



ROYAUME DU MAROC
Université Mohammed V – Rabat
Faculté de Médecine et de Pharmacie
RABAT



Année : 2022

N° : MS123/22

Mémoire de fin d'études

Pour l'obtention du diplôme national de spécialité en
« ANALYSES BIOLOGIQUES MEDICALES »

Intitulé

Etude de performance de la méthode Abbott ID-Now par rapport à la méthode multiplex Eurobiolplex SARS-CoV-2 pour la détection de SARS-CoV-2 à partir des échantillons nasopharyngés

Présenté par :

Dr. ZOUAOUI Amal

Sous la direction de :

Professeur AABI Rachid

REMERCIEMENTS

La réalisation de ce mémoire a été possible grâce au concours de plusieurs personnes à qui je voudrais témoigner toute ma reconnaissance.

Je voudrais tout d'abord adresser toute ma gratitude à l'encadrant de ce mémoire Pr. Aabi Rachid, pour sa patience, sa rigueur, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter ma réflexion.

Je désire aussi remercier mes professeurs pour leur générosité et la grande patience dont ils ont su faire preuve malgré leurs charges académiques et professionnelles.

Je remercie enfin toute ma famille, mes amis et mes collègues qui ont toujours été là pour moi. Leur soutien inconditionnel et leurs encouragements ont été d'une grande aide.

À tous ces intervenants, je présente mes remerciements, mon respect et ma gratitude.

LISTE DES ABREVIATIONS

COVID-19 : maladie à *coronavirus* 2019

CoVs : coronavirus

MERS-CoV : syndrome respiratoire du Moyen-Orient à coronavirus

SARS-CoV-2 : syndrome respiratoire aigu sévère à *coronavirus* 2

OMS : organisation mondiale de la sante

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire

PCR : réaction de polymérisation en chaîne

RT-PCR : transcription inverse-réaction de polymérisation en chaîne

Ct : charge virale

NSP : protéine non structurale

RdRp : ARN polymérase ARN-dépendante

ECA : enzyme de conversion de l'angiotensine

AINS : anti-inflammatoire non stéroïdien

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation schématique de la taxonomie des Coronaviridae.	19
Figure 2 : Schéma montrant la phylogénie et l'émergence des coronavirus.	20
Figure 3 : Schéma de la structure d'un virion de SARS-Cov-2.....	24
Figure 4 : Schéma de l'architecture du génome du SARS-CoV-2.	29
Figure 5 : Comparaison de l'alignement multiple de séquences	30
Figure 6 : Taux d'identité entre SARS-CoV-2 et les autres coronavirus varie selon la position dans le génome	31
Figure 7 : Schéma montrant le cycle de vie du SARS-CoV-2 et les cibles médicamenteuses potentielles dans la cellule hôte.	35
Figure 8 : Représentation schématique de la structure et des fonctions de la protéine S.....	38
Figure 9 : Schéma montrant le rôle de l'ECA 2 dans l'infection par le SARS-CoV-2.	44
Figure 10 : Schéma montrant les facteurs viraux et facteurs liés à l'hôte qui influencent la pathogénèse du SARS-CoV-2.....	50
Figure 11 : Exemple d'un test rapide d'immunochromatographie.	54

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Tableau interprétatif des résultats du test EurobioPlex.	7
Tableau II : Répartition des valeurs Ct par test EurobioPlex selon le sexe.	14
Tableau III : Tableau montrant la sensibilité, la spécificité, la valeur prédictive positive et la valeur prédictive négative du test moléculaire rapide ID-Now.....	14
Tableau IV : Accord des résultats positifs et négatifs du test ID-Now avec le test EurobioPlex selon les valeurs Ct.....	15
Tableau V : Protéines non structurales des coronavirus et leur fonction.....	33
Tableau VI : Liste des médicaments dont l'efficacité clinique a été démontrée dans le cadre du traitement du COVID-19.	60

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
MATERIEL ET METHODES	4
RESULTATS	12
DISCUSSION	16
I. HISTORIQUE, TAXONOMIE ET EPIDEMIOLOGIE	17
II. GENOME ET FACTEURS VIRAUX.....	23
III. REPONSE IMMUNITAIRE DE L'HOTE ET IMMUNOPATHOLOGIE	43
IV. CARACTERISTIQUES CLINIQUES	46
V. METHODES DE DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE	51
VI. TRAITEMENT	56
VII. RT-PCR ET ID-NOW	62
CONCLUSION	63
RESUMES	63
RÉFÉRENCES	63

INTRODUCTION

Le virus SARS-COV-2 est un nouveau coronavirus appartenant à la famille des Coronaviridae et au sous genre des sarbecovirus. Il a été nommé coronavirus 2 du syndrome aigü respiratoire sévère (SARS-CoV-2) en raison de son homologie génétique avec le SARS-CoV. Sa première apparition a eu lieu à wuhan en décembre 2019 en chine, et depuis il s'est rapidement répandu dans le monde entier. Devant cette situation, l'OMS a déclaré le 11 mars 2020 ce fléau comme pandémie qui a été à l'origine de millions de contaminations et de milliers de décès à travers le monde. Au 29 avril 2020, plus de 3 millions de cas d'infection par le SARS-CoV-2 avaient été recensés de par le monde ainsi que plus de 200 000 décès.

La contamination des personnes ayant des facteurs de comorbidités a imposé la rapidité de diagnostic pour éviter d'éventuelles complications. Cette urgence a engagé des firmes de recherche dans une course contre la montre pour acquérir des techniques de diagnostic plus rapides que la réaction en chaîne par polymérase en temps réel (RT-PCR) qui représente à ce jour la méthode de référence. Ces recherches ont abouti à la mise sur le marché de test moléculaire rapide tel que le test ID-Now du laboratoire ABBOTT qui utilise la méthode d'amplification isotherme médiée par les boucles (RT-LAMP). Cette dernière est capable de fournir un résultat dans un délai maximal de 13 min. L'initiative visant à étendre et à accélérer les tests a allégé l'examen minutieux auquel sont normalement soumis les nouveaux tests avant leur mise sur le marché. A partir de mars 2020, plusieurs tests rapides SARS-CoV-2 ont reçu une autorisation d'utilisation d'urgence (Emergency Use Authorization ou EUA) de la Food and Drug Administration (FDA) des États-Unis. Cependant, les soumissions des fabricants pour l'EUA ne nécessitent qu'une évaluation de la limite de détection et de la réactivité croisée de leurs dosages, et ne traitent pas d'autres caractéristiques de performance importantes telles que l'exactitude, la précision et la reproductibilité. D'autre part, la plupart des soumissions des fabricants incluent des études d'échantillons positifs artificiels avec de l'ARN viral enrichi et n'évaluent pas, de ce fait, les performances sur des échantillons cliniques réels prélevés chez des patients [1]. Cela oblige les laboratoires cliniques à évaluer plus soigneusement les performances globales des diverses plates-formes d'essai qui se développent rapidement avant leur mise en œuvre.

Le but de cette étude est d'évaluer les performances analytiques du test moléculaire rapide ID-Now pour la détection des antigènes du SARS-CoV-2 en comparaison à la méthode de référence RT-PCR au sein du laboratoire de virologie de l'Hôpital Militaire Mohammed V de Rabat.

MATERIEL ET METHODES

Il s'agit d'une étude prospective réalisée au service de Virologie de l'Hôpital Militaire Mohammed V de Rabat du 1er novembre au 20 novembre 2020. Un total de 224 écouvillons nasopharyngés a été inclus dans notre étude. Ils ont été prélevés chez des patients en consultation externe, aux urgences ou hospitalisés dans les différents services de l'hôpital.

Les prélèvements effectués étaient reçus au laboratoire dans un milieu de transport universel. Chaque échantillon a été traité de façon concomitante par deux méthodes différentes : une méthode référence (RT-PCR) et une méthode cible (Test moléculaire rapide). Pour des performances de test optimales, uniquement les échantillons fraîchement prélevés ont été testés.

Tous les échantillons étaient à température ambiante. Avant la réalisation d'un écouvillonnage nasopharyngé, le manipulateur mettait une paire de gants propres. Les écouvillons utilisés étaient à tige flexible en mousse et stériles. L'écouvillon était soigneusement inséré dans la narine présentant le plus de drainage visible ou la narine la plus congestionnée si le drainage n'était pas visible. La tête de l'écouvillon n'était inclinée ni vers le haut ni vers le bas, le passage nasal étant parallèle au sol et non parallèle à l'arête du nez. L'écouvillon était placé dans la narine parallèlement au palais puis en utilisant une rotation douce, il avançait dans le nasopharynx jusqu'à ce qu'une résistance soit rencontrée au niveau du cornet. Il était ensuite laissé en place quelques secondes, puis tourné lentement au fur et à mesure qu'il était retiré. Pour assurer une collecte appropriée, l'écouvillon était placé à une distance à mi-chemin du nez et du bout de l'oreille. Ce qui équivaut environ à la moitié de la longueur de l'écouvillon.

Les prélèvements nasopharyngés étaient testés dès que la collecte était réalisée (si un test immédiat n'est pas possible, et pour maintenir les meilleures performances, il est fortement recommandé que l'écouvillon nasopharyngé soit placé dans un tube propre et inutilisé, étiqueté avec les informations sur le patient et fermé hermétiquement à température ambiante jusqu'à une heure avant le test. L'écouvillon doit être bien inséré dans le tube et le capuchon bien fermé).

➤ **Test EurobioPlex (RT-PCR):**

La première étape consiste en la purification et l'extraction du génome viral à partir de 300 microlitres du milieu de transport en utilisant le kit Bioflux du système automatisé d'extraction Bioer. S'ensuit l'amplification et la détection des cibles au niveau des gènes grâce à l'utilisation du Kit EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex (Eurobio scientifique; France). Celui-ci est capable de détecter 3 cibles au niveau de 2 gènes : le gène N et deux fragments du gène RdRp. Ce kit permet en plus de détecter le virus SARS-COV-2 dans plusieurs types d'échantillons (aspiration nasopharyngée, liquide broncho-alvéolaire, crachat et écouvillon nasal). Il inclut 3 contrôles : positif, négatif et interne. La spécificité et la sensibilité de ce test est supérieure à 99%. Le kit de RT-PCR en temps réel EurobioPlex SARS-CoV-2 est prêt à l'emploi et contient les réactifs et les enzymes nécessaires pour la détection de ce virus. Sur la plaque utilisée pour l'amplification, 20 microlitres du mélange de Mastermix sont déposés dans chaque puits. Cinq microlitres d'extraits sont ensuite ajoutés dans chaque puits. L'amplification est effectuée sur le thermocycleur Quant Studio 5 afin de détecter le génome viral dans les échantillons analysés. La charge virale est interprétée selon la gamme complète des valeurs Ct observées sur le test, allant de 14 à 38 cycles. Les résultats obtenus sont interprétés selon le tableau I.

Tableau I : Tableau interprétatif des résultats du test EurobioPlex.

Cible 1 RdRp	Cible 2 RdRp	Cible 3 N	CI-ARN	Validité du test	Présence de SARS-CoV-2 ou interprétation impossible (NI)
➤ +	➤ +/-	➤ +/ -	➤ +/ -	➤ Oui	➤ Oui
➤ +/-	➤ +	➤ +/ -	➤ +/ -	➤ Oui	➤ Oui
➤ -	➤ -	➤ -	➤ +	➤ Oui	➤ Non
➤ -	➤ -	➤ +	➤ +	➤ Oui	➤ Indéterminé
➤ -	➤ -	➤ +/ -	➤ -	➤ Partielle	➤ NI

Les étapes de la réaction de polymérisation en chaîne en temps réel sont les suivantes:

- La transcriptase inverse utilise la matrice d'ARN pour produire un brin d'ADN (simple brin) complémentaire appelé ADNc dans un processus connu sous le nom de transcription inverse.
- L'ADN polymérase est utilisée pour convertir l'ADNc simple brin en ADN double brin. Ces molécules d'ADN vont être ensuite utilisées comme matrices pour une réaction PCR afin d'amplifier un fragment d'ADN et détecter indirectement l'ARN présent dans l'échantillon original.
- La RT-PCR peut être réalisée en une ou deux étapes. Les tests one-step combinent la transcription inverse et la PCR dans un seul tube et un seul tampon, en utilisant une transcriptase inverse avec une ADN polymérase. Dans les tests two-step, les étapes de transcription inverse et de PCR sont réalisées dans des tubes séparés, avec des tampons optimisés, des conditions de réaction et des stratégies d'amorçage différents.

- Trois approches différentes peuvent être utilisées pour amorcer les réactions de l'ADNc dans des tests two-step : les amorces oligo (des résidus de thymine qui s'hybrident à la queue poly A de l'ARN), les amorces aléatoires (de six à neuf bases de long, elles s'hybrident en de multiples points le long du brin d'ARN) et les amorces spécifiques d'une séquence (des amorces sur mesure qui ciblent une séquence spécifique d'ARN)
- Pour la RT-PCR, il est idéal de choisir une transcriptase inverse ayant une grande stabilité thermique, car cela permet d'effectuer la synthèse de l'ADNc à des températures plus élevées, assurant une transcription inverse réussie des ARN avec des niveaux élevés de structure secondaire, tout en maintenant leur pleine activité tout au long de la réaction produisant des rendements d'ADNc plus élevés.

➤ **Test ID-Now COVID-19 (Test moléculaire rapide):**

Le test ID-Now COVID-19 est un test de diagnostic moléculaire in vitro rapide utilisant la technologie d'amplification isotherme médiée par les boucles (LAMP ou Loop-Mediated Isothermal Amplification) destinée à la détection qualitative d'acide nucléique du SARS-CoV-2 (résultat positif ou négatif) dans des prélèvements nasaux, nasopharyngés ou oropharyngés et ce dans un délai maximal de 13 minutes. Il permet de détecter uniquement le gène RdRp du génome viral à l'aide de sondes fluorescentes. Des résultats positifs indiquent la présence d'acide nucléique du SARS-CoV-2. Une corrélation clinique avec les antécédents du patient et d'autres informations diagnostiques est nécessaire pour déterminer le statut infectieux du patient. Des résultats positifs n'excluent pas une infection bactérienne ou une co-infection avec un autre virus. Les résultats négatifs n'excluent pas l'infection par le SARS-CoV-2 et ne doivent pas être utilisés comme seule base pour les décisions de gestion thérapeutique. Les résultats négatifs doivent être considérés dans le contexte de la récente exposition, antécédents et présence de signes et symptômes cliniques compatibles avec la COVID-19.

Les tests sont effectués dans notre laboratoire sur un volume de 300 microlitres du milieu de transport des écouvillons nasopharyngés. Après un temps de préchauffage initial de 3 minutes de l'appareil, 200 microlitres du milieu de transport VIRCELL sont ajoutés au tampon d'éluion. Le tout est mélangé pendant 10 secondes. À l'aide du dispositif de transfert, 200 microlitres d'échantillon sont transférés dans la cartouche de test. Le couvercle est ensuite fermé et l'instrument initialise automatiquement le test qui se déroule pendant une durée maximale de 10 min. Le test ID-Now ne donne pas les valeurs de CT mais interprète les données d'amplification. Ainsi, les résultats finaux sont rapportés comme positifs ou négatifs.

Les étapes de l'amplification isotherme médiée par les boucles sont les suivantes:

- Le kit d'extraction d'ARN est utilisé pour extraire l'ARN des échantillons et préparer la solution d'échantillon. La solution d'échantillon et la solution de réaction sont mélangées et incubées à une température constante (60-65°C). Le BIP (Backward Inner Primer) se fixe à l'ARN matrice et grâce à l'activité de la transcriptase inverse, l'ADNc (ADN complémentaire) est synthétisé.
- L'amorce B3 se fixe à la région située à l'extérieur du BIP. L'activité de la transcriptase inverse permet de synthétiser un nouvel ADNc, tout en libérant le brin d'ADNc précédemment formé par le BIP.
- L'ADNc simple brin synthétisé à partir du PIF (Powdered Infant Formula) est libéré. Le PIF s'apparie ensuite à cet ADNc simple brin.
- À partir de l'étape de transcription inverse, grâce à l'activité de l'ADN polymérase avec une activité de déplacement de brin, l'extrémité 3' de la région F2 du FIP devient le point de départ de la synthèse du brin d'ADN complémentaire.
- L'amorce F3 s'annèle à la région externe 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 le FIP.
- Le brin d'ADN synthétisé par l'amorce F3 forme avec le brin d'ADN matrice un ADN double brin.

