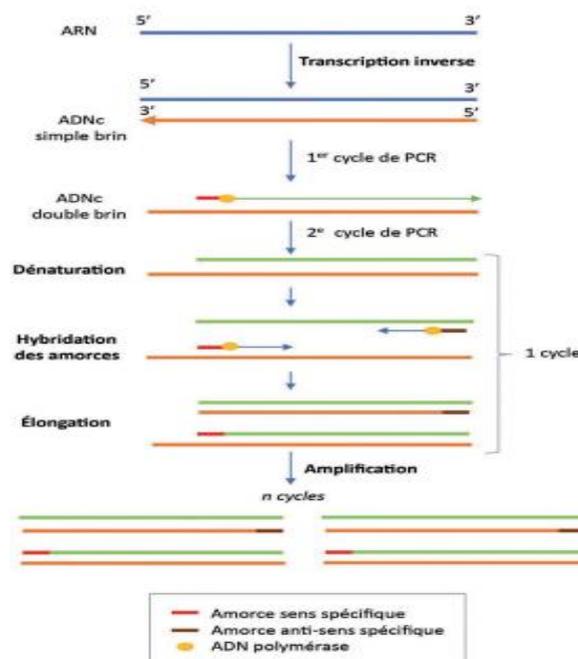
## 1. Diagnostic moléculaire :

### 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 [43]. 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  $2n$  copies ( $n$ =nombre de cycles) la séquence spécifique d'ADNc [9].

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 21) [43] :

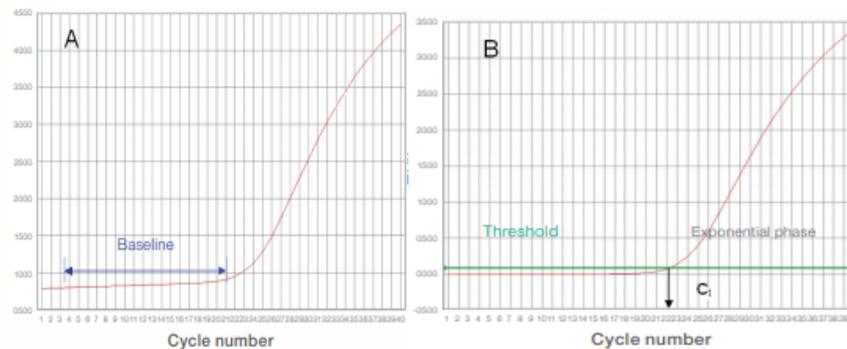
- Etape 1 : Dénaturation (à 95°C) des doubles brins d'ADNc pour obtention des simples brins.
- Etape 2 : Hybridation (environ 55°C) d'un couple d'oligonucléotides amorces qui délimitent la région d'ADNc à amplifier.
- Etape 3 : Elongation (environ 72°C) par une ADN polymérase thermorésistante présente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



**Figure 21:** Principe de la qPCR en temps réel [53].

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 [17]. 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 [43].

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 22) [44].



**Figure 22:** Représentation graphique des résultats du qRT-PCR [42].

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 [44].

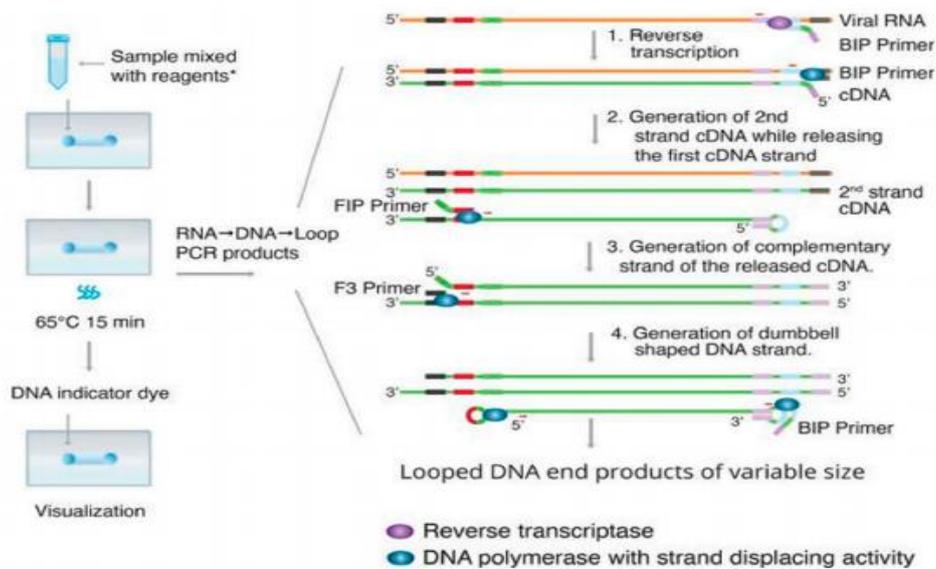
### 1.2 La détection du génome viral SARS-CoV-2 par RT-LAMP :

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) [45]. 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 [36].