- Comme le brin d'ADN lié au FIP contient des séquences complémentaires aux deux extrémités, il s'auto-annexe et forme une structure en haltère. Cette structure devient le point de départ de l'amplification cyclique LAMP.
- La structure de l'ADN en forme d'haltère est rapidement convertie en ADN à tige en boucle par la synthèse d'ADN auto-amorcée, qui déplie la boucle à l'extrémité 5' pour prolonger la synthèse d'ADN. Le BIP se fixe à la région simple brin de l'ADN en forme de tige en boucle pour déclencher la synthèse de l'ADN tout en libérant le brin précédemment synthétisé.
- Ce brin unique libéré forme une structure à tige en boucle à l'extrémité 3' en raison des régions complémentaires F1c et F1. Ensuite, en partant de l'extrémité 3' de la région F1, la synthèse d'ADN commence en utilisant l'auto-structure comme matrice et libère ainsi le brin complémentaire lié au BIP.
- Le brin simple lié au BIP libéré forme alors une structure en forme d'haltère car les deux extrémités ont des régions complémentaires F1-F1c et B1c-B1. Cette structure est la structure de retournement.
- La structure de retournement procède à une synthèse d'ADN auto-amorcée à partir de l'extrémité 3' de la région F1. En outre, le FIP s'annèle à la région F2c et commence à synthétiser le brin d'ADN. Ce brin d'ADN lié au FIP est libéré par le déplacement du brin de la synthèse d'ADN auto-amorcée. En conséquence, de manière similaire aux étapes précédentes, la structure se forme à nouveau.
- Le FIP (ou le BIP) s'annèle à la région F2c (ou à la région B2c) simple brin, et la synthèse d'ADN continue en libérant l'ADN double brin. À la suite de ce processus, des structures de différentes tailles consistant en des répétitions inversées alternées de la séquence cible sur le même brin sont finalement formées.

Analyse statistique

- La sensibilité, ou la probabilité que le test soit positif si la maladie est présente, se mesure chez les malades seulement. Elle est calculée grâce au rapport :
- Sensibilité (%) = Vrais Positifs / (Vrais Positifs + Faux Négatifs).
 - La spécificité se mesure chez les non-malades seulement. C'est la probabilité d'obtenir un test négatif chez les non-malades, Elle est calculée grâce au rapport:
- Spécificité (%) = Vrais Négatifs / (Vrais Négatifs + Faux Positifs).
 - La valeur prédictive positive est la probabilité que la maladie soit présente lorsque le test est positif. Elle est calculée grâce au rapport:
- Valeur Prédictive Positive = Vrais Positifs / (Vrais Positifs + Faux Positifs).
 - La valeur prédictive négative est la probabilité que la maladie ne soit pas présente lorsque le test est négatif. Elle est calculée grâce au rapport :
- Valeur Prédictive Négative = Vrais Négatifs / (Vrais Négatifs + Faux Négatifs).

RESULTATS

Notre étude a porté sur 224 échantillons dont 154 se sont avérés positifs et 70 négatifs à la RT-PCR (méthode de référence). L'âge moyen était de 49 ans. Le ratio Homme/Femme était de 144/80: il était de 94/60 chez les patients positifs et 50/20 chez les patients négatifs (p=0,13). (Voir Tableau II)

La totalité des prélèvements négatifs par la RT-PCR étaient aussi négatifs par ID-NOW. Cependant, parmi les 154 prélèvements qui étaient positifs à la RT-PCR, 32 prélèvements se sont révélés négatifs par ID-Now. La sensibilité globale du test ID-Now était de 79,22% et sa spécificité globale de 100%. Sa valeur prédictive positive était de 79,22% et sa valeur prédictive négative de 68,63%. (Voir Tableau III)

Parmi les 154 prélèvements qui étaient positifs à la RT-PCR, 47 avaient un Ct faible (>30) dont seulement 15 étaient également positifs par ID-Now, 67 avaient un Ct moyen (20-30) et étaient tous également positifs par ID-Now, et 40 avaient un Ct élevé (>20) et étaient tous également positifs par ID-Now. La sensibilité du test ID-Now était de 31,91% pour les échantillons dont le Ct est faible, 100% pour les échantillons dont le Ct est moyen et 100% pour les échantillons dont les Ct est élevé. (Voir Tableau IV)

Tableau II : Répartition des valeurs Ct par test EurobioPlex selon le sexe.

	Homme (%)	Femme (%)
Total positif	94 (61%)	60 (39%)
Ct faible (>30)	35 (74,5%)	12 (25,5%)
Ct moyen (20-30)	38 (57%)	29 (43%)
Ct élevé (<20)	21 (52,5%)	19 (47,5%)
Négatif	50 (71,4%)	20 (28,6%)

Tableau III : Tableau montrant la sensibilité, la spécificité, la valeur prédictive positive et la valeur prédictive négative du test moléculaire rapide ID-Now.

		Test de référence (RT-PCR)		
		Positif (n=154)	Négatif (n=70)	
cible Test (ID- Now)	Positif (n=122)	122	0	VPP 79,22%
	Négatif (n=102)	32	70	VPN 68,63%
		Sensibilité 79,22%	Spécificité 100%	

Tableau IV : Accord des résultats positifs et négatifs du test ID-Now avec le test EurobioPlex selon les valeurs Ct.

	EurobioPlex	ID-Now
Total positif	154	122
Ct faible (>30)	47	15
Ct moyen (20-30)	67	67
Ct élevé (<20)	40	40
Négatif	70	70

DISCUSSION

I. Historique, taxonomie et épidémiologie

➤ Historique

Un cluster de cas de pneumonie causé par un coronavirus nouvellement identifié est survenu à Wuhan (Chine) en décembre 2019. Dans un premier temps, le 12 janvier 2020, ce coronavirus a été nommé par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) le 2019-nCoV (2019-nouveau coronavirus). Le 11 février 2020, l'OMS a officiellement nommé la maladie COVID-19 (la maladie à coronavirus 2019), alors que le groupe d'étude sur le coronavirus (Coronavirus Study Group) du Comité International a proposé de nommer le nouveau coronavirus : SARS-CoV-2.

Le 7 janvier 2020, des scientifiques chinois ont isolé chez un patient cette nouvelle souche de coronavirus et ont ainsi pu réaliser le séquençage du génome du SARS-CoV-2 [2]. Le 1 mars 2020, un total de 79 968 cas de COVID-19 ont été confirmés en Chine dont 2873 décès [3]. La maladie a été déclarée par l'OMS comme pandémie le 11 mars 2020 [4, 5]. Le 4 mai 2020 près de 3 millions de personnes ont été atteintes, parmi lesquelles plus de 200 000 de décès [6]. Le 16 octobre 2021, l'OMS rapporte environ 240 millions de cas de COVID-19 au niveau mondial dont 4,8 millions de décès.

Des études ont estimé le nombre de reproduction de base (R_0) du SARS-CoV-2 à environ 2,2 [7], voire plus dans certains cas (1,4 - 6,5) [8]. Des clusters familiaux de pneumonie ont d'autant plus été des preuves de la pandémie de COVID-19 et sa constante augmentation par transmission interhumaine [9].

➤ **Taxonomie (Voir figures 1 et 2)**

Le SARS-CoV-2 fait partie de la famille des Coronaviridae, la sous-famille des Orthocoronavirinae, le genre Betacoronavirus, le sous-genre Sarbecovirus [10]. Les coronavirus (CoVs) sont divisés en quatre genres: Alphacoronavirus, Betacoronavirus, Gammacoronavirus et Deltacoronavirus. Les Alphacoronavirus et Betacoronavirus sont capables d'infecter les mammifères, tandis que les Gammacoronavirus et Deltacoronavirus ont tendance à infecter les oiseaux. Auparavant, six types de coronavirus ont été identifiés comme des virus pouvant affecter l'Homme, parmi lesquels les Alphacoronavirus HCoV-229E et HCoV-NL63 ainsi que les Betacoronavirus HCoV-HKU1 et HCoV-OC43. Ceux-ci sont des virus à faible pathogénicité pouvant provoquer des symptômes respiratoires légers similaires à un rhume. Les deux autres virus connus sont les Betacoronavirus SARS-CoV et MERS-CoV et peuvent entraîner des infections des voies respiratoires potentiellement mortelles [11].

Il a été découvert que la séquence du génome du SARS-CoV-2 est à 96,2% identique au CoV RaTG13 (spécifique aux chauve-souris) alors qu'elle est à 79,5% identique au SARS-CoV. Sur la base des résultats du séquençage du génome du virus et de l'analyse évolutive, il a été suspecté que la chauve-souris pouvait être l'hôte naturel du virus, et que le SARS-CoV-2 pouvait être transmis par les chauves-souris via des hôtes intermédiaires inconnus pour finalement infecter les humains. Le SARS-CoV-2 pourrait alors utiliser le récepteur de l'Enzyme de Conversion de l'Angiotensine 2 (ECA 2), le même récepteur que le SARS-CoV, pour infecter les humains [12].

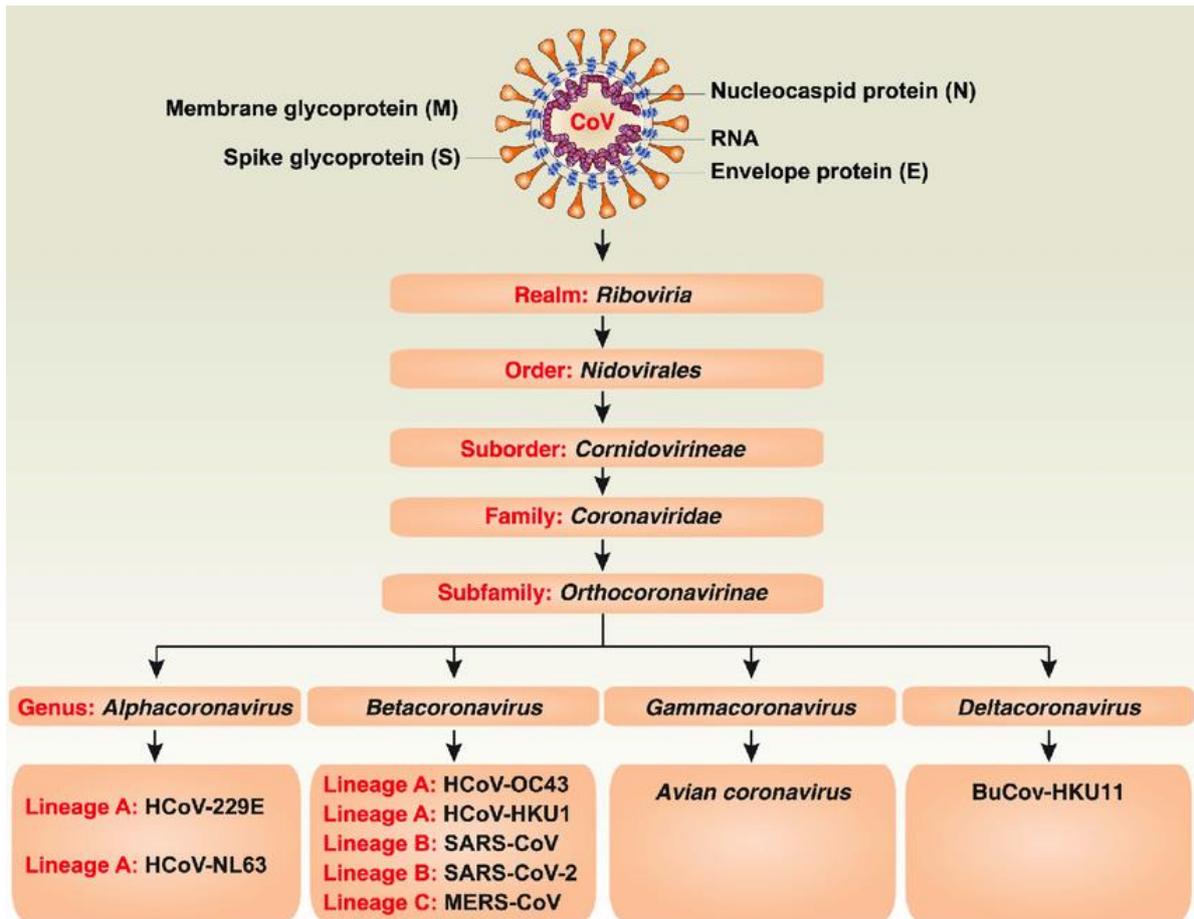


Figure 1 : Représentation schématique de la taxonomie des Coronaviridae. [13]

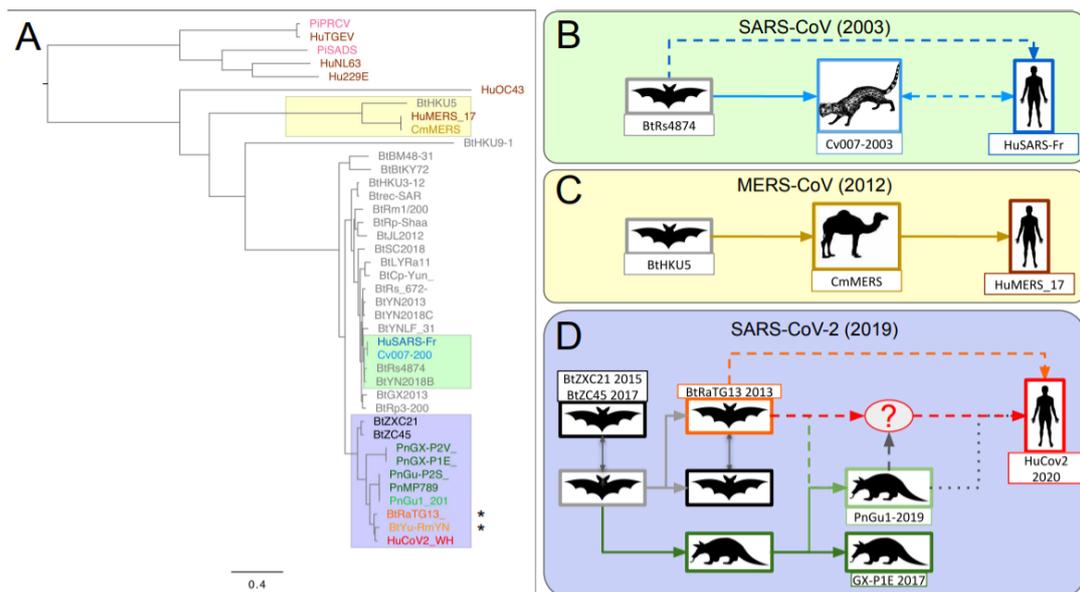


Figure 2 : Schéma montrant la phylogénie et l'émergence des coronavirus.

A. Arbre de génomes complets de coronavirus, en se fondant sur un alignement multiple de séquences suivi d'une inférence en maximum de vraisemblance. **B.** Transmission du réservoir animal (chauve-souris) jusqu'à l'homme, fondées sur la phylogénie moléculaire des génomes viraux (l'hôte intermédiaire du SARS-CoV de 2003 est la civette). **C.** Transmission du réservoir animal (chauve-souris) jusqu'à l'homme, fondées sur la phylogénie moléculaire des génomes viraux (l'hôte intermédiaire du MERS-CoV de 2012 est le dromadaire). **D.** Hypothèses de transmission du réservoir animal (chauve-souris) jusqu'à l'homme, fondées sur la phylogénie moléculaire des génomes viraux (plusieurs scénarios sont proposés concernant l'hôte intermédiaire du SARS-CoV-2). [14]

➤ **Épidémiologie : réservoir et transmission**

L'épidémie d'infections respiratoires aiguës d'origine inconnue a éclaté pour la première fois le 12 décembre 2019 à Wuhan, en Chine. Elle aurait pu être liée à un marché de fruits de mer. Plusieurs études suggèrent que la chauve-souris pourrait être le réservoir potentiel de SARS-CoV-2 [15, 16]. Cependant, il n'existe aucune preuve établissant que l'origine du SARS-CoV-2 provenait du marché de fruits de mer. Les chauves-souris sont le réservoir naturel d'une vaste variété de CoVs, y compris les virus de type SARS-CoV et MERS-CoV [17–19]. Comme indiqué plus tôt, lors du séquençage du génome du virus, le COVID-19 était identique au CoV RaTG13 (chauve-souris) à 96,2% [20]. Ceci suggère que le SARS-CoV-2 humain et le CoV RaTG13 pourrait partager le même ancêtre, bien que les chauves-souris ne soient pas disponibles à la vente dans le marché fruit de mer en question [21]. Cependant, l'alignement des séquences protéiques et l'analyse phylogénétique a montré que des résidus similaires de récepteurs ont été observés chez de nombreuses autres espèces animales (tortues et pangolins), ce qui peut orienter vers de possibles hôtes intermédiaires [22].