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 [46]. 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 [47]:
  - 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 [47]:
  - 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 23) [48].



**Figure 23:** Principe de la technique RT-LAMP [46].

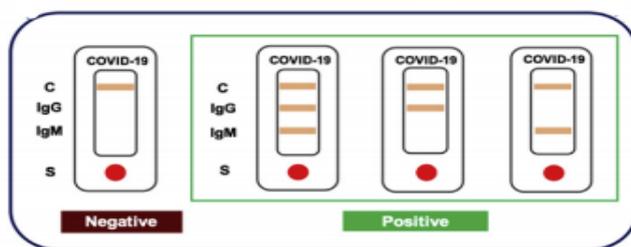
## 2. Diagnostic sérologique :

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, [49]. 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 [9].

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*) [49][50].
- Des tests qualitatifs : appelés communément dosage à flux latéral ou LFA (*Lateral Flow Assay*) pouvant être réalisés sans passer par un laboratoire sur un prélèvement sanguin

à travers une piqûre au doigt et sont basé sur l'immunochromatographie appliqué sur bandelette de nitrocellulose, et permettent d'établir un diagnostic rapide en quelques minutes (<15 minutes) (Figure 24) [49][50].



**Figure 24:** Test immunochromatographique COVID-19 sur bandelette de nitrocellulose [28].

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 [51].

D'une autre part, en combinaison avec la détection de l'ARN viral, ces tests sérologiques d'anticorps fournissent un spectre de résultats phénotypiques d'un patient vis-à-vis de la maladie COVID-19 (Tableau 4) [30].

**Tableau 4:** Résultats identifiés à partir des détections de l'ARN viral et des anticorps sérologiques (IgM et IgG) [28].

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

## PARTIE II : PARTIE EXPERIMENTALE

### I. MATERIEL ET METHODES :

#### 1. Type et lieu d'étude :

Il s'agit d'une étude observationnelle et comparative effectués sur 31 échantillons. L'ensemble du processus expérimental a été réalisé au Laboratoire *Ibn Nafiss* unité biologie moléculaire à Rabat.

#### 2. L'analyse qRT-PCR COVID-19 :

##### 2.1 Echantillonnage :

Les échantillons sont de type nasopharyngé des voies respiratoires hautes, prélevés à l'aide des écouvillons et conservés dans des flacons contenant le milieu de transport viral **M4RT** (Figure 25) qui permet de conserver son matériel génétique.

Le milieu M4RT est une solution saline équilibrée de Hank modifiée additionnée de sérum-albumine bovine, de gélatine, de sucrose et d'acide glutamique. De plus, l'incorporation de la gentamicine et de l'amphotéricine B servira pour limiter la contamination bactérienne et fongique, et l'ajout des cryoprotecteurs assura la viabilité de l'organisme pendant le cycle de congélation-décongélation [52].



**Figure 25:** Milieu de transport M4RT et écouvillon de prélèvement nasopharyngé.

##### 2.2 Extraction de l'ARN viral du SARS-CoV-2 :

**(Protocole complet : ANNEXE I)**

L'extraction automatisée de l'ARN viral SARS-CoV-2 a été réalisé via l'extracteur Genrui® NE-01A (Figure 26) équipé d'un écran tactile (9,2 pouces), l'instrument est apte à des volumes de distribution de 20-1000 $\mu$ L, et il est doté de trois positions pour les plaques, d'un système des barreaux pour l'emplacement des tiges magnétiques, et d'un module de désinfection par ultraviolets intégrée [53].



**Figure 26:** L'extracteur automatique Genrui NE-01 A®.

Le principe de la méthode est une extraction par billes magnétiques, avec un chauffage/refroidissement rapide. 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 [54].

### 2.3 Préparation du Mix réactionnel pour qRT-PCR SARS-CoV-2 et dépôt d'ARN viral :

***(Protocole complet : ANNEXE II)***

Le kit PCR GeneProof SARS-CoV-2, comprends les réactifs nécessaires à une amplification de l'ARN viral (Tableau 5) (Figure 27). Il fournit un Master Mix prêt à l'emploi, en plus d'un positif contrôle 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 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 5:** Les réactifs du kit PCR GeneProof SARS-CoV-2.