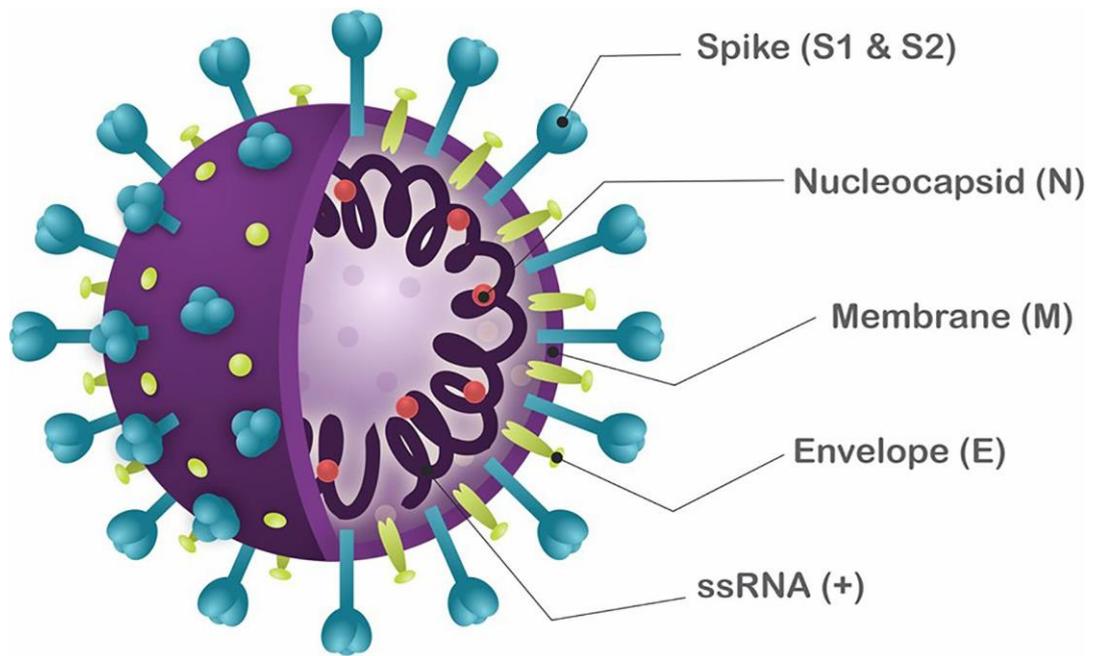
La transmission interhumaine du SARS-CoV-2 se produit généralement entre les membres d'une même famille ainsi que les proches et amis ayant été en contact intime avec des patients malades ou des porteurs en phase d'incubation. Il a été rapporté en Chine que 31,3% des patients s'étaient récemment rendus à Wuhan et que 72,3% des patients qui ne résidaient pas à Wuhan étaient rentrés en contact à un moment donné avec les habitants de cette région [23]. Par ailleurs, la Commission Nationale de Santé de Chine a déclaré le 14 février 2020 que le taux de transmission entre les membres du personnel soignant s'élevait à 3,8%. En revanche, la transmission du SARS-CoV et du MERS-CoV se produisaient principalement par voie nosocomiale. La transmission entre les membres du personnel soignant (33 à 42% des cas) et la transmission entre patients (62 à 79%) était la voie d'infection la plus courante dans les cas de MERS-CoV [24, 25]. Le contact direct avec des animaux hôtes intermédiaires ou la consommation d'animaux sauvages est par contre soupçonné d'être la principale voie de transmission du SARS-CoV-2.

Comme la majorité des virus respiratoires, le SARS-CoV-2 est transmis essentiellement par l'émission de gouttelettes respiratoires chargées de particules virales. La voie de transmission peut être directe suite à l'inhalation de ces particules virales par un autre individu ou indirecte par contact avec une surface infectée par les muqueuses nasales, conjonctivales ou buccales. Le SARS-CoV-2 peut survivre sur des surfaces inertes jusqu'à plusieurs jours [26]. Sa survie après aérosolisation expérimentale passe à moins de 3 heures . Par contre, il n'existe à ce jour aucune preuve de transmission du SARS-CoV-2 par aérosolisation.

A part les prélèvements de nature respiratoire, le SARS-CoV-2 a été identifié sur des matières fécales et du sang de patients infectés [27–30]. A l'heure actuelle, une transmission oro-fécale n'a pas pu être prouvée mais il a été mis en évidence que le virus pouvait infecter les entérocytes humains [31]. Son isolement sur des échantillons urinaires est peu décrit dans la littérature [28]. Des cas suspects de transmission intra-utérine ont par contre été rapportés [32].

II. Génome et facteurs viraux

Une étude génétique a été effectuée chez un patient atteint de pneumonie COVID-19 travaillant au marché de fruits de mer de Wuhan. Le génome complet du coronavirus Wuhan-Hu-1 (WHCV), une souche de SARS-CoV-2, est de 29,9 kb [21]. Le SARS-CoV et le MERS-CoV ont pour leur part des génomes à ARN de sens positif respectivement de 27,9 kb et 30,1 kb [33]. Il a été démontré que le génome des CoVs contenait un nombre variable (13-15) de cadres de lecture ouverte (Open Reading Frames ou ORF) [34, 35]. Les deux tiers des ARN viraux, principalement localisés dans le premier ORF (ORF1a/b) traduisent deux polyprotéines (pp1a et pp1ab) et codent pour 16 protéines non structurales (Non-Structural Protein ou NSP). Le reste du génome viral code principalement pour quatre protéines structurales essentielles: la glycoprotéine de pointe (S), la protéine de la petite enveloppe (E), la protéine de la matrice (M) et la protéine de la nucléocapside (N); ainsi que pour plusieurs protéines accessoires qui interfèrent avec le réponse immunitaire de l'hôte [36]. (Voir figure 3)



SARS-CoV-2

Figure 3 : Schéma de la structure d'un virion de SARS-Cov-2. [37]

La glycoprotéine S ou Spike ou protéine de pointe (S) forme des structures trimères impliquées dans la liaison du virus au récepteur de la membrane, ce qui facilite sa fusion avec celle-ci et son entrée dans les cellules de l'hôte [38]. Les protéines de l'enveloppe (E) jouent pour leur part un rôle dans l'infectivité et la pathogénèse virale. Elles ne sont présentes qu'en petites quantités et forment probablement des canaux ioniques [38]. Les protéines de la matrice (M) sont responsables de la courbure membranaire de l'enveloppe du virus grâce à leur interaction avec les protéines de l'enveloppe (E). Ce sont les protéines structurelles les plus présentes chez le virus [38]. La protéine de la nucléocapside (N) assure le maintien de l'ARN viral sous forme de perles de chaîne. Elle se lie de ce fait au génome viral [38].

➤ **Base moléculaire de la pathogénèse**

Les particules virales pénètrent dans la cellule hôte en se liant à l'ECA 2. Ensuite, le génome viral (ARN ss) se fixe aux ribosomes de l'hôte, ce qui entraîne la traduction de deux polyprotéines terminales de grande taille qui sont ensuite lysées par des enzymes protéolytiques [39, 40]. La protéolyse, médiée par la 3CLpro et la PLpro, découpe les grandes polyprotéines en composants plus petits essentiels aux nouveaux virions, ce qui favorise la propagation de l'infection [41, 42]. La protéase principale est une enzyme clé du SARS-CoV-2, qui joue un rôle central dans la médiation de la réplication et de la transcription virales, ce qui en fait une cible médicamenteuse intéressante [43]. Dans ce sens, il existe une autre enzyme intéressante : la RdRp qui est une réplacase essentielle à la réplication du génome viral [44].

Ces enzymes (3CLpro, PLpro et RdRp) sont donc responsables de la protéolyse, de la réplication et de la production de nouveaux virions [45, 46]. Elles sont considérées comme des cibles potentielles pour le développement de stratégies thérapeutiques, car elles sont cruciales pour la survie, la réplication et la transmission des virus. Dans cette optique, les similitudes de séquence de ces protéines avec des virus proches comme le SARS-CoV (2002) et le MERS-CoV (2013) ont été étudiées, pour lesquels des médicaments et des vaccins ont été développés. Une meilleure compréhension des similitudes et des différences de séquence dans la région conservée pourrait aider à concevoir des approches thérapeutiques améliorées.

En général, les poches catalytiques des enzymes cibles potentielles sont des régions importantes pour la conception et le développement de petites molécules inhibitrices. Le SARS-CoV-2 partage une identité de séquence élevée pour ses protéines RdRp et 3CLpro avec le SARS-CoV et le MERS-CoV. Les molécules thérapeutiques utilisées pour cibler le SARS-CoV et le MERS-CoV pourraient être utiles pour le traitement du SARS-CoV-2 avec une efficacité similaire. Cependant, le domaine RBD du SARS-CoV-2 est sensiblement différent de celui du SARS-CoV, notamment dans les deux régions qui interagissent avec l'ECA 2. Cette différence fait que les anticorps et les peptides thérapeutiques précédemment mis au point pour le domaine RBD du SARS-CoV ne fonctionnent pas efficacement contre le SARS-CoV-2, d'où la nécessité d'élaborer de nouveaux médicaments et thérapies en tenant compte de ces différences structurelles [47].

Les CoVs influencent les cellules hôtes par leur activité cytotoxique ainsi que par des mécanismes à médiation immunitaire [48]. L'infection par les CoVs entraînerait des effets cytopathiques, notamment l'apoptose et la lyse cellulaire [49]. Le virus provoque une fusion cellulaire conduisant à la formation de syncytia. Ces processus ont pour but de former le complexe de réplication virale. Des CoVs comme le SARS-CoV et le MERS-CoV exercent par exemple leurs effets cytopathiques sur les cellules rénales et conduisent à la formation de syncytia dans les tissus pulmonaires [49].

La pathogenèse du SARS-CoV-2 fait intervenir à la fois le système immunitaire inné et le système immunitaire adaptatif [50]. Pendant l'infection virale, les lymphocytes T et les messagers secondaires comme les cytokines jouent un rôle important dans la progression de la maladie. Les récepteurs innés de reconnaissance de motifs moléculaires (Pattern Recognition Receptor ou PRR) reconnaissent les molécules associées aux agents pathogènes ou libérées par les cellules endommagées et sont impliqués dans la modulation de la réponse immunitaire innée et adaptative de l'infection par le SARS-CoV-2. En outre, les anticorps humoraux jouent aussi un rôle dans les infections causées par les CoVs.

➤ **Structure du génome (Voir figures 4, 5 et 6)**

Le génome du SARS-CoV-2 est constitué d'un ARN simple brin de sens positif [21]. Il est d'une taille d'environ 29,9 Kb [2]. Le patrimoine génétique du SARS-CoV-2 est composé de 13 à 15 cadres (12 fonctionnels) de lecture ouverts (Open reading Frames ou ORF) contenant environ 30 000 nucléotides. La disposition génétique des ORFs ressemble beaucoup à celle du SARS-CoV et du MERS-CoV [34, 35]. Les ORFs codant pour les protéines majeures S, E, M et N suivent un ordre d'apparition 5'-3' et sont considérés comme des cibles médicamenteuses/vaccinales majeures. Ces produits génétiques jouent des rôles importants dans l'entrée, la fusion et la survie du virus dans les cellules hôtes [46].

L'organisation génomique du SARS-CoV-2 se présente sous la forme d'une topologie linéaire, partageant environ 89% d'identité de séquence avec les autres CoVs. L'ensemble du génome du SARS-CoV-2 code pour une polyprotéine d'environ 7096 résidus de long, composée de nombreuses protéines structurales et non structurales (Non-Structural Protein ou NSP). Le contenu nucléotidique du génome viral est principalement détenu par deux protéines non structurales ORF1a et ORF1ab, suivies par des protéines structurales. Les polyprotéines pp1a et pp1ab sont codées par les ORFs 1a et ORFs 1b. La polyprotéine pp1ab est codée par le mécanisme de décalage du cadre ribosomal du gène 1b. Ces polyprotéines sont ensuite traitées par des protéinases codées par le virus produisant ainsi 16 protéines. Celles-ci sont conservées dans tous les CoVs appartenant à la même famille.

Le MERS-CoV est étroitement apparenté au SARS-CoV-2, car il possède un génome plus grand, d'environ 30 119 nucléotides. Le patrimoine génétique de MERS contient une structure de cap 5', une queue poly(A) à l'extrémité 3' et le gène rep qui contient 16 NSP qui sont numérotés nsp1-nsp16 à partir de l'extrémité 5'. Environ 10 kb du génome à l'extrémité 3' constituent les 4 gènes de structure (S, E, M, N) et 5 protéines accessoires (ORF3, ORF4a, ORF4b, ORF5, ORF8). Le SARS-CoV-2 est relativement plus infectieux que le SARS-CoV et le MERS-CoV, peut-être en raison d'une dynamique épidémiologique différente. Il est possible que d'autres espèces de mammifères jouent le rôle d'hôtes intermédiaires ou d'amplificateurs et

que la séparation écologique ultérieure ait permis d'acquérir des mutations nécessaires à une transmission efficace à l'homme [51].

L'analyse comparative des séquences du génome du SARS-CoV-2 présente des similitudes frappantes avec le BAT-CoV, ce qui laisse supposer une origine possible à partir des chauves-souris de la ville de Wuhan en Chine [51]. Cependant, certains éléments suggèrent que les chauves-souris sont les réservoirs naturels de SARS-like CoVs, y compris le SARS-CoV-2 [19, 52, 53]. Les CoVs ont besoin d'hôtes intermédiaires avant d'être transmis à l'homme. Une origine probable du SARS-CoV-2 serait le pangolin, sur la base de la similarité significative de certains gènes [54]. Il a été d'autre part suggéré que les chiens pouvaient être infectés par le SARS-CoV-2 [49]. Il est intéressant de noter que l'ECA 2 de l'homme et du chien présente une grande similitude de séquence génomique (13 sur 18) et que par conséquent, sa liaison au RBD du SARS-CoV-2 est assez similaire, ce qui peut suggérer une transmission de l'homme à l'animal [55].

Par rapport aux génomes connus du SARS-CoV et du MERS-CoV, le SARS-CoV-2 est plus proche en termes de séquences globales du génome des CoVs de type SARS de chauve-souris. La plupart des protéines codées du SARS-CoV-2 sont similaires à celles du SARS-CoV mais certaines différences existent. Au niveau des protéines, il n'y a pas de substitutions d'acides aminés dans les NSP7, NSP13, protéines d'enveloppe, protéines de matrice et protéines accessoires p6 et 8b, à la différence des NSP2, NSP3, protéines de pointe et RBD [20]. Il a été suggéré d'autre part qu'une mutation au niveau des NSP2 et NSP3 pouvait jouer un rôle dans le potentiel infectieux et les mécanismes de différenciation du SARS-CoV-2, ce qui incite à explorer la différence de tropisme et de transmission entre le SARS-CoV-2 et SARS-CoV et mener des investigations plus profondes sur les cibles thérapeutiques potentielles [56].

Une étude a analysé le génotype du COVID-19 chez des patients de provinces chinoises diverses et a découvert que le SARS-CoV-2 avait muté chez différents patients [57]. Le degré de diversification du SARS-CoV-2 était par contre inférieur à celui de la grippe aviaire H7N9 par exemple [58]. Un autre travail a mené une analyse génétique de 103 génomes de SARS-CoV-2 ce qui a permis de définir deux types d'évolution du SARS-CoV-2: de type L ($\approx 70\%$) et de type S ($\approx 30\%$) [59]. Les souches de type L, qui elles-mêmes dérivent des souches du type S,

sont évolutivement plus agressives et plus contagieuses. Ainsi, les virologistes et épidémiologistes doivent surveiller de près ces nouvelles souches de coronavirus.

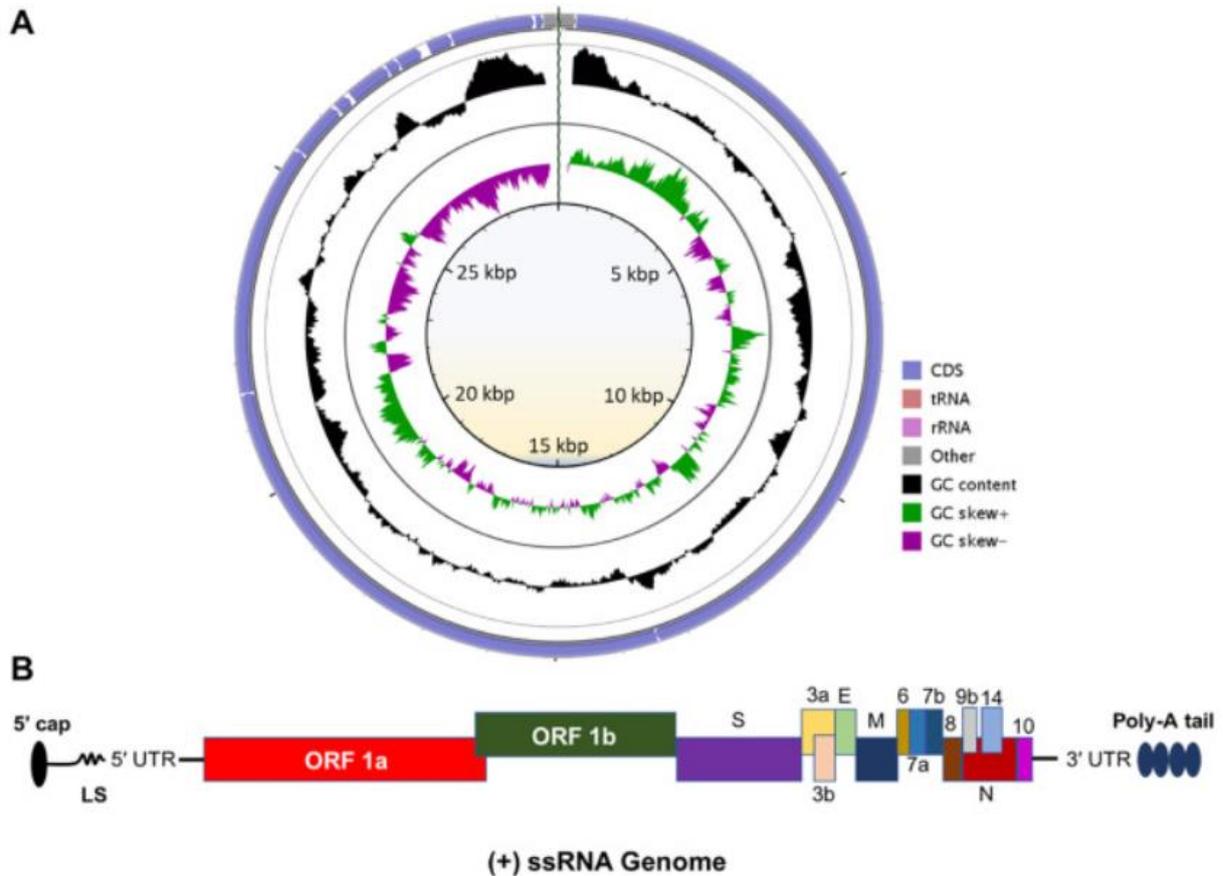


Figure 4 : Schéma de l'architecture du génome du SARS-CoV-2.