	Noms	Volume	Quantité/Kit
	Master Mix (amorces, sonde marquée, polymérase, dNTP)	375µl	4
	Positif Contrôle (PC)	200µl	2
	Contrôle Interne (CI)	250µl	4



**Figure 27:** Réactifs du Kit GeneProof SARS-CoV-2 PCR [53].

#### 2.4 Amplification et détection en temps réel :

La détection du SARS-CoV-2 a été accomplie en utilisant le kit PCR GeneProof SARS-CoV-2 qui cible des séquences spécifiques du génome du virus (gène *RdRp*, gène *E* 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 de RdRp/E est indiquée par l'augmentation de la fluorescence dans le canal FAM tandis que l'augmentation de la fluorescence dans le canal Cy5 confirme la présence du gène *N*, et l'amplification positive du contrôle interne se traduit par la fluorescence du fluorophore HEX (Tableau).

**Tableau 6:** Les cibles de la qRT-PCR SARS-CoV-2.

Cible	Fluorescence
Gène RdRp	FAM
Gène E	FAM
Gène N	Cy5
Contrôle Interne	HEX

L'amplification qRT-PCR des échantillons d'ARN viral des patients suspect COVID-19 est réalisée à l'aide du thermocycleur qTOWER<sup>3</sup> (Figure 28) 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 28:** Thermocycleur qTOWER.

En se référant à la notice du kit PCR GeneProof SARS-CoV-2, le profil d'amplification

utilisé et réglé sur le logiciel qPCRsoft est destiné uniquement et spécifiquement à la détection du SARS-CoV-2, comprend 8 étapes multi-thermiques soit donc un total de 47 cycles pour une durée d'environ 1h35min (Figure 29).

8 steps	scan	°C	m:s	goto	loops	ΔT(°C)	Δt(s)	Δ(°C/s)
1		42,0	15:00	--	---	---	---	8,0
2		95,0	10:00	--	---	---	---	8,0
3		95,0	00:05	--	---	---	---	8,0
4		55,0	00:40	--	---	---	---	6,0
5		72,0	00:20	3	6	---	---	6,0
6		95,0	00:05	--	---	---	---	8,0
7	◆	60,0	00:40	--	---	---	---	6,0
8		72,0	00:20	6	37	---	---	6,0
9								
10								

**Figure 29:** Profil d'amplification SARS-CoV-2.

(L'étape N°7 marqué par 'losange vert' correspond au recueil des données)

### 3. L'analyse RT-LAMP ID NOW COVID-19:

(ANNEXE III: Protocole complet)

Les échantillons prélevés à partir des mêmes 31 patients sont également de type nasopharyngé des voies respiratoires hautes réalisé à l'aide d'écouvillon nasopharyngé secs ne nécessitant pas un milieu de transport viral.

L'analyse des spécimens par le test moléculaire rapide Abbott ID-NOW COVID-19, est réalisé sur un petit automate de LAMP à l'aide des cartouches de réactifs prêts à l'emploi (Figure 30).

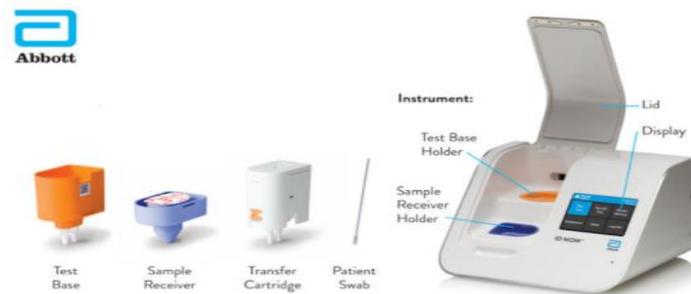


**Figure 30:** Automate et cartouches de réactifs ID NOW COVID-19.

Le kit ID NOW COVID-19 (Figure 31) conservable à température ambiante (2-30°C), contient [55]:

- **BASE** : Base de test en plastique **orange** contenant deux tubes de réactifs lyophilisés, pour l'amplification ciblée de l'ARN viral du SARS-CoV-2 et un contrôle interne.
- **RCVR** : Récepteur d'échantillon en plastique **bleu** contenant 2,5 ml de tampon d'élution.
- **CARTRDG** : Récepteur de transfert en plastique **blanc** utilisés pour transférer 2 x 100 µl d'extrait d'échantillon du récepteur d'échantillon vers la base de test.

- Les écouvillons pour patients : écouvillons stériles (mousse)
- L'écouvillon de contrôle négatif : l'utilisation d'un écouvillon de patient stérile permet d'obtenir des résultats négatifs appropriés sont obtenus.
- L'écouvillon de contrôle positif (Figure 32) : assure que l'éluion/la lyse de l'échantillon et le flux de travail ont été effectués correctement.