A. Représentation du génome de référence du SARS-CoV-2 montrant les régions codant pour les protéines et le contenu GC du génome. **B.** Représentation de l'ARNm coiffé avec une séquence leader (LS) à l'extrémité 5', une queue poly-A à l'extrémité 3'. Il est constitué des ORF1a, ORF1b, Spike (S), ORF3a, Enveloppe (E), Membrane (M), ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, Nucléocapside (N), et ORF10. [51]



Figure 5 : Comparaison de l'alignement multiple de séquences

(Multiple Sequence Alignment ou MSA) des protéines structurales du SARS-CoV-2, MERS-CoV, SARS-CoV et BAT-CoV. **A.** RBD de la glycoprotéine S. **B.** Protéine de l'enveloppe E. **C.** Protéine membranaire M. **D.** nucléoprotéine N. [49]

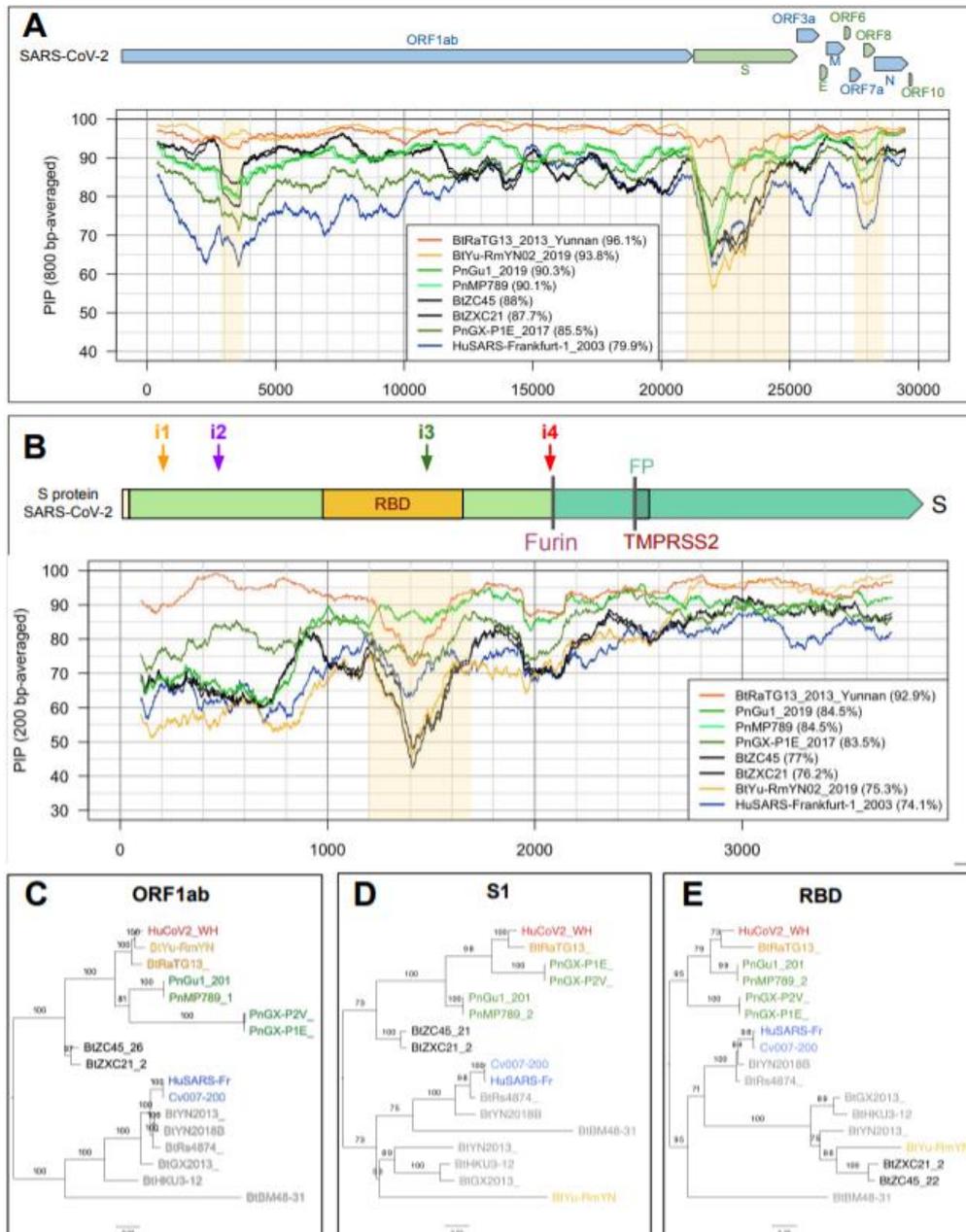


Figure 6 : Taux d'identité entre SARS-CoV-2 et les autres coronavirus varie selon la position dans le génome

(le niveau 100 % correspond au génome de référence du SARS-CoV-2). **A.** Pourcentage d'identité le long du génome entier. **B.** Pourcentage d'identité le long du gène S. **C-E.** Impact des recombinaisons sur la topologie des arbres phylogénétiques inférés à partir de différentes régions génomiques (gène ORF1ab, région codante de la partie S1 de la protéine S et RBD).

[14]

➤ **Protéines non structurales (Non-Structural Proteins ou NSP)**

En plus des protéines structurales formant la capside, le génome viral code pour de nombreuses NSPs qui jouent de nombreux rôles dans les processus de réplication et d'assemblage du virus [60]. Ces protéines participent à la pathogenèse virale en modulant la régulation de la transcription, l'activité hélicase, l'immunomodulation, la transactivation des gènes et en contrant la réponse antivirale [61–63].

Certaines des principales fonctions des NSPs du SARS-CoV-2 ont été explorées. Les NSPs du SARS-CoV-2 sont impliqués dans de nombreux processus biologiques, notamment la réplication du génome viral (GO:0019079 et GO:0039694), le traitement des protéines (GO:0019082), la transcription (GO:0006351) et la protéolyse (GO:0006508). Ces protéines sont impliquées dans la liaison ARN (GO:0003723), l'activité endopeptidase (GO:0004197), l'activité transférase (GO:0016740), la liaison ATP (GO:0005524), la liaison du zinc (GO : 0008270), l'activité ARN polymérase 5'-3' dirigée par l'ARN (GO:0003968), l'activité exoribonuclease, la production des 5'-phosphomonoesters (GO:0016896) et l'activité méthyltransférase (GO:0008168). (Voir Tableau V)

Tableau V : Protéines non structurales des coronavirus et leur fonction. [64]

Protéine non structurale (nsp)	Fonction
nsp 1 et 3	Inhibition de la signalisation IFN et blocage de la réponse immunitaire innée de l'hôte par la promotion de la dégradation cellulaire et bloque la traduction de l'ARN de l'hôte
nsp 2	Liaison à la protéine d'interdiction
nsp3 et 5	Promouvoir l'expression des cytokines et le clivage de la polyprotéine virale
nsp 4 et 6	Contribuer à la structure des DMV en tant que protéine d'échafaudage transmembranaire (formation de DMV)
complexe nsp 7/8	Pince de processivité pour l'ARN polymérase par le complexe hexadécamérique des bras
nsp9	Protéine de liaison à l'ARN phosphatase
nsp 10, 16 et 14	Stimulation de l'activité ExoN et 2'-O-MT
nsp 12	Enzyme de réplication (ARN polymérase ARN-dépendante)
nsp 13	ARN hélicase, 5' triphosphatase
nsp 14	Relecture du génome viral
nsp 15	Endoribonucléase virale et protéase de type chymotrypsine
nsp 16	Éviter la reconnaissance de MDA5 et inhiber la régulation de l'immunité innée

➤ **Cibles médicamenteuses potentielles (Voir figure 7)**

La glycoprotéine de pointe (S), la protéine d'enveloppe (E), la protéine de membrane (M), la nucléoprotéine (N) et les deux isoformes (1a et 1ab) de la réplicase sont considérées comme des cibles médicamenteuses/vaccinales potentielles. Les polyprotéines de réplicase contiennent le principal domaine de la protéase, y compris l'isoforme 1ab avec le domaine RdRp de liaison à l'ARN, qui joue un rôle crucial dans le processus de pathogenèse.

L'analyse de séquence de ces protéines cibles de médicaments en utilisant l'alignement multiple de séquences (Multiple Sequence Alignment ou MSA) a pour but de comprendre la relation entre les virus en termes de conservation et de divergence de séquence. Une recherche BLASTp a indiqué que sur les 12 régions codantes (1ab, S, 3, E, M, 7, 8, 9, 10b, N, 13 et 14), la plupart ont une longueur similaire à celles des virus bat-SL-CoVZC45 et bat-SL-CoVZXC21 avec quelques insertions et délétions, à l'exception d'une protéine de pointe plus longue. Un grand nombre de protéines ont montré un niveau élevé de similitude de séquence entre le SARS-CoV-2 et le Bay-CoV, avec une identité de séquence de 90 % pour la protéine 1a, 86 % pour la protéine 1ab, mais une identité de séquence moindre pour la protéine de pointe (environ 80 %) et la protéine 13 (73,2 %). La protéine 1ab est assez similaire entre le SARS-CoV-2 et le SARS-CoV, tandis que les gènes accessoires 3a et 8b du SARS-CoV-2 sont les plus proches au SARS-CoV. Cependant, le RdRp est très différent entre eux [65].

Des différences significatives existent entre les protéines des CoVs infectant l'homme : la protéine 8a est présente dans le SARS-CoV mais absente dans le SARS-CoV-2 alors que la protéine 8b est plus longue dans le SARS-CoV-2 (121 aa) et la protéine 3b plus courte dans le SARS-CoV-2 (22 acides aminés). Au total, 380 substitutions d'acides aminés ont été identifiées entre le SARS-CoV-2 et les séquences du SARS-CoV et des SARS-like CoVs, ce qui entraîne une divergence des caractères fonctionnels et pathogènes. Ces substitutions ont été observées principalement dans les protéines nsp3, nsp2 et S, tandis que les protéines nsp7, nsp13, E, M ou accessoires p6 et 8b ont été conservées. Sur la base de la similarité des séquences protéiques, on peut déduire que trois espèces virales, à savoir SARS-CoV, bat-SL-CoVZC45 et bat-SL-CoVZXC21, sont très similaires au SARS-CoV-2 [49].

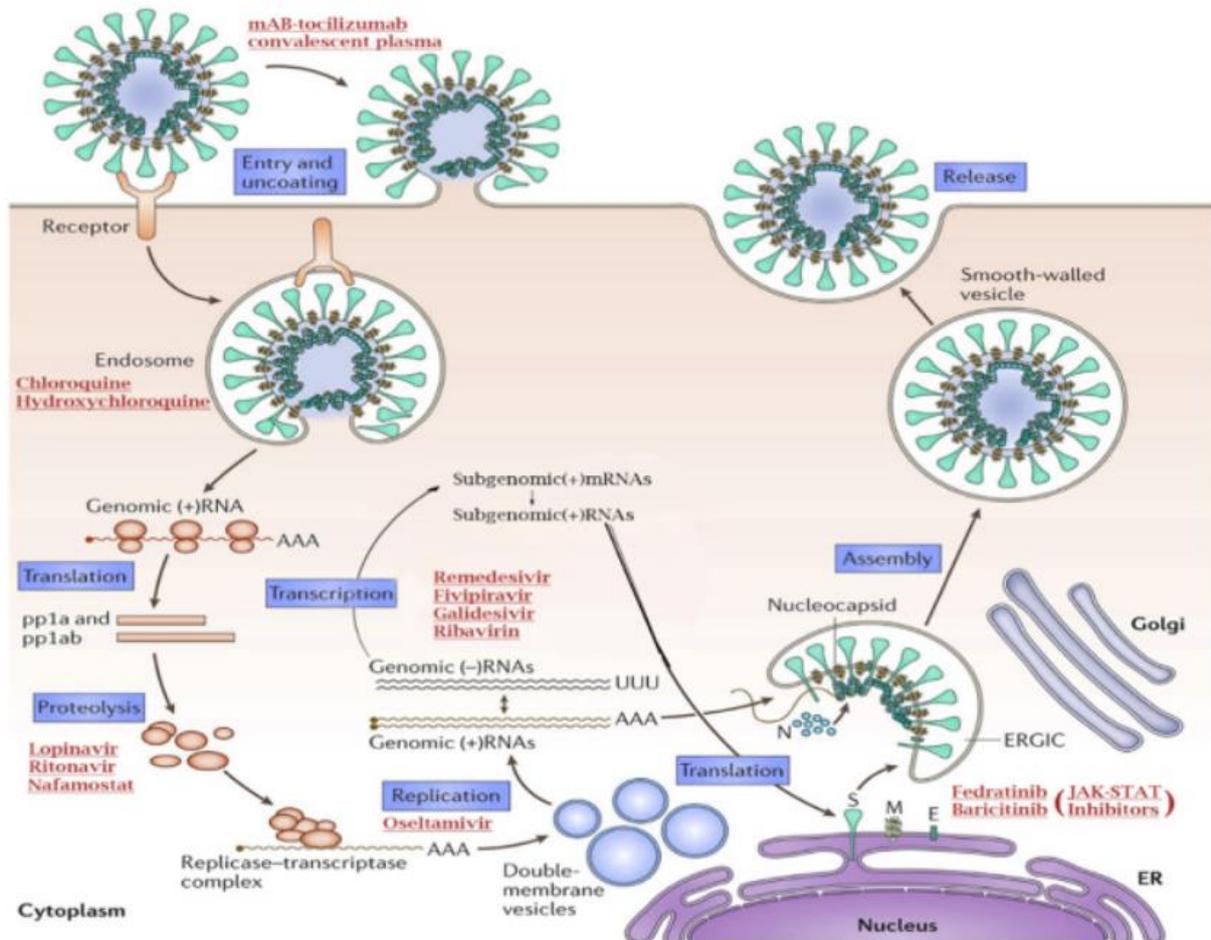


Figure 7 : Schéma montrant le cycle de vie du SARS-CoV-2 et les cibles médicamenteuses potentielles dans la cellule hôte. [49, 66]

Glycoprotéine de pointe (S) (Voir figure 8)

La glycoprotéine S joue un rôle important dans la pathogenèse en se liant à la cellule hôte par l'intermédiaire de son RBD [67]. La protéine S initie l'infection en fixant le virion à la cellule hôte. Elle est composée de 1273 résidus d'acides aminés contenant trois sous-unités (S1, S2 et S2') qui agissent différemment pendant le processus d'adhésion à la cellule hôte. La sous-unité S1 est impliquée dans l'attachement des virions à la membrane de la cellule hôte en interagissant avec l'ECA 2 qui initie ensuite le processus d'infection [39]. Au cours de ce processus, la protéine S subit des changements de conformation induits par son entrée dans les endosomes de la cellule hôte [47]. La compréhension de ces changements de conformation est essentielle pour le processus de développement des vaccins, car les changements dynamiques de la protéine cible peuvent affecter les réponses immunitaires [68]. Les mutations de la protéine S semblent induire des changements de conformation, ce qui peut entraîner une modification de l'antigénicité. Bien que plusieurs mutations aient été trouvées dans la région de liaison du récepteur S1 du SARS-CoV-2, son interaction avec l'ECA 2 est préservée chez l'homme, le porc, la civette et les chauves-souris, à l'exception de de la souris [47, 69, 70].

L'autre sous-unité S2 de la protéine S, fonctionne comme une protéine de fusion. Elle aide à la fusion du virion à la membrane cellulaire des mammifères. Au cours du processus de fusion, la protéine S2 apparaît dans trois états conformationnels principaux : premièrement un état natif pré-fusionnel, suivi par un état intermédiaire et finalement un état post-fusionnel en épingle à cheveux. Il est intéressant de comprendre comment ces états de conformation dynamiques orchestrent le mécanisme d'entrée du virus dans la membrane de la cellule hôte, car cela pourrait conduire au développement de thérapeutiques efficaces [68]. La séquence de la tige S2 du SARS-CoV-2 est très similaire à celle des CoVs de type SARS de la chauve-souris et du SARS-CoV (environ 99%), ce qui indique qu'un large spectre d'utilisation de composés antiviraux conçus contre le domaine S2 de ces virus pourrait être utile dans la thérapie du COVID-19 [71, 72] La sous-unité clivée S2' restante de la protéine S fonctionne pour sa part comme un peptide de fusion [73].