**Figure 31:** Les réactifs du kit ID NOW COVID-19 et leurs emplacements dans ID NOW [55].



**Figure 32:** Ecouvillon du contrôle positif.

En fait, ID NOW COVID-19 dispose de contrôles procéduraux intégrés. Le résultat du contrôle procédural est affiché à l'écran et est automatiquement stocké dans l'instrument avec chaque résultat du test [55].

Les bonnes pratiques de laboratoire recommandent l'utilisation de contrôles qualité (CQ) positifs et négatifs pour s'assurer que les réactifs du test fonctionnent et que le test est correctement effectué (*ANNEXE III : Protocole complet*).

Ces contrôles sont effectués lors [55]:

- La première utilisation de l'instrument ID NOW
- Après un déplacement de l'instrument ID NOW
- Un nouvel arrivage d'un lot
- Un nouvel utilisateur

## PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSION

### I. RESULTATS DES 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.

**Tableau 7:** Interprétation des résultats qRT-PCR SARS-CoV-2.

RdRp/E (FAM)	N (Cy5)	IC (HEX)	Résultat	Interprétation
+	+	+/-	Valide	Positif au COVID-19
+	-	+/-	Valide	Positif au COVID-19
-	-	+	Valide	Négatif au COVID-19
-	+	+/-	Valide	Répéter le test (Positif au COVID-19 si RdRp/E est +)
-	-	-	Invalide	Répéter le test

(+) *Gene détecté*

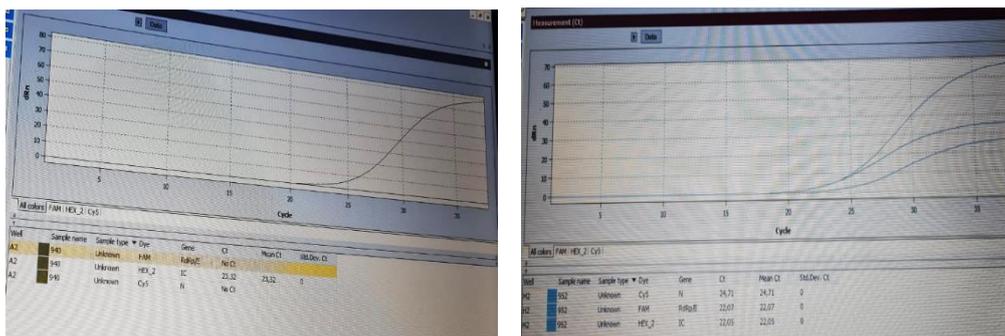
(-) *Gene non détecté*

Les résultats qRT-PCR SARS-CoV-2 sont obtenus à l'aide du logiciel qPCRsoft (Tableau 8). Au total, 4 échantillons positifs et 27 échantillons négatifs ont été testés pour un ensemble de 31 échantillons.

**Tableau 8:** Les résultats qRT-PCR SARS-CoV-2.

Nombre de tests effectués	Nombre de tests négatifs	Nombre de tests positifs	Nombre de tests invalide
31	27	4	0

Ces résultats sont présentés sous forme des courbes d'amplification des gènes détectés (Figure 33), et sous forme des valeurs Ct permettant d'estimer approximativement la charge virale des échantillons positifs : Ct < 25 : charge virale élevée ; Ct = 25 à 35 : charge virale intermédiaire ; et Ct > 35 : charge virale basse.



**Figure 33:** Les courbes d'amplification.

*A gauche* : courbe d'amplification d'un échantillon négatif.

*A droite* : courbe d'amplification d'un échantillon positif ( $Ct (RdRp/E)=22.07$ ).

## II. RESULTATS DES RT-LAMP ID NOW COVID-19:

La lecture des résultats RT-LAMP ID NOW COVID-19, est très simple. Des résultats qualitatifs (POS/NEG/INVALIDE) s'affichent clairement sur l'écran de l'instrument ne donnant pas d'idée sur la charge virale (aucune information sur la valeur de Ct).

Au total, 4 échantillons positifs et 26 échantillons négatifs ont été testés pour un ensemble de 31 échantillons (Tableau 9).

**Tableau 9:** Les résultats du RT-LAMP ID NOW COVID-19.

Nombre de tests effectués	Nombre de tests négatifs	Nombre de tests positifs	Nombre de tests invalide
31	26	4	1

## III. RESULTAT DE LA PERFORMANCE DU TEST RAPIDE RT-LAMP ID NOW :

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)[56] :

**Tableau 10:** Résultats de la catégorisation des tests RT-LAMP ID NOW.

	Patients malades	Patients non malades
Test positif	Vrai positif (VP) <b>VP= 4</b>	Faux positif (FP) <b>FP= 0</b>
Test négatif	Faux négatif (FN) <b>FN= 0</b>	Vrai négatif (VN) <b>VN= 26</b>

Ainsi, l'évaluation des performances du test moléculaire rapide ID NOW pour la

détection de l'ARN 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 [56].

- **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 [56] [57].
- **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 [56] [57].

Pour l'ensemble des échantillons sélectionnés pour l'étude des performances ID NOW COVID-19 (Tableau 11) :

**Tableau 11:** Performance du test rapide RT-LAMP COVID-19.

		Test de référence (qRT-PCR)	
		Positif	Négatif
Test de dépistage ID NOW COVID-19	Positif	VP 4	FP 0
	Négatifs	FN 0	VN 26
		<b>Sensibilité</b> <b>98.9%</b>	<b>Spécificité</b> <b>100%</b>

#### IV. DISCUSSION :

Cette étude déroulée au laboratoire de biologie moléculaire *Ibn Nafiss* unité COVID, son but était d'expérimenter la démarche diagnostic COVID-19 et d'évaluer la performance du test rapide RT LAMP ID NOW COVID-19 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 RT LAMP ID NOW COVID-19. 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 rapide ID-NOW pour la détection de l'ARN viral du SARS-CoV-2, technologie de RT-LAMP :

Une étude clinique a été menée à la clinique *Everett* aux *Etats Unis* entre le 8 et le 22 avril 2020, et a porté sur 785 patients symptomatiques, dont 21 étaient positifs à la fois par ID NOW et par RT-PCR, et 2 uniquement par RT-PCR. Les 189 patients asymptomatiques ont été testés négatifs. Le pourcentage de concordance positive entre le test ID NOW et le test RT-PCR était de 91,3%, et le pourcentage de concordance négative était de 100%. Par conséquent, la sensibilité globale du test ID NOW a été calculée à 84% [2].

Outre, aux *Etats Unis* également une étude basée sur un total de 61 échantillons nasopharyngé ont été testés par la plateforme ID NOW dans deux laboratoires indépendants et les résultats ont été comparés à la méthode de référence. Un ensemble de 46 échantillons testés positifs face à une somme de 15 échantillons testés négatifs ont été testés. La concordance globale de l'ID NOW avec la méthode de référence est de 78,7%. La spécificité était de 100%. Cependant, la sensibilité était de 71,7%, l'ID NOW produisant des résultats faussement négatifs dans 13 des 46 échantillons positifs [58].

Une autre étude menée dans le service des urgences de *l'hôpital Foch (Suresnes, France)* et de *l'hôpital franco-britannique (Levallois-Perret, France)*, évaluant le même test étudié dans notre travail en le comparant avec une RT-PCR de référence. L'étude a été effectuée sur 48 échantillons nasopharyngé. Les résultats ont montré un pourcentage de concordance positive de 94,9% et un pourcentage de concordance négative de 100% [3].

Dans un rapport publié par la Haute Autorité de Santé, d'une méta-analyse combinant cinq études évaluant les performances de plusieurs tests RT-LAMP qui ont réuni 9631 résultats en les comparant à ceux d'une technique RT-PCR concomitante sur prélèvement nasopharyngé. L'un de ces tests concerne le test ID NOW ainsi ces performances ont été évaluées en utilisant un panel de 83 échantillons, et les résultats obtenus (VP=32, FP=0, FN=7, VN=44) confirmant une sensibilité de 82,05%, et une spécificité de 100% [59].

En ce qui concerne notre étude, le test moléculaire rapide ID NOW COVID-19 a été utilisé sur 31 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 discutées.

## CONCLUSION

En conclusion, le test moléculaire rapide ID NOW COVID-19 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 deux fois plus rapidement, par rapport à la

qRT-PCR. Cependant, cette détection peut dans de nombreux cas être associée qu'aux patients ayant une charge virale élevée car une faible quantité d'ARN peut entraîner parfois des résultats faussement négatifs. En outre, l'appareil ID NOW ne peut traiter qu'un seul échantillon à la fois, et ne peut effectuer en moyenne que 3 à 4 tests par heure. Ce test ne serait donc pas adapté aux grandes séries dans le but d'un dépistage de masse.