La RBD de la protéine S est la partie la plus variable du SARS-CoV-2. Le profil MSA de la RBD de la protéine S suggère que trois CoVs (BAT-CoV HKU3, SARS-CoV et SARS-CoV-2) partagent un modèle d'évolution typique, tandis que le MERS-CoV a une composition en acides aminés de la RBD différente, montrant une divergence par rapport aux souches de virus mentionnées précédemment. Le motif de liaison au récepteur du RBD, long d'environ 90 acides aminés, qui facilite la liaison du virus au récepteur de l'hôte, est le moins conservé, ce qui suggère l'implication de mécanismes multiples dans la pathogénèse. Dans une analyse plus poussée, il a été constaté que six résidus du RBD du SARS-CoV-2 (Leu455, Phe486, Gln493, Ser494, Asn501 et Tyr505) étaient critiques pour la liaison à l'ECA 2. Parmi eux, cinq diffèrent du SARS-CoV, une caractéristique qui doit être prise en compte dans la conception et le développement de médicaments [23].

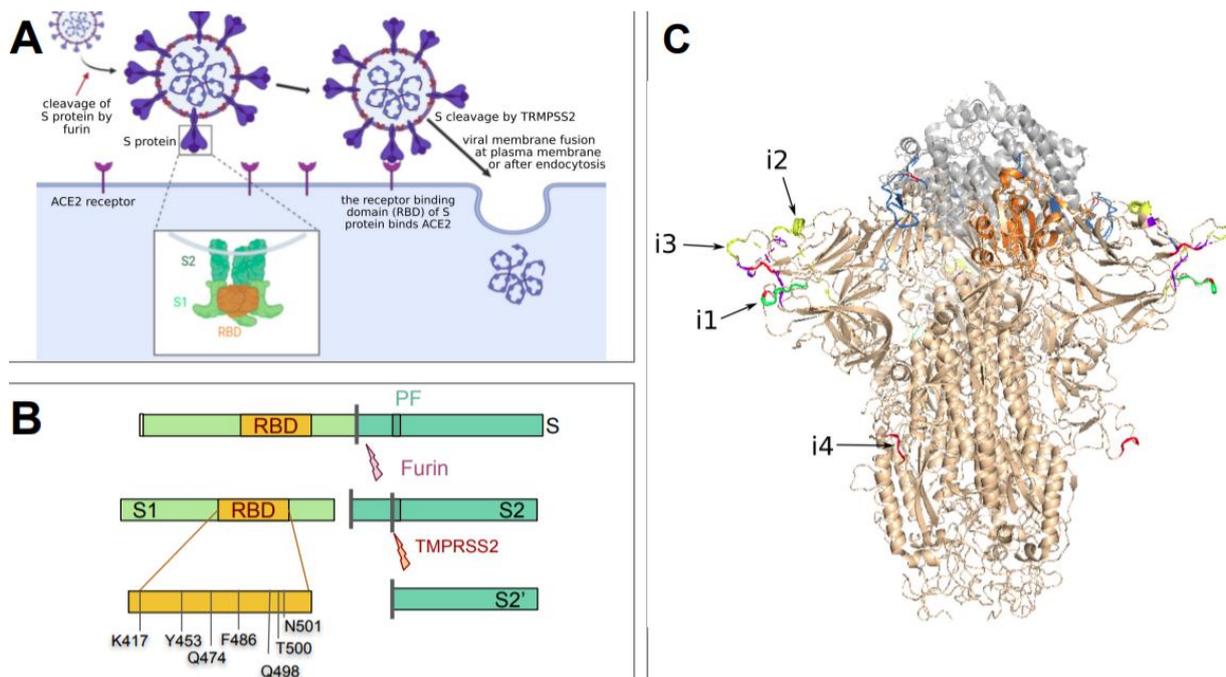


Figure 8 : Représentation schématique de la structure et des fonctions de la protéine S.

A. L'infection des cellules par le SARS-CoV-2 après fixation de la protéine S au récepteur ECA 2. **B.** La protéine S subit deux étapes de maturation par clivage protéolytique (par les protéases furine puis TMPRSS2) nécessaires à son activation et à la libération du peptide de fusion. **C.** Structure de la protéine S fixée au récepteur ECA 2. [14]

Protéines de l'enveloppe (E)

Les protéines de l'enveloppe (E) sont des protéines relativement petites (75 aa) qui contribuent à l'assemblage et à la libération des virions [27]. Parmi les protéines structurales du SARS-CoV-2, la protéine E est considérée comme une cible médicamenteuse potentielle. La protéine E joue un rôle important dans la morphogénèse et l'assemblage du virus [74]. Elle est connue pour agir comme une viroporine qui s'assemble à la membrane de l'hôte en formant des pores protéino-lipidiques impliqués dans le transport des ions. Les séquences de la protéine E sont des régions hautement conservées pour le BAT-CoV, le SARS-CoV et le SARS-CoV-2, alors qu'elles présentent une légère variation pour le MERS-CoV.

Protéines de la membrane (M)

Les protéines M sont des protéines structurales longues de 222 acides aminés qui fonctionnent en concomitance avec les protéines E, N et S, et jouent un rôle majeur dans l'encapsulation de l'ARN [75]. Les protéines M sont les protéines virales les plus abondantes des CoVs et sont impliquées dans l'attribution d'une forme distincte au virus. Le profil MSA de la protéine M montre une conservation de séquence plus élevée chez le BAT-CoV, le SARS-CoV et le SARS-CoV-2. Cependant, une variation considérable de la séquence de la protéine M de la souche MERS-CoV a été observée. La présence de trois domaines transmembranaires est une caractéristique distincte des protéines M.

Nucléoprotéine (N)

Les protéines de la nucléocapside (N) jouent un rôle important dans l'encapsulation de l'ARN viral dans la ribonucléocapside [76]. La protéine N du SARS-CoV-2 est très conservée parmi les CoVs et présente une identité de séquence d'environ 90% avec celle du SARS-CoV. Elle intervient dans l'assemblage viral en interagissant avec le génome viral et la protéine M, ce qui contribue à l'augmentation de la transcription et de la réplication de l'ARN viral [77]. Les protéines N sont donc considérées comme des cibles médicamenteuses potentielles. Les protéines N se lient à l'ARN viral sous forme de perles par l'intermédiaire de leur domaine de liaison qui est d'une longueur d'environ 140 acides aminés et situé dans leur noyau [27]. Les MSA des protéines N des virus BAT-CoV, SARS-CoV et SARS-CoV-2 montrent des régions

hautement conservées. Sur la base de la grande similarité de séquence de la protéine N, on peut penser que les anticorps dirigés contre la protéine N du SARS-CoV sont susceptibles de reconnaître la protéine N du SARS-CoV-2.

Polyprotéine réplicase

La polyprotéine réplicase est une enzyme essentielle qui contribue au clivage de l'ARN hôte et à la réplication de l'ARN viral [44]. Comme vu précédemment, les ORF non structuraux 1a et 1ab partagent la majorité du contenu nucléotidique du génome viral. Les polyprotéines répliques sont des protéines multifonctionnelles qui peuvent accomplir diverses tâches, contribuant ainsi à la pathogenèse virale [78]. Cependant, le rôle principal de ces protéines est d'aider à la transcription et à la réplication de l'ARN viral. Principalement, ces protéines sont subdivisées en plusieurs NSP telles que les nsp1, nsp2, nsp3, nsp4, et en protéases telles que les protéases PLpro et 3CLpro. L'ORF1ab contient un domaine RdRp spécifique jouant un rôle central dans la transcription et la réplication de l'ARN viral.

La polyprotéine réplicase est composée de trois domaines : le domaine macro, le domaine papaine-like et le domaine principal de la protéase. La MSA de la polyprotéine réplicase 1a montre une région conservée parmi les trois domaines, à l'exception du domaine principal de la protéase où les régions de conservation de la séquence sont les plus faibles. La protéase principale du SARS-CoV et du SARS-CoV-2 présente une plus grande similarité de séquence (environ 96%), ce qui suggère une évolution commune. Le domaine principal de la protéase du MERS-CoV ne présente aucune similitude avec les trois autres souches virales, ce qui suggère une nette divergence dans l'évolution. La polyprotéine réplicase 1ab contient également des domaines macro, papaine-like et principal, mais aussi un domaine catalytique RdRp qui agit comme une polyprotéine liant l'ARN. Le MSA de la polyprotéine réplicase 1ab suggère une conservation de séquence plus élevée parmi les quatre souches de CoVs.

➤ Réplication et pathogenèse du coronavirus

L'ECA 2 trouvé dans les voies respiratoires inférieures de l'homme représente le récepteur cellulaire pour le SARS-CoV et régule à la fois la transmission interhumaine et inter-espèces [79, 80]. Des auteurs ont isolé du liquide de lavage broncho-alvéolaire d'un patient atteint de COVID-19 et ont confirmé que le SARS-CoV-2 utilisait le même récepteur d'entrée cellulaire que le SARS-CoV, à savoir l'ECA 2 [12]. La glycoprotéine S à la surface du coronavirus peut se fixer au récepteur ECA 2 à la surface des cellules humaines [81]. La glycoprotéine S comprend deux sous-unités: S1 et S2 [82]. La sous-unité S1 détermine le tropisme cellulaire avec le domaine de fonction RBD, tandis que la sous-unité S2 joue un rôle de médiateur dans la fusion membranaire du virus avec la cellule de l'hôte grâce à tandem de deux domaines: les HR1 (Heptad Repeats 1) et HR2 (Heptad Repeats 2) [83, 84]. Après la fusion membranaire, l'ARN du génome viral est libéré dans le cytoplasme. Ensuite intervient la décapsidation et la traduction de deux polyprotéines: pp1a et pp1ab [85], qui codent à leurs tours pour des protéines non-structurelles et ainsi former un complexe de réplication-transcription (Réplication-Transcription Complex ou RTC) dans des vésicules à double membrane [86]. Le RTC se réplique de façon continue et synthétise un ensemble d'ARN subgénomiques qui codent pour des protéines accessoires et des protéines structurelles [87].

Le réticulum endoplasmique médiateur, l'ARN génomique nouvellement formé, les protéines de nucléocapside et les glycoprotéines membranaires s'assemblent et forment les bourgeons de particules virales [88]. Les vésicules contenant les virions fusionnent ensuite avec la membrane plasmique pour libérer le virus.

La liaison des glycoprotéine S du SARS-CoV-2 au récepteur ECA 2 est donc une étape critique. L'affinité de cette liaison virus-récepteur est étudiée à travers différentes approches. La détection systématique des récepteurs des Betacoronavirus a montré que les cellules humaines exprimant l'ECA 2, mais pas le DPP4 (Dipeptidyl Peptidase-4) ou l'APN (Aminopeptidase N), favoriseraient la pénétration du SARS-CoV-2 [89]. Une autre étude a montré que la liaison de la glycoprotéine S à l'ECA 2 chez le SARS-CoV-2 était 10 à 20 fois plus puissante que celle chez le SARS-CoV [90]. Pour le SARS-CoV, le clivage de la protéine

trimère S est déclenché par l'association de la surface cellulaire à la TMPRSS2 (TransMembrane PRoteaSe Serine 2) et à la cathepsine [91, 92]. Les molécules qui faciliteraient l'invagination membranaire pour l'endocytose du SARS-CoV-2 sont pour leurs part encore inconnues [3].

Des rapports ont montré que le SARS-CoV-2 pouvait être transmis plus facilement, tout en provoquant une infection humaine moins grave que le SARS-CoV. Les données disponibles suggèrent en effet que le SARS-CoV-2 pourrait être moins virulent que le SARS-CoV et le MERS-CoV: la mortalité du COVID-19 est de 3,4%, alors que le taux de mortalité du SARS-CoV est de 9,6% et celui du MERS d'environ 35 % [33]. Les mécanismes potentiels de transmission interhumaine et les mécanismes pathogéniques du SARS-CoV-2 sont actuellement étudiés de manière intensive.

III. Réponse immunitaire de l'hôte et immunopathologie

Pour comprendre l'infection par le SARS-CoV-2 au niveau moléculaire, il est essentiel de connaître le système hormonal rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) qui est au cœur de l'infection par le SARS-CoV-2. L'angiotensinogène (libéré par le foie) est converti en angiotensine I par la rénine plasmatique, qui est ensuite convertie en angiotensine II par l'ECA présente à la surface des cellules endothéliales vasculaires des poumons. L'angiotensine II agit sur le récepteur AT1 pour provoquer une vasoconstriction et stimule également la sécrétion de l'aldostérone, qui augmente la réabsorption du sodium, augmentant ainsi la pression artérielle. L'angiotensine I et II est dégradée respectivement par l'ECA 2 en angiotensine (1-9) et angiotensine (1-7). Ces molécules agissent sur le récepteur Mas pour provoquer une vasodilatation et contrecarrer ainsi les effets de l'angiotensine II. L'infection par le SARS-CoV-2 nécessite la liaison du virus à la forme membranaire de l'ECA 2 et l'internalisation de la protéine S du virus au domaine extracellulaire de l'ECA 2, avec une affinité haute de 15nM, afin d'être internalisé par la cellule hôte [47, 93]. (Voir figure 9)

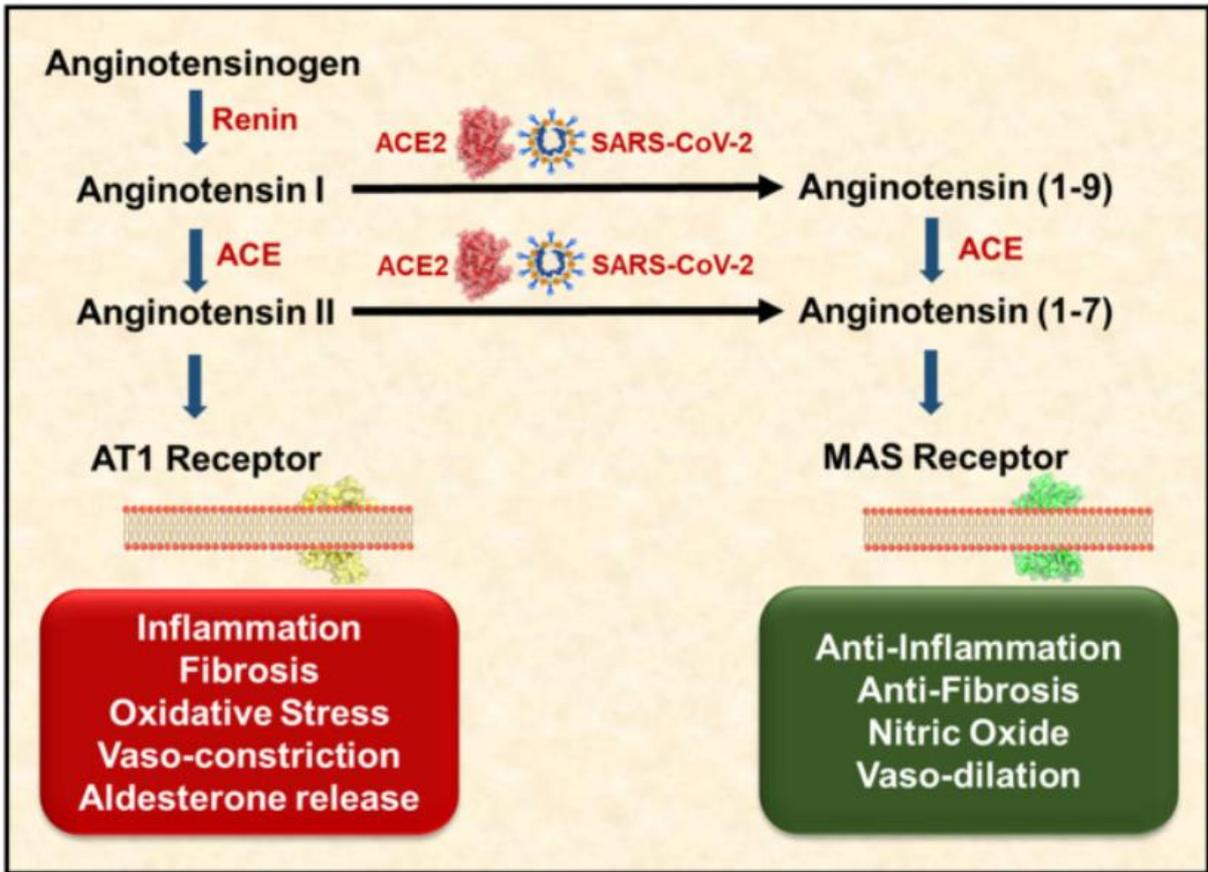


Figure 9 : Schéma montrant le rôle de l'ECA 2 dans l'infection par le SARS-CoV-2. [49]

La réponse immunitaire est vitale pour le contrôle des infections à coronavirus, mais elle peut également conduire à une immunopathogénèse associée à une réponse immunitaire excessive. Les protéines S du coronavirus se lient aux cellules hôtes par l'ECA 2, fusionnant avec la membrane cellulaire et libérant ainsi l'ARN viral dans la cellule. Les ARN viraux, en tant que PAMP (Pathogen-Associated Molecular Patterns), sont détectés par les PRR (Pattern Recognition Receptors). Les TLR 3 (Toll-Like Receptor 3), TLR7 (Toll-Like Receptor 7), TLR8 (Toll-Like Receptor 8) et TLR9 (Toll-Like Receptor 9) détectent l'ARN viral et l'ADN dans l'endosome [94, 95]. Le récepteur d'ARN viral RIG-I (Retinoic-Acid Inducible Gene I), le récepteur cytosolique MDA5 (Melanoma Differentiation-Associated gene 5) et la nucléotidyltransferase cyclique cGAS (cyclic GMP-AMP Synthase) sont responsables de la reconnaissance de l'ARN viral dans le cytoplasme. Ces signaux complexes recrutent des adaptateurs, y compris le TRIF (TIR-domain-containing-adaptor Inducing IFN- β), la protéine MAVS (Mitochondrial AntiViral-Signalling) et la protéine STING (STimulator of INterferon Genes) pour déclencher un phénomène en cascade impliquant la molécule adaptatrice MyD88 et ainsi conduire à l'activation du facteur NF- κ B (Transcription Nuclear factor- κ B) et de l'IRF3 (Interferon Regulatory Factor 3) et la production d'interférons de type I (IFN- α/β) et des cytokines pro-inflammatoires [96–100].