Enfin, malgré que la spécificité de l'ID NOW COVID-19 soit élevée, la sensibilité dépend largement de la charge virale et est légèrement moins que la technique gold standard qRT-PCR. De ce fait, lorsque les techniques qRT-PCR et LAMP ont été utilisées ensemble, la sensibilité et la spécificité augmentent à 100 %.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- [1] R. B. N. Lepelletier, D. Grandbastien, B. Michael, J. Smart, “Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID-19,” *Ann Oncol*, no. January, pp. 19–21, 2020.
- [2] Y. P. Tu, J. Iqbal, and T. O’leary, “Sensitivity of id now and rt–pcr for detection of sars-cov-2 in an ambulatory population,” *Elife*, vol. 10, pp. 1–33, 2021.
- [3] E. Farfour, “The ID NOW COVID-19 , a high-speed high-performance assay,” 2021.
- [4] L. P. Colvero, L. Y. B. Villarreal, C. A. Torres, and P. E. Brandão, “Assessing the economic burden of avian infectious bronchitis on poultry farms in Brazil,” *OIE Rev. Sci. Tech.*, vol. 34, no. 3, pp. 993–999, 2015.
- [5] 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.
- [6] A. Bonnin, “Caractérisation de la protéine S du coronavirus humain 229E,” 2018.
- [7] 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.
- [8] N. Kin and A. Vabret, “Les infections à coronavirus humains,” *Rev. Francoph. des Lab.*, vol. 2016, no. 487, pp. 25–33, 2016.
- [9] C. Lefeuvre, É. Przyrowski, and V. Apaire-Marchais, “Virological aspects and diagnosis of SARS-CoV-2 coronavirus,” *Actual. Pharm.*, vol. 59, no. 599, pp. 18–23, 2020.
- [10] A. Vabret, J. Dina, E. Brison, J. Brouard, and F. Freymuth, “Coronavirus humains (HCoV),” *Pathol. Biol.*, vol. 57, no. 2, pp. 149–160, 2009.
- [11] M. Segondy, “Dossier scientifique Les coronavirus humains,” *RFL Rev. Francoph. des Lab.*, vol. 2020, no. January, pp. 32–39, 2020.
- [12] R. J. Mason, “Pathogenesis of COVID-19 from a cell biology perspective,” *Eur. Respir. J.*, vol. 55, no. 4, pp. 9–11, 2020.
- [13] “Aspects virologiques et diagnostic du coronavirus Sars-CoV-2,” no. January, 2020.
- [14] 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.
- [15] W. Feng *et al.*, “Molecular Diagnosis of COVID-19: Challenges and Research Needs,” *Anal. Chem.*, vol. 92, no. 15, pp. 10196–10209, 2020.
- [16] 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-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr). 2018.