L'interaction virus-cellule produit donc un ensemble de médiateurs immunitaires [101]. L'immunité innée est nécessaire dans la régulation de la réponse immunitaire pour éliminer le virus. Il a été observé qu'un certain nombre de cytokines et chimiokines plasmatiques était augmenté chez les patients COVID-19 positif, à savoir: IL-1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, GCSF, MCSF (Macrophage Colony-Stimulating Factor), IP-10, MCP-1, MIP-1 α , HGF (Hepatocyte Growth Factor), IFN- γ et TNF- α [102–104]. Une dissection post-mortem faite sur un cadavre atteint d'une pneumonie due au COVID-19 a montré des lésions pulmonaires causées par l'inflammation des voies respiratoires inférieures [105]. Les particules virales envahissent d'abord la muqueuse respiratoire et infectent les cellules adjacentes, déclenchant ainsi la production massive de cytokines dans le corps, ce qui peut être nocif pour les patients COVID-19 positifs.

IV. Caractéristiques cliniques (Voir figure 10)

La COVID-19 est une maladie infectieuse respiratoire aiguë émergente qui se propage principalement par voie aérienne par les gouttelettes de salive et les sécrétions respiratoires d'un individu porteur, et ce même pour une faible dose infectieuse [106, 107]. Le SARS-CoV-2 a pu aussi être isolé dans les matières fécales et le sang de patients COVID-19 positif [108]. Ce qui peut indiquer que le SARS-CoV-2 peut avoir divers voies de transmission. La protéine ECA 2 est présente en abondance au niveau des cellules épithéliales alvéolaires et des entérocytes de l'intestin grêle [109]. Ceci peut notamment aider à comprendre les sites d'infection de la maladie.

Sur la base de l'enquête épidémiologique actuelle, la période d'incubation est de 1 à 14 jours avec une médiane de 5 jours (la plupart du temps de 3 à 7 jours), la maladie étant contagieuse pendant la période de latence [110, 111]. Elle est hautement transmissible à l'homme, en particulier chez les personnes âgées et les personnes atteintes de maladies sous-jacentes. Des auteurs ont avancé que l'âge moyen des patients était compris entre 47 et 59 ans et que 41,9 à 45,7% des patients étaient des femmes [22, 106, 112]. Les patients atteints de COVID-19 présentaient des symptômes similaires, principalement de la fièvre et une toux [113]. La forme asymptomatique se situerait autour des 15% [114]. La plupart des adultes ou des enfants atteints de SARS-CoV-2 présentent ainsi des symptômes pseudo-grippaux légers, mais peu de patients sont dans un état critique et développent un syndrome de détresse respiratoire aiguë, une insuffisance respiratoire ou une défaillance multiviscérale [102].

➤ Critères diagnostiques

L'institution de recherche virale en Chine a mené l'identification préliminaire du SARS-CoV-2 par les postulats classiques de Koch ainsi que l'observation de la morphologie du virus par microscopie électronique [114]. Jusqu'à présent, la méthode de référence de diagnostic du COVID-19 est la détection d'acide nucléique dans les prélèvements d'écouvillonnage nasal et nasopharyngé ou des prélèvements au niveau des voies respiratoires par PCR en temps réel.

➤ Symptômes cliniques

Une étude récente a constaté que les manifestations cliniques courantes comprennent la fièvre (88,7%), la toux (67,8%), la fatigue (38,1%), la production d'expectorations (33,4%), l'essoufflement (18,6 %), le mal de gorge (13,9%) et les céphalées (13,6%) [22]. Il a aussi été rapporté la survenue de signes évocateurs comme les troubles du goût (dysgueusie) et de l'odorat (hyposmie, anosmie), souvent réversibles après une période de 30 jours et pouvant être due à une atteinte du rhinencéphale [115]. En outre, une partie des patients ont manifesté des symptômes gastro-intestinaux tels que la diarrhée (3,8%) et les vomissements (5%). Ces manifestations cliniques étaient en accord avec les données précédentes de patients atteints dans la province du Hubei [102, 112, 116]. La fièvre et la toux étaient les symptômes dominants alors que les symptômes des voies respiratoires supérieures et les symptômes gastro-intestinaux étaient rares, suggérant les différences de tropisme viral par rapport au SARS-CoV, au MERS-CoV et à la grippe [117–119]. Les personnes âgées et celles avec des troubles sous-jacents (hypertension artérielle, bronchopneumopathie obstructive chronique, diabète, maladies cardiovasculaires) se détériorent rapidement et peuvent présenter une détresse respiratoire aiguë, un choc septique, une acidose métabolique difficile à corriger ou encore des troubles de la coagulation pouvant mener au décès [102]. Des manifestations neurologiques plus rares ont été décrites, prenant la forme d'encéphalites ou de polyradiculonévrites due à l'atteinte encéphalitique directe par le virus [120].

Dans les examens biologiques, la plupart des patients avaient un nombre de globules blancs normal ou diminué associé à une lymphopénie [22, 121]. Mais chez les patients sévèrement atteints, le nombre de neutrophiles, les D-dimères, le LDH, le taux d'urée et de créatinine sanguins étaient significativement plus élevés quand le nombre de lymphocytes continuait quant à lui à diminuer [122]. De plus, des facteurs inflammatoires tels que l'IL-6 (interleukine 6), IL-10 (interleukine 10) et TNF- α (Tumor Necrosis Factor α) étaient élevés, indiquant ainsi le statut immunitaire des patients. Les données ont montré que les patients hospitalisés aux soins intensifs avaient des taux plasmatiques plus élevés d'IL-2 (interleukine 2), IL-7 (interleukine 7), IL-10 (interleukine 10), de GCSF (Granulocyte Colony-Stimulating Factor), d'IP-10 (10kD Interferon-gamma-induced Protein), de MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1), de MIP-1 α (Macrophage Inflammatory Protein 1- α) et de TNF- α [102].

Le diagnostic est souvent confirmé par biologie moléculaire (par rt-PCR) sur un prélèvement d'écouvillonnage nasal ou naso-pharyngé. Cependant sa sensibilité varie en fonction du site de prélèvement (de 75% en nasopharyngé jusqu'à 95% pour le lavage broncho-alvéolaire) [122].

Côté imagerie, la tomодensitométrie du thorax est l'examen de référence et peut révéler une ou plusieurs opacités en verre dépoli (56,4%) ou un shadowing bilatéral hétérogène (51,8%) [22]. Une partie des patients présentaient quant à eux des images normales. La sensibilité diagnostique radiologique est donc limitée [3]. Il est nécessaire au final de rechercher les symptômes cliniques et détecter l'ARN du virus grâce à la rt-PCR.

➤ **Complications et comorbidités**

D'après les informations actuelles, la plupart des patients atteints de SARS-CoV-2 ont un bon pronostic vital. Cependant quelques patients peuvent se compliquer et être dans un état critique, en particulier les personnes âgées et celles souffrant de maladies chroniques. Au 1er mars 2020, un total de 79 968 cas ont été confirmés en Chine continentale [3]. Parmi eux, 14475 patients (18,1%) avaient une maladie grave, et un total de 2873 décès (3,5%) a été dénombré [3].

Les complications dont peuvent souffrir les patients comprennent le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA), l'arythmie, les états de choc, l'insuffisance rénale aiguë, les lésions cardiaques aiguës, les troubles hépatiques et les infections secondaires [102, 112]. Le pronostic quant à lui dépendrait de la gravité de la maladie. Celle-ci tend à progresser plus rapidement chez les personnes âgées, avec le nombre moyen de jours entre l'apparition des premiers symptômes et le décès étant plus court chez les personnes âgées de 65 ans ou plus [123, 124]. Comme pour les patients atteints de H7N9, les patients âgés de sexe masculin avec des comorbidités avaient un risque de décès plus élevé [125]. Les nouveau-nés et les personnes âgées ont besoin de plus d'attention et de soins en raison de leur système immunitaire affaibli ou immature [126].

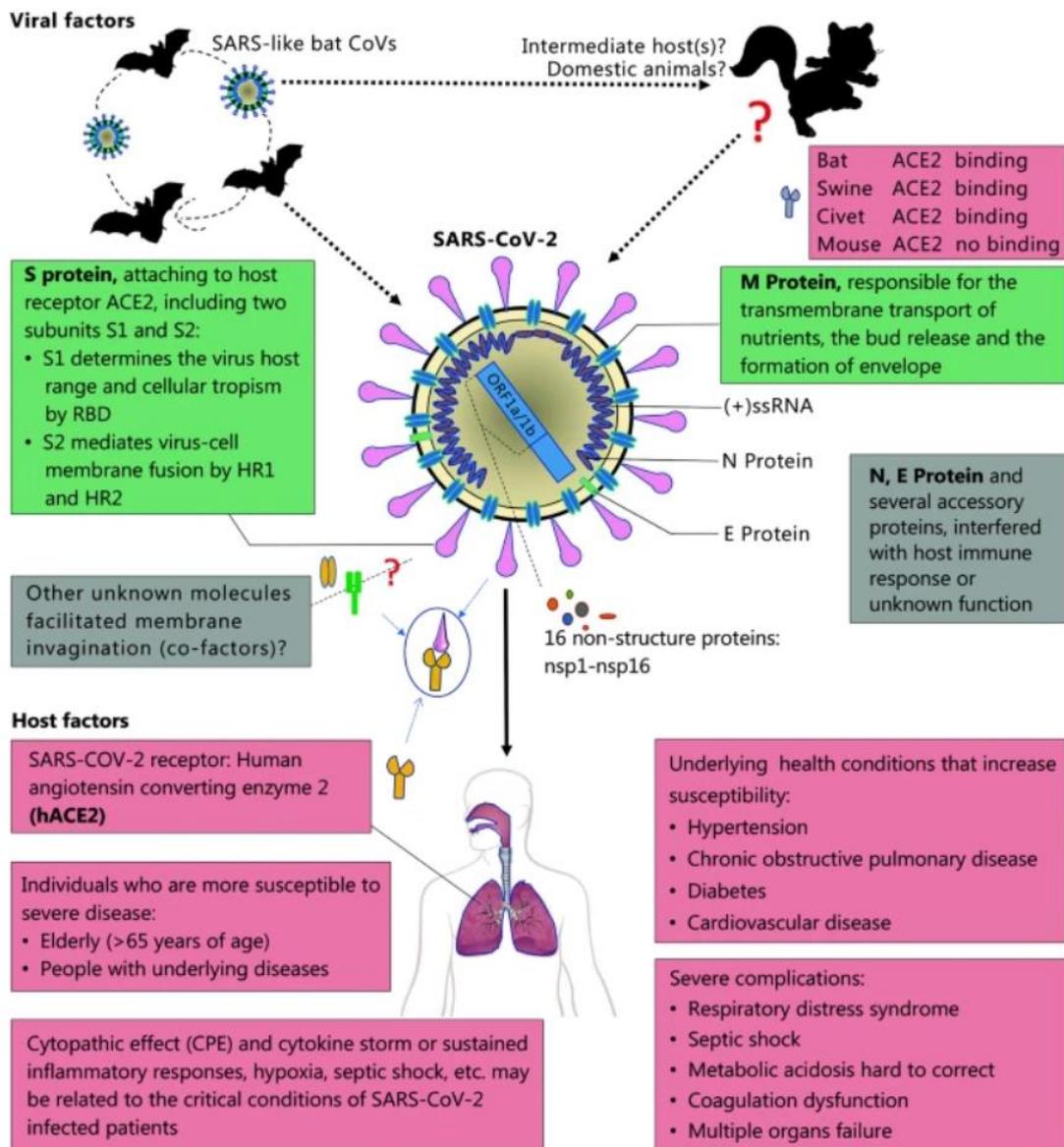


Figure 10 : Schéma montrant les facteurs viraux et facteurs liés à l'hôte qui influencent la pathogenèse du SARS-CoV-2. [3]

V. Méthodes de diagnostic biologique

➤ Le prélèvement

Il existe plusieurs méthodes pour faire le diagnostic d'une infection respiratoire. L'examen de choix est le lavage ou l'aspiration nasale. Il est possible aussi de rechercher l'agent infectieux dans des échantillons pulmonaires (lavage bronchoalvéolaire, biopsie...). L'écouvillonnage nasale reste une méthode intéressante, par contre sa sensibilité à détecter les virus respiratoires est plus faible que les techniques précédemment citées.

➤ La culture cellulaire

La culture cellulaire consiste à ensemercer les échantillons respiratoires précédemment prélevés sur une couche cellulaire. Après quelques jours à quelques semaines, l'inoculation du virus se produit. Il est possible d'observer alors sa prolifération qui s'associe à un effet cytopathogène. Cependant, chaque virus a un tropisme cellulaire spécifique. Afin de maintenir plusieurs virus en répllication, il est nécessaire d'entretenir de multiples lignées cellulaires.

La culture cellulaire est une méthode de diagnostic coûteuse dont les résultats sont tardifs. Pour avoir les meilleurs résultats possibles, et afin d'éviter l'inactivation de l'agent pathogène, l'échantillon prélevé doit être rapidement acheminé au laboratoire.

➤ **La sérologie**

Les tests sérologiques pratiqués au cours des infections virales ont une sensibilité relative. Il existe à titre exemple des tests pour les anticorps présents au cours des infections à parainfluenza (1, 2 et 3), à adénovirus, à RSV (Respiratory Syncytial Virus) et aux virus grippaux (A et B). Cependant, ces tests ne ciblent pas toujours les virus susceptibles de provoquer une atteinte des voies respiratoires.

Le test sérologique doit être en plus effectué sur deux sérums différents à J0 et à J15. Il faudra attendre les résultats du deuxième échantillon si le premier est négatif, ce qui retarde le diagnostic. Au cours des infections respiratoires de nature virale, les tests des anticorps sériques sont donc moins utiles [66].

➤ **La détection directe des antigènes viraux**

Les deux méthodes les plus communément utilisées sont l'immunofluorescence directe et l'immunochromatographie membranaire [127]. Ces deux techniques permettent la détection directe de protéines virales sur les échantillons prélevés. Il est donc possible de pratiquer ces méthodes sur des échantillons où les virus sont sous leurs formes inactives, ce qui constitue un réel avantage par rapport à la méthode de culture cellulaire standard.

L'immunofluorescence directe :

Comparée à la culture cellulaire, l'immunofluorescence directe a une sensibilité légèrement inférieure. C'est une technique de manipulation plus difficile. Il est donc nécessaire qu'elle soit réalisée par un technicien expérimenté. Les lames peuvent être difficiles à lire et requièrent l'utilisation d'un microscope fluorescent.

L'immunofluorescence directe consiste en la détection d'antigènes viraux prélevés dans les échantillons grâce à des anticorps monoclonaux spécifiques liés à la fluorescéine. Les cellules présentes dans les échantillons sont premièrement centrifugées puis déposées dans les puits de glissement. La seconde étape consiste à déposer les anticorps monoclonaux spécifiques dans ces puits. Finalement intervient l'interprétation de la lame. Les cellules infectées paraissent vertes au microscope fluorescent.

L'immunochromatographie membranaire: (Voir figure 11)

Les tests basés sur l'immunochromatographie membranaire ont l'avantage d'être des tests rapides et facilement manipulables. Les résultats sont disponibles en 10 à 30 minutes et les tests peuvent être réalisés par un expérimentateur sans grande expérience.

L'immunochromatographie membranaire consiste en la détection des antigènes viraux prélevés dans les échantillons grâce à des anticorps spécifiques absorbés sur la membrane. Un anticorps monoclonal spécifique du virus, marqué par une enzyme, est présent sur la bandelette du test. Après avoir mélangé l'échantillon prélevé avec des gouttes d'un tampon de lyse (disponible dans le kit et dont la fonction est la lyse des cellules et la libération des antigènes viraux). Le mélange est ensuite placé sur la bandelette de test. Un complexe antigène-anticorps se forme si le virus est effectivement présent. Une bande colorée apparaît alors (due à la réaction entre l'enzyme et le substrat).