- [17] R. D. U. Maroc, U. M. V. D. E. Rabat, F. D. E. Medecine, and E. T. D. E. Pharmacie, “Docteur en Médecine,” 2020.
- [18] I. Tratner, “SRAS : 1 . Le virus,” 2003.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] 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.
- [23] 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.
- [24] 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.
- [25] 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.
- [26] 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.
- [27] “Inflammasome (NLPR3) -.” [En ligne]. Disponible: <http://gbsleiden.com/inflammasome-nlpr3/>. [Consulté: 29-Jun-2021].
- [28] N. Vabret *et al.*, “Immunology of COVID-19: Current State of the Science,” *Immunity*, vol. 52, no. 6, pp. 910–941, 2020.
- [29] B. Combadière, “Immunité adaptative contre le virus SARS-CoV-2,” *Médecine/Sciences*, vol. 36, no. 10, pp. 908–913, 2020.
- [30] 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.
- [31] L. Yang *et al.*, “COVID-19: immunopathogenesis and Immunotherapeutics,” *Signal Transduct. Target. Ther.*, vol. 5, no. 1, pp. 1–8, 2020.
- [32] A. ACHOURI, “Place de la serologie dans l’infection au sars-cOv-2,” 2020.
- [33] “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](https://www.ledevoir.com/documents/special/20-03_covid19-carte-dynamique/index.html). [Consulté: 04-Jun-2021].
- [34] Ministère de la santé-Maroc, “Bulletin Epidémiologique COVID-19 N°9 du 06/08/2020,” p. 10, 2020.
- [35] “Maroc: Les derniers chiffres, graphiques et cartes sur l’évolution du coronavirus.” [En ligne]. Disponible: <https://graphics.reuters.com/world-coronavirus-tracker-and-maps/fr/countries-and-territories/morocco/>. [Consulté: 04-Jun-2021].
- [36] M. et al Mahmoud, “Et Diagnostic Biologique,” no. January, 2020.
- [37] T. Traitements, V. Situation, and L. Qu, “Fiche épidémiologique et clinique de la COVID-19,” no. 1, 2021.
- [38] 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.
- [39] “Epidémiologie – COVID Reference.” [En ligne]. Disponible: [https://covidreference.com/epidemiology\\_fr](https://covidreference.com/epidemiology_fr). [Consulté: 04-Jun-2021].
- [40] “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].
- [41] 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.
- [42] C. H. Mustapha, “Diagnostic virologique de COVID-19,” pp. 1–3, 2020.
- [43] “Amplification génique par PCR en temps réel -.” [En ligne]. Disponible: <https://microbiologiemedicale.fr/biologie-moleculaire-amplification-genique-pcr-temps-reel/>. [Disponible: 11-Jun-2021].
- [44] R. Pcr, “Real-time PCR : Understanding C t,” no. C, 2000.
- [45] 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.
- [46] S. Panno *et al.*, “Loop mediated isothermal amplification: Principles and applications in plant virology,” *Plants*, vol. 9, no. 4, pp. 1–28, 2020.
- [47] 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.
- [48] 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.
- [49] “Aspects Virologiques Et Diagnostiques,” no. January, 2020.
- [50] J.-L. Gala, O. Nyabi, J.-F. Durant, N. Chibani, and M. Bentahir, “Méthodes diagnostiques du COVID-19,” no. 1, pp. 228–235, 2020.
- [51] 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.
- [52] P. Red, “MicroTest™ M4RT ®.”
- [53] “Nucleic Acid.” [En ligne]. Disponible: <http://www.genrui-bio.com/products-detail.php?ProId=62>. [Consulté: 14-Aug-2021].
- [54] “Genrui – NE48 • healthcare-in-europe.com.” [En ligne]. Disponible: <https://healthcare-in-europe.com/en/labbook/genetics/2400-genrui-ne48.html>. [Consulté: 14-Aug-2021].
- [55] C. D. D. Application, “1. objectif,” pp. 1–16, 2021.
- [56] “Sensibilité et spécificité d’un test diagnostique / Société Française de Médecine d’Urgence - SFMU.” [En ligne]. Disponible: <https://www.sfmou.org/fr/vie-professionnelle/outils-professionnels/ebm/sesp>. [Consulté: 14-Aug-2021].
- [57] 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, pp. 1–28, 2020.
- [58] S. L. Mitchell and K. S. George, “Evaluation of the COVID19 ID NOW EUA assay,” *J. Clin. Virol.*, vol. 128, no. January, 2020.
- [59] D. Évaluation, V. Henry, M. Lefevre, C. Andriamanga, P. Minaya-flores, and D. Tessier, “Évaluation de l’ intérêt diagnostique des tests RT-LAMP réalisés sur système intégré et prélèvement salivaire pour détecter les sujets infectés par le SARS-CoV-2,” 2021.

## ANNEXE I : Protocole de l'extraction d'ARN via Genrui Nucleic acid extraction kit (NE-01 A)

- Les composants du Kit Genrui Nucleic Acid Extraction® (48T/kit) pour lancer une série d'extraction allant à 48 réactions :

Composants et réactifs	Quantité par Kit
Plaque de 96 puits (réactif pré additionné)	3 plaques
Solution de liaison (25µl/T) <i>ne peut pas être congelée</i>	1.40mL
Tiges magnétiques	6

- Démarrer l'extracteur Genrui (NE-01 A)
- Actionner le commutateur vers le haut pour mettre la machine en marche
- Ouvrir le Kit Genrui Nucleic acid extraction kit (NE-01 A)
- Faire sortir la plaque (96 puits) et tapoter doucement au-dessous
- Retirer la couverture en aluminium
- Vortexer et bien mélanger la solution de liaison
- Ajouter **25µl** de la solution de liaison au puits **A1, B1...H1 et A7, B7...H7**
- Vortexer l'échantillon pendant 10 secondes
- Ajouter **125µl** d'échantillon au puits **A1, B1...H1 et A7, B7...H7**
- Ajouter **5µl** du contrôle interne au puits **A1, B1...H1 et A7, B...H7**
- Placer le(s) plaque(s) dans son emplacement au niveau de la machine
- Installer les tiges magnétiques
- Fermer le couvercle
- Cliquer RUN
- Sélectionner le programme NE01A
- Cliquer START
- Attendre **24min**
- Entre temps, préparer des tubes et les marquer par les codes internes appropriés à chaque échantillon
- Une fois l'analyse est terminée
- Retirer le(s) plaque(s) (96 puits)

- Fermer le couvercle
- Cliquer UV DESINFINCTION
- Cliquer Start
- Le retrait de l'ARN viral extrait se fait à partir des puits **A6, B6...H6 et A12, B12...H12**
- Récupérer **40µl** d'ARN viral dans les tubes préalablement numérotés
- Une fois terminée, les plaques sont jetées.

## **ANNEXE II : Protocole de préparation de Master Mix réactionnel et dépôt de l'échantillon d'ARN viral**

### 1) Dans la salle de Mix :

- Vortexer et centrifuger brièvement le Master Mix pour récupérer le maximum de volume
- Ajouter **15 µl** de RT-PCR Master mixture dans les puits de la plaque PCR optique.

### 2) Dans la salle de dépôt :

- Ajouter **10 µl** de l'échantillon d'ARN dans les puits de la plaque de réaction optique et mélanger à l'aide de la pipette.
- Placer **10 µl** de contrôle positif dans son propre puits et mélanger à l'aide de pipette
- Ajouter **10 µl** de contrôle négatif dans son propre puits

**NB** : Le volume total de la réaction est de **25 µl** par échantillon.

**NB** : Le fait de ne pas mélanger assez peut entraîner des résultats peu précis.

- La plaque doit être scellée soigneusement avec un film adhésif optique transparent (la transparence optique du film affecte directement le signal de fluorescence lors de la RT-PCR).

## **ANNEXE III : Protocole du test moléculaire rapide ID NOW COVID-19**

### 1) Procédure Contrôle Qualité (CQ) :

- Pour le test CQ, sélectionner « Lancer test CQ » sur l'écran d'accueil et suivre les instructions affichées.

- Appuyer sur « Lancer test CQ »

- Appuyer sur « COVID-19 »

- Sélectionner le « Test CQ » à lancer (CQ positif et CQ négatif)

**NB** : Si CQ positif utiliser l'écouvillon du contrôle positif

**NB** : Si CQ négatif utiliser l'écouvillon patient stérile

- Confirmer le test

- Suivre les mêmes étapes du lancement d'un test patient

### 2) Procédure du lancement d'un test patient COVID-19 :

- Allumer l'instrument ID NOW en appuyant sur la touche marche/arrêt située sur le côté de l'instrument

- Entrer l'ID utilisateur puis appuyer sur « √ » après la saisie

- Appuyer sur « Lancer test »

- Appuyer sur « COVID-19 »

- Saisir l'ID patient à l'aide du clavier tactile puis appuyer sur « √ » pour confirmer

- Ouvrir le couvercle

- Insérer la base de test orange dans le support de la base de test orange (ne pas dépasser 10 minutes pour le dépôt)

- S'assurer que le test affiché à l'écran est le bon.

- Appuyer sur « OK » pour poursuivre.

- Insérer le récipient bleu pour échantillon dans le support de récipient pour échantillon bleu.

- Attendre que le récipient pour échantillon préchauffe (3min)

- Ne pas retirer le récipient pour échantillon de l'instrument une fois qu'il a commencé à se réchauffer

- Lorsque l'instrument le demande, retirer l'opercule du récipient bleu

- Mélanger l'écouvillon du patient dans le liquide pendant 10 secondes

- Sortir l'écouvillon du liquide et presser l'extrémité de l'écouvillon contre le côté du récipient pour échantillon pour retirer l'excédent de liquide.

- Une fois l'écouvillon retiré, appuyer sur « OK » pour poursuivre

- Jeter l'écouvillon dans un conteneur pour déchets biomédicaux ou le conserver dans un tube de 15 ml stérile à bouchon vissé pour analyses supplémentaires
- Enfoncer la cartouche de transfert blanche dans le récipient pour échantillon bleu.
- Un déclic doit se faire entendre

**NB :** Lorsque la cartouche de transfert est correctement fixée au récipient pour échantillon, l'indicateur orange sur la cartouche de transfert monte. Si l'indicateur orange ne monte pas, continuer d'enfoncer dans le récipient pour échantillon jusqu'à ce qu'il monte.

- Soulever, puis connecter la cartouche de transfert à la base de test.

**NB :** Lorsque la cartouche de transfert est correctement fixée à la base de test, l'indicateur orange sur la cartouche de transfert descend. Si l'indicateur orange ne descend pas, continuer d'enfoncer dans la base de test jusqu'à ce qu'il descende.

- Fermer le couvercle

**NB :** NE PAS OUVRIR LE COUVERCLE avant l'apparition du message « Test terminé » à l'écran.

- Lorsque l'amplification et la détection sont terminées, l'instrument enregistre automatiquement les données avant d'afficher l'écran des résultats
- L'écran « Résultat test » affiche un résultat positif ou négatif pour un test terminé avec succès.

**NB :** Si une erreur se produit lors du test, l'écran affiche la mention « Invalide ».

- Appuyer sur « Impr » pour imprimer les résultats du test
- Retirer les composants du test en soulevant la cartouche de transfert fixée à la base de test et en l'enclenchant dans le récipient pour échantillon avec un déclic en l'enfonçant dans le récipient d'échantillon.
- Nettoyer les parois de l'instrument