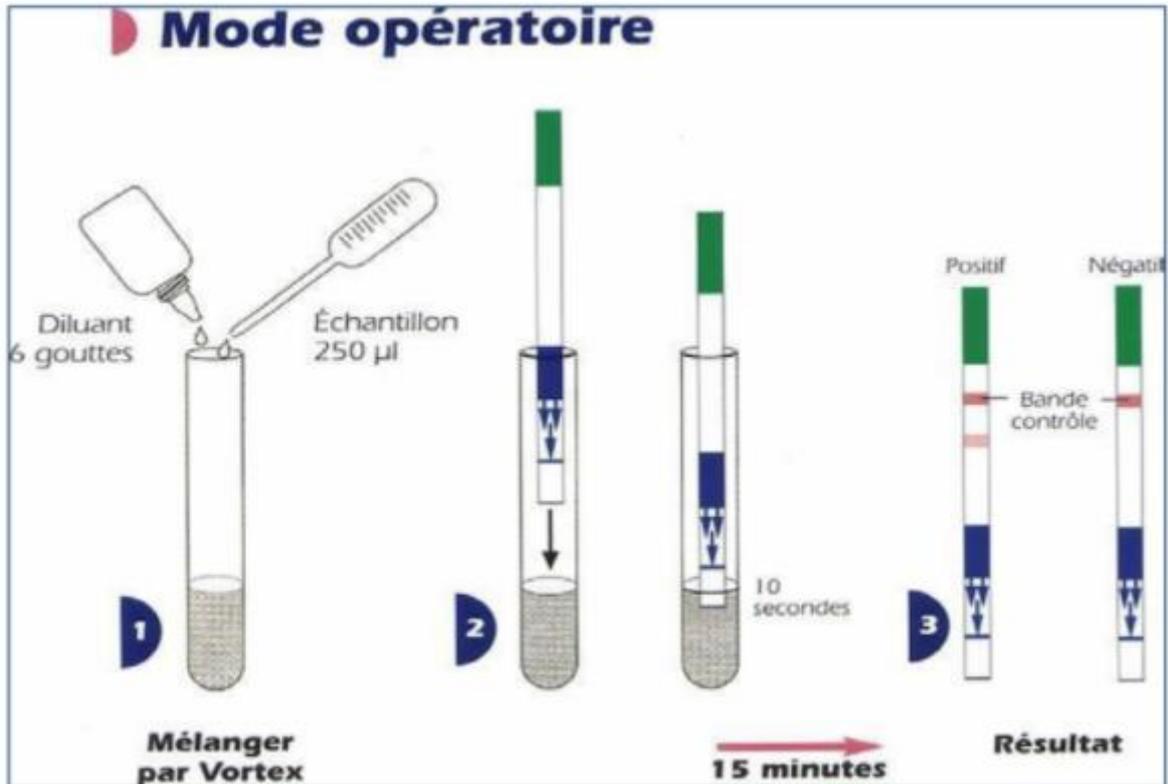


Figure 11 : Exemple d'un test rapide d'immunochromatographie.[127]

➤ **La biologie moléculaire : détection du génome viral**

La détection du génome viral par la PCR (Polymerase Chain Reaction): [47, 93]

La PCR se compose de deux étapes. La première consiste en l'amplification et l'hybridation du génome. Un segment du génome est copié à l'aide d'amorces. Ces amorces sont spécifiques et s'hybrident à la séquence nucléotidique homologue grâce une enzyme : la Taq polymérase. Cette enzyme, présente dans le milieu réactionnel, copie le fragment d'ADN. L'amplification et l'hybridation sont répétées plusieurs fois (30-40 fois) pour obtenir un grand nombre de copies de la séquence nucléotidique cible. Durant la deuxième étape, les produits de la PCR deviennent visibles grâce à l'utilisation de gel de polyacrylamide.

La détection de génome viral par la technique des puces à ADN:

Cette technique a actuellement un coût élevé et n'est pas encore valide dans le diagnostic médical des infections respiratoires d'origine virale mais elle est très prometteuse. Elle consiste en l'utilisation de membranes où sont déposées des sondes à ADN spécifiques des germes recherchés. Ces membranes sont placées sur des cartes appelés puces à ADN. Une puce peut contenir un grand nombre de sondes marquées.

A partir de l'échantillon prélevé, une lyse et une extraction des acides nucléiques est réalisée. Ces derniers sont par la suite déposés sur la puce. Le génome viral s'hybride alors avec l'ADN présent sur la sonde spécifique de la puce. A la fin, une lecture informatisée de la puce est réalisée pour révéler la présence de l'hybridation.

VI. Traitement

➤ Traitement symptomatique

La prise en charge des patients atteints de COVID-19 est une approche symptomatique, et les cas graves bénéficient d'une assistance respiratoire [3]. La prévention est assurée par la diffusion de l'importance du lavage régulier des mains, en évitant de se toucher le visage, et en adoptant une distance sociale où les individus sont invités à maintenir une distance d'un mètre les uns des autres. L'OMS a recommandé l'oxygénation par membrane extracorporelle (ECMO) chez les patients atteints d'hypoxémie réfractaire [3].

➤ Thérapies antivirales (Voir tableau VI)

Les thérapies disponibles pour les CoVs sont principalement divisées en deux catégories : celles agissant sur des cibles du système immunitaire humain ou des cellules humaines et celles agissant sur le virus lui-même. Plusieurs molécules médicamenteuses ont été essayées comme stratégie de traitement.

Les médicaments antiviraux à large spectre utilisés pour traiter les symptômes de la pneumonie, à savoir les interférons, la ribavirine et la cyclophiline, constituent la première ligne de traitement [128]. Le remdesivir, un analogue de l'adénosine, semble avoir un avenir plus prometteur. Le remdesivir met fin à la synthèse des chaînes d'ARN viral en s'incorporant à la place du nucléotide réel. Une étude récente a montré que le remdesivir se lie au RdRp et inhibe son activité [129]. Ce médicament s'est révélé efficace contre les virus à ARN monocaténaire, notamment le MERS et le SARS-CoV. Encouragé par ces résultats, le remdesivir est préconisé pour le traitement du SARS-CoV-2 [130]. Il a été utilisé pour traiter le premier cas américain de COVID-19 avec succès [131]. Le Remdesivir associé à la chloroquine inhibe efficacement le SARS-CoV-2 in vitro. D'autres études et essais cliniques chez l'homme seront nécessaires avant de déclarer s'il est efficace contre le COVID-19 [132].

D'autre part, la réorientation de médicaments antipaludiques vers le COVID-19 a eu un impact positif [133]. Parmi ceux-ci, la chloroquine a fait l'objet d'une attention particulière [134, 135]. La chloroquine a des effets antiviraux en augmentant le pH endosomal et lysosomal, ce qui entrave la libération du virus de l'endosome ou du lysosome et est donc recommandé pour traiter les patients sévèrement atteints de COVID-19 [136]. De plus, la chloroquine a des effets immunomodulateurs, supprimant la production/libération du TNF- α et de l'IL-6. Elle fonctionne également comme une nouvelle classe d'inhibiteur de l'autophagie, qui pourrait interférer avec les infections virales [137]. Plusieurs études ont trouvé que la chloroquine interférait avec la glycosylation des récepteurs cellulaires du SARS-CoV [138]. L'hydroxychloroquine, un dérivé moins toxique de la chloroquine, s'est également avéré efficace pour inhiber l'infection par le SARS-CoV-2 [139]. D'autre part, des anti-inflammatoires comme l'ibuprofène ou la cortisone sont parfois recommandés pour contrôler l'infection [140].

De nombreuses approches différentes ont été adoptées pour venir à bout de la pandémie de COVID-19 [141–146]. Quelques-unes des thérapies utilisées et leurs lacunes sont comme suit: le phosphate de chloroquine: empoisonnement aigu et décès [147] ; association lopinavir/ritonavir: essai de contrôle randomisé non réalisé [148] ; ibuprofène: problèmes de sécurité [149] ; hydroxychloroquine: essai de contrôle randomisé non réalisé [70] ; cellules souches mésenchymateuses de cordon ombilical: toujours à l'étude [150] ; Tilorone: antiviral à large spectre (non spécifique) [151] ; losartan (bloqueur des récepteurs ECA 2): proposition hypothétique [152] ; Immunoglobuline: contamination par le SARS-CoV-2 [153].

Alors même que la pandémie prend de l'ampleur et touche des millions de personnes dans le monde, certaines idées fausses circulent sur les traitements médicamenteux [140]. La plus importante concerne l'idée que les AINS provoquent une aggravation de l'infection par le COVID19. Mais en l'absence de preuves solides, les patients COVID-19 ont été déconseillés de s'automédicamenter avec des AINS [154]. Pour ce qui est de quel système immunitaire cibler, le système immunitaire inné est le plus recommandé car il contrôle la réplication et l'infection aux CoVs [155]. À cet égard, le blocage de la signalisation de l'interféron devrait renforcer la réponse immunitaire. Il a également été démontré que le blocage des voies de

signalisation des cellules humaines impliquées dans la réplication du virus avait un effet antiviral efficace.

Dans la quête d'un traitement contre le COVID-19, l'OMS a conceptualisé SOLIDARITY, un essai clinique international comme plateforme mondiale commune. Les avantages de cet essai sont multiples : il réduit de 80 % la durée de l'essai par rapport aux autres ; il facilite la comparaison rapide, à l'échelle mondiale, de traitements n'ayant pas fait leurs preuves ; il permet de surmonter le risque que de multiples petits essais ne génèrent pas les preuves solides nécessaires pour déterminer l'efficacité relative des traitements potentiels ; il aide à impliquer les développeurs et les entreprises pour qu'ils collaborent afin de garantir l'accessibilité financière et la disponibilité des options de traitement si elles s'avèrent efficaces. Sur la base des résultats obtenus jusqu'à présent dans les laboratoires, les études animales et les études cliniques préliminaires, les options thérapeutiques suivantes ont été lancées : Remdesivir, Lopinavir/Ritonavir, Lopinavir/Ritonavir associés à Interféron bêta-1a [141, 156, 157].

En plus des thérapies discutées, la thérapie par cellules souches mésenchymateuses (CSM) est une option prometteuse actuellement impliquée dans le traitement du COVID-19 [150, 158]. La perfusion intraveineuse de CSM chez les patients atteints de COVID-19 serait efficace avec des effets secondaires moindres [159]. Il faut noter que les CSM ont une fonction immunomodulatrice. La perfusion réussie de CSM aurait entraîné une augmentation de la fonction pulmonaire des patients [159].

D'autre part, le plasma convalescent est apparu comme une thérapie potentielle pour les patients atteints de COVID-19 sévère [146]. L'utilisation du plasma convalescent comme traitement a été recommandée par l'OMS lors de l'épidémie du virus Ebola en 2014. Dans cette stratégie, le plasma convalescent est récupéré chez les patients entièrement guéris de la maladie virale et est transfusé à la personne infectée. Pendant la pandémie de COVID-19, l'application de cette thérapie a été efficace chez certains patients [160].

Le tocilizumab est un anticorps monoclonal dirigé contre l'IL-6. Au cours des derniers mois, la gravité de la pandémie de COVID-19 augmentant dans le monde entier, il a été utilisé comme stratégie de traitement alternative pour les patients atteints de COVID-19 [143]. La justification de l'utilisation du tocilizumab, un inhibiteur de l'IL-6, est que chez la plupart des personnes malades, l'activation des lymphocytes T et des macrophages mononucléaires se produit en grand nombre, entraînant la sécrétion d'IL-6 [142]. Sa présence excessive provoque une tempête de cytokines et d'autres réponses inflammatoires dans les poumons et d'autres organes [161]. L'administration de tocilizumab est utilisée pour contrôler les niveaux élevés d'IL-6. Les études suggèrent que l'application du traitement par tocilizumab montre une amélioration de l'état des patients, en moyenne 15 jours après le début du traitement et entraîne une diminution de la mortalité [162].

En ce qui concerne la résistance aux médicaments des coronavirus, il existe très peu d'études disponibles qui traitent le sujet de manière approfondie [163]. Cependant, les études menées jusqu'à présent suggèrent l'association de la résistance aux médicaments aux mutations des protéines cibles des coronavirus [164, 165]. Il est nécessaire de mener d'autres études portant spécifiquement sur les mutations génétiques responsables de la résistance aux médicaments dans les maladies liées aux coronavirus [166]. La meilleure approche pour le développement de médicaments contre le SARS-CoV-2 pourrait être l'utilisation de médicaments disponibles sur le marché, validés par une filière bien définie de reconversion des médicaments [167–169]. Des médicaments récemment approuvés par la FDA (Food and Drug Administration), le glecaprevir et le maraviroc, ont été déclarés qu'ils pouvaient être utilisés comme inhibiteurs de la protéase principale du SARS-CoV-2 dans le cadre du traitement par COVID-19 [43]. Mais encore une fois, l'efficacité de tels médicaments chez les patients atteints de COVID-19 reste à déterminer.

Tableau VI : Liste des médicaments dont l'efficacité clinique a été démontrée dans le cadre du traitement du COVID-19. [49]

Drug	Target	Impact
Remdesivir	Broad-spectrum antiviral inhibits RdRP of RNA viruses, including SARS-CoV and MERS-CoV.	Adenosine analog, which incorporates into the nascent viral RNA chains during synthesis and causes premature termination.
Chloroquine	Anti-malarial drug. Works at entry and post-entry stages of viral infection.	Increases endosomal pH required for virus/cell fusion. Interferes with the glycosylation of cellular receptors of SARS-CoV2.
Fedratinib	JAK2 and FMS-like tyrosine kinase 3	Inhibition of JAK2 inhibits phosphorylation of STAT 3 and 5, which prevents cell division and induces apoptosis.
Lopinavir	Protease inhibitor have <i>in vitro</i> antiviral activity against SARS associated coronavirus	Inhibition of coronavirus main proteinase interferes in the processing of polypeptide translation products.
Oseltamivir	Neuraminidase inhibitor	Inhibits the neuraminidase activity of the virus subsequently prevents viral replication.
Fivipiravir	RNA-dependent RNA polymerase	A guanine analog inhibits the RdRP activity of several RNA viruses (influenza, Ebola, Yellow fever and Chikungunya)
Ribavirin	Nucleoside inhibitor An approved of HCV and RSV patients with SARS and MERS.	A nucleoside inhibitor that interferes with viral RNA synthesis and mRNA capping.
Galidesivir	RNA polymerase	Disrupts RNA polymerase activity causes premature termination of the elongating viral RNA strand
Nafamostat	Serine proteases inhibitor	Prevents membrane fusion by reducing the release of cathepsin B.
Lianhuaqingwen	Herbal medicine commonly used for the prevention and treatment of viral influenza in China.	Chinese patent herbal medicine composed of 13 different herbs played significant roles in the treatment of COVID-19.
Baricitinib	Janus kinase (JAK) inhibitor	May block viral entry by inhibiting adaptor-associated protein kinase 1 and cyclin G-associated kinase
Tocilizumab(mAB)	IL-6 inhibitor	Inhibition of IL-6 may attenuate pulmonary inflammation by controlling cytokine storm.
Anti TNF alpha agents	TNF alpha	TNF- α promotes the production of other chemokine and cytokines, controls endotoxin-induced septic shock

➤ **Prévention et vaccination**

Les connaissances acquises en matière d'immunité protectrice et de vaccinologie durant les épidémies de SARS-CoV et de MERS-CoV sont pertinentes pour décoder les principes de protection contre le SARS-CoV-2, qui leur est hautement apparenté.

Divers vaccins candidats ont été développés à la suite de l'émergence du SARS-CoV et du MERS-CoV. Des vecteurs viraux vivants atténués et à ADN ont été notamment étudiés [170–172]. Il y a eu d'importantes recherches précliniques et cliniques durant la conception d'un vaccin efficace contre le MERS-CoV. La mise en place d'un modèle animalier, ainsi que les progrès dans la conception de vecteurs et une meilleure connaissance de la pathogenèse de la maladie ont permis d'avoir des résultats concluants [172]. Un potentiel vaccin contre le MERS-CoV a pu réduire l'excrétion virale chez le dromadaire [172]. D'autre part, le développement de vaccins contre le SARS-CoV a commencé pendant l'épidémie, mais s'est atténué à mesure que la menace d'une pandémie majeure diminuait [173].

En ce qui concerne la pandémie de SARS-CoV-2, le développement de vaccins a été sans précédent : les vaccins à ARNm Pfizer-BioNTech et Moderna, les vaccins Astra Zeneca/Oxford ChadOx, les vaccins chinois inactivés Sinovac et anti-adénovirus russe Sputnik V ont largement été déployés dans plusieurs pays [174]. Diverses plates-formes ont été utilisées, y compris une sous-unité protéique associée à un adjuvant, des vecteurs viraux non réplicatifs, à ARN, à ADN, des particules pseudo-virales (Virus-Like-Particles ou VLP), des virus inactivés ou encore des virus vivants atténués [174, 175].

Il faut garder à l'esprit qu'un vaccin idéal est un vaccin qui peut être produit à grande échelle, à faible coût, sûr, facile à distribuer et à stocker, induit des réponses durables, fortes et protectrices d'anticorps et de lymphocytes T, idéalement avec une seule dose, et devant également convenir aux personnes très jeunes, âgées et immunodéprimées [176]. Il devrait également être techniquement modifiable pour s'adapter à l'amélioration de son efficacité contre les variantes émergentes.

VII. RT-PCR et ID-Now

En réponse au besoin urgent de tests diagnostiques à grande échelle pendant la pandémie de COVID-19, plusieurs tests moléculaires rapides ont récemment été approuvés par la FDA américaine, dont certains sont disponibles au point de service ou à proximité des patients. Cependant, très peu d'études ont été publiées à ce jour sur les performances relatives de ces dosages, en particulier pour des échantillons de patients représentant une large gamme de concentrations virales [177, 178].

Dans cette analyse comparative, le test ID-Now a montré une sensibilité globale de 79,22% et une spécificité de 100% en comparaison avec le test RT-PCR utilisé (Eurobioplex). Nos résultats sont en adéquation avec ceux retrouvés dans la littérature. En effet, des auteurs ont rapporté une sensibilité et une spécificité similaires de respectivement 78,7% et 100% [179]. Un autre travail a quant à lui rapporté une concordance positive globale de 73,9% entre le test ID now et le test Cobas [1]. Bien que le test d'amplification d'acide nucléique isotherme soit un outil prometteur, il s'est avéré avoir une sensibilité inférieure à celle de la RT-PCR pour la détection de l'ARN du SARS-CoV-2 [180]. La chimie moléculaire de l'amplification d'acide nucléique isotherme est plus complexe que celle de la RT-PCR, impliquant plus d'amorces et des réarrangements conformationnels complexes par déplacement enzymatique de brins, soulignant l'importance de la sélection des cibles et de la conception des amorces pour de bonnes performances.

Une autre explication possible est la performance potentiellement plus faible de la cible utilisée dans le test d'Abbott (RdRp) [181, 182]. Des rapports récents indiquent que des mutations dans le domaine RdRp sont apparues [183]. La région génomique ciblée par le test d'Abbott peut donc changer de manière significative à mesure que le virus se propage à travers le monde et que de nouveaux variants apparaissent.

D'autre part, notre travail a rapporté la faible sensibilité du test ID-Now concernant les prélèvements à Ct faible (>30) qui chute à 31,91%, alors qu'elle est de 100% concernant les prélèvements à Ct moyen ou élevé (<30). Plusieurs études ont en effet confirmé la faible sensibilité du test ID-Now concernant les prélèvements à charge virale faible [1, 179, 184]. Nos

résultats mettent en effet en évidence une limitation importante du test ID Now pour les résultats positifs de bas niveau.

Par ailleurs, et bien que la notice d'emballage d'Abbott ait déclaré que 0,5 à 3,0 ml de milieu de transport viral était acceptable pour une utilisation dans leur test, il est recommandé de minimiser la dilution de l'échantillon, car cela pourrait entraîner une diminution de la sensibilité du test. L'utilisation d'écouvillons secs a été recommandée par le fabricant pour des performances de test optimales. L'EUA pour le test ID-Now a même été récemment mis à jour pour supprimer l'indication des écouvillons dans les milieux de transport [185]. Les échantillons peuvent devenir trop dilués dans le VTM et les faibles niveaux positifs peuvent être alors faussement négatifs.

La notice d'emballage d'ID-Now indique également aux cliniciens de tester les écouvillons dès que possible après le prélèvement et, si cela n'est pas possible, de les conserver dans leur emballage d'origine pas plus de 2h avant le test ou de les réfrigérer jusqu'à 24h avant à tester. En dehors des laboratoires pour patients hospitalisés, comme dans les tests aux points de soins ambulatoires, une validation indépendante doit être effectuée pour évaluer les performances dans différents contextes, y compris les variables pré-analytiques.

Contrairement aux tests de routine, le test ID-Now offre des délais d'exécution plus courts dans les environnements proches du patient. Les tests moléculaires rapides offrent l'intervalle le plus court possible entre le prélèvement de l'échantillon et le résultat, ce qui peut faciliter une prise de décision clinique plus rapide (en 13 minutes ou moins). Cependant, la plateforme ID-Now ne peut analyser qu'un seul échantillon à la fois. Des préoccupations concernant les performances du test, la gestion de la qualité et la sécurité dans le POC (Point Of Care) existent également. La procédure de test nécessite plusieurs transferts et manipulations de cartouches, ce qui peut être difficile pour le personnel non familier ou habitué à adhérer aux techniques moléculaires. Les manipulations peuvent également entraîner une contamination de l'appareil et de l'environnement de fonctionnement. Le risque de contamination et de faux positifs est en effet plus élevé lorsque les tests sont effectués en dehors d'un environnement contrôlé et par du personnel de laboratoire non formé.

CONCLUSION

L'urgence de la pandémie de COVID-19 a imposé une responsabilité inhabituelle aux laboratoires cliniques de justifier la valeur clinique et les performances des tests liés au COVID qu'ils introduisent. Des tests de diagnostic précis et l'isolement ultérieur des personnes infectées sont essentiels pour atténuer la transmission continue. L'attrait de la technologie Abbott découle de l'intention de fournir des résultats rapides et précis.

Sur la base des résultats, l>ID-Now a une certaine utilité en tant que test de règle rapide pour COVID-19 avec des échantillons à charge virale élevée; cependant, la prudence de son utilisation est de mise comme test d'exclusion singulier, en particulier dans le cadre d'échantillons avec des charges virales plus faibles. Actuellement, il n'est pas possible de supposer que les patients ayant une faible charge virale sont incapables de transmettre le virus, car un faux négatif peut affecter de manière significative la prise de décision clinique et épidémiologique ultérieure.

Cette étude met en évidence une limitation importante de l>ID Now pour les échantillons prélevés dans des milieux de transport viraux ou universels à faibles concentrations virales. D'autres études sont donc nécessaires pour évaluer les performances d>ID-Now pour la collecte directe.

RESUMES

Résumé

Titre : Etude de performance de la méthode Abbott ID-Now par rapport à la méthode multiplex Eurobiolplex SARS-CoV-2 pour la détection de SARS-CoV-2 à partir des échantillons nasopharyngés

Auteur : ZOUAOUI Amal

Mots clés: Abbott ID-Now. COVID-19. SRAS-CoV-2. Écouvillons nasopharyngés. Diagnostic moléculaire. RT-PCR.

Introduction : Le virus SARS-CoV-2 est apparu à Wuhan en décembre 2019 en chine, et depuis, il s'est rapidement répandu dans le monde entier. Ceci a été à l'origine des millions de contaminations et des milliers de décès à travers le monde. L'initiative visant à étendre et à accélérer les tests a allégé l'examen minutieux auquel sont normalement soumis les nouveaux tests avant leur mise sur le marché. Cela oblige les laboratoires cliniques à évaluer plus soigneusement les performances globales des diverses plates-formes d'essai qui se développent rapidement avant leur mise en œuvre.

Notre étude a pour objectif d'évaluer la performance du test moléculaire rapide ID-NOW pour la détection du SARS-COV-2 en comparaison avec la méthode de référence RT-PCR.

Matériels et méthodes : Il s'agit d'une étude prospective réalisée sur 224 échantillons des patients en consultation externe, hospitalisés ou du service d'urgence. Les prélèvements effectués étaient des écouvillons nasopharyngés reçus dans un milieu de transport universel VIRCELL. Chaque échantillon a été traité de façon concomitante par les 2 méthodes objet de cette étude : Méthode de référence RT-PCR et le Test moléculaire rapide ID-Now COVID-19.

Résultats : Notre étude a porté sur 224 échantillons dont 154 se sont avérés positifs et 70 négatifs à la RT-PCR (méthode de référence). La totalité des prélèvements négatifs par la RT-PCR étaient aussi négatifs par ID-NOW. Cependant, parmi les 154 prélèvements qui étaient positifs à la RT-PCR, 32 prélèvements se sont révélés négatifs par ID-Now. La sensibilité globale du test ID-Now était de 79,22% et sa spécificité globale de 100%. Sa valeur prédictive positive était de 79,22% et sa valeur prédictive négative de 68,63%. La sensibilité du test ID-Now était de 31,91% pour les échantillons dont le Ct est faible, 100% pour les échantillons dont le Ct est moyen et 100% pour les échantillons dont les Ct est élevé.

Conclusion : Cette étude met en évidence une limite importante de l'ID Now dans le cas des échantillons à faibles concentrations virales.

Abstract

Title : Performance study of the Abbott ID-Now method compared to the EurobioIplex SARS-CoV-2 multiplex method for the detection of SARS-CoV-2 from nasopharyngeal samples

Author : ZOUAOUI Amal

Keywords : Abbott ID-Now. COVID-19. SARS-CoV-2. Nasopharyngeal swabs. Molecular Diagnostics. RT-PCR.

Introduction: The SARS-CoV-2 virus emerged in Wuhan in December 2019 in China, and has since spread rapidly around the world. This has been the cause of millions of contaminations and thousands of deaths around the world. The initiative to expand and accelerate testing has eased the scrutiny that new tests normally undergo before they are released to market. This forces clinical laboratories to more carefully evaluate the overall performance of the various rapidly developing test platforms before they are implemented.

Our study aims to evaluate the performance of the rapid molecular test ID-Now for the detection of SARS-COV-2 in comparison with the reference method RT-PCR.

Material and methods: It is a prospective study performed on 224 samples from patients in external consults, hospitalized or from the emergency ward. The samples taken were nasopharyngeal swabs received in a VIRCELL universal transport medium. Each sample was treated concomitantly with the 2 methods covered by this study: RT-PCR reference method and the ID-Now COVID-19 rapid molecular test.

Results: Our study involved 224 samples, of which 154 proved positive and 70 negative by RT-PCR (reference method). All samples negative by RT-PCR were also negative by ID-NOW. However, of the 154 samples that were positive by RT-PCR, 32 samples were negative by ID-Now. The overall sensitivity of the ID-Now test was 79.22% and its overall specificity 100%. Its positive predictive value was 79.22% and its negative predictive value was 68.63%. The sensitivity of the ID-Now assay was 31.91% for samples with low Ct, 100% for samples with medium Ct, and 100% for samples with high Ct.

Conclusion: This study highlights an important limitation of the ID-Now test in the case of samples with low viral concentrations.

ملخص

العنوان: دراسة أداء طريقة Abbott ID-Now مقارنة بالطريقة المتعددة الإرسال Eurobiolplex

SARS-CoV-2 للكشف عن SARS-CoV-2 من عينات البلعوم الأنفي

الكاتب: الزواوي امال

الكلمات الدالة: Abbott ID-Now. كوفيد-19. السارس-CoV-2. مسحات البلعوم الأنفي. التشخيص

الجزئي. RT-PCR.

مقدمة: ظهر فيروس SARS-CoV-2 في ووهان في ديسمبر 2019 في الصين، وانتشر بسرعة في جميع أنحاء العالم. منذ ذلك الحين. كان هذا سبب ملايين الإصابات وآلاف الوفيات حول العالم. خففت مبادرة توسيع وتسريع الاختبار من التدقيق الذي تخضع له الاختبارات الجديدة عادة قبل طرحها في السوق. وهذا يفرض على المختبرات السريرية إجراء تقييم أكثر دقة للأداء العام لمختلف منصات الاختبار سريعة التطور قبل تنفيذها.

تهدف دراستنا إلى تقييم أداء الاختبار الجزئي السريع ID-NOW للكشف عن SARS-COV-2

مقارنة بالطريقة المرجعية RT-PCR.

المواد والأساليب: هذه دراسة استباقية أجريت على 224 عينة من مرضى العيادات الخارجية أو المستشفى أو قسم الطوارئ. كانت العينات المأخوذة عبارة عن مسحات من البلعوم الأنفي تم استلامها في وسيلة نقل عالمية من VIRCELL. تمت معالجة كل عينة في أن واحد بالطريقتين اللتين شملتهما هذه

الدراسة: الطريقة المرجعية RT-PCR والاختبار الجزئي السريع ID-Now COVID-19.

النتائج: تضمنت دراستنا 224 عينة أثبتت 154 منها إيجابية و 70 سلبية بواسطة RT-PCR (الطريقة

المرجعية). كانت جميع العينات السلبية بواسطة RT-PCR سلبية أيضا بواسطة ID-Now. بينما، من

بين 154 عينة كانت إيجابية بواسطة RT-PCR، كانت 32 عينة سلبية بواسطة ID-Now. كانت

الحساسية الإجمالية لاختبار ID-Now 79.22% وخصوصياته الإجمالية 100%. بلغت قيمته التنبؤية

الإيجابية 79.22% وقيمته التنبؤية السلبية 68.63%. كانت حساسية اختبار ID-Now 31.91% للعينات

ذات Ct المنخفض، و100% للعينات ذات Ct المتوسط، و100% للعينات ذات Ct المرتفع.

خاتمة: تسلط هذه الدراسة الضوء على أوجه قصور مهمة لـ ID Now في حالة العينات ذات التركيزات

الفيروسية المنخفضة.

RÉFÉRENCES

- [1] Smithgall MC, Scherberkova I, Whittier S, et al. Comparison of Cepheid Xpert Xpress and Abbott ID Now to Roche cobas for the Rapid Detection of SARS-CoV-2. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol* 2020; 128: 104428.
- [2] Lu R, Zhao X, Li J, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet Lond Engl* 2020; 395: 565–574.
- [3] Guo Y-R, Cao Q-D, Hong Z-S, et al. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak – an update on the status. *Mil Med Res* 2020; 7: 11.
- [4] Lamers MM, Beumer J, van der Vaart J, et al. SARS-CoV-2 productively infects human gut enterocytes. *Science* 2020; 369: 50–54.
- [5] Dong L, Tian J, He S, et al. Possible Vertical Transmission of SARS-CoV-2 From an Infected Mother to Her Newborn. *JAMA* 2020; 323: 1846–1848.
- [6] Christian MD, Poutanen SM, Loutfy MR, et al. Severe acute respiratory syndrome. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2004; 38: 1420–1427.
- [7] Riou J, Althaus CL. Pattern of early human-to-human transmission of Wuhan 2019 novel coronavirus (2019-nCoV), December 2019 to January 2020. *Eurosurveillance* 2020; 25: 2000058.
- [8] Liu Y, Gayle AA, Wilder-Smith A, et al. The reproductive number of COVID-19 is higher compared to SARS coronavirus. *J Travel Med*; 27. Epub ahead of print 13 March 2020. DOI: 10.1093/jtm/taaa021.
- [9] Chan JF-W, Yuan S, Kok K-H, et al. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *Lancet Lond Engl* 2020; 395: 514–523.
- [10] Zhu N, Zhang D, Wang W, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med* 2020; 382: 727–733.
- [11] Yin Y, Wunderink RG. MERS, SARS and other coronaviruses as causes of pneumonia. *Respirol Carlton Vic* 2018; 23: 130–137.
- [12] Zhou P, Yang X-L, Wang X-G, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 2020; 579: 270–273.
- [13] Tang D, Comish P, Kang R. The hallmarks of COVID-19 disease. *PLOS Pathog* 2020; 16: e1008536.

- [14] Sallard E, Halloy J, Casane D, et al. Retrouver les origines du SARS-CoV-2 dans les phylogénies de coronavirus. *médecine/sciences* 2020; 36: 783–796.
- [15] Giovanetti M, Benvenuto D, Angeletti S, et al. The first two cases of 2019-nCoV in Italy: Where they come from? *J Med Virol* 2020; 92: 518–521.
- [16] Paraskevis D, Kostaki EG, Magiorkinis G, et al. Full-genome evolutionary analysis of the novel corona virus (2019-nCoV) rejects the hypothesis of emergence as a result of a recent recombination event. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis* 2020; 79: 104212.
- [17] Hampton T. Bats may be SARS reservoir. *JAMA* 2005; 294: 2291.
- [18] Banerjee A, Kulcsar K, Misra V, et al. Bats and Coronaviruses. *Viruses* 2019; 11: E41.
- [19] Li W, Shi Z, Yu M, et al. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science* 2005; 310: 676–679.
- [20] Wu A, Peng Y, Huang B, et al. Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-nCoV) Originating in China. *Cell Host Microbe* 2020; 27: 325–328.
- [21] Wu F, Zhao S, Yu B, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* 2020; 579: 265–269.
- [22] Guan W, Ni Z, Hu Y, et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N Engl J Med*. Epub ahead of print 28 February 2020. DOI: 10.1056/NEJMoa2002032.
- [23] Andersen KG, Rambaut A, Lipkin WI, et al. The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nat Med* 2020; 26: 450–452.
- [24] Chowell G, Abdirizak F, Lee S, et al. Transmission characteristics of MERS and SARS in the healthcare setting: a comparative study. *BMC Med* 2015; 13: 210.
- [25] Kang CK, Song KH, Choe PG, et al. Clinical and Epidemiologic Characteristics of Spreaders of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus during the 2015 Outbreak in Korea. *J Korean Med Sci* 2017; 32: 744–749.
- [26] Ye Z-W, Yuan S, Yuen K-S, et al. Zoonotic origins of human coronaviruses. *Int J Biol Sci* 2020; 16: 1686–1697.
- [27] Fehr AR, Perlman S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 2015; 1282: 1–23.
- [28] Lescure F-X, Bouadma L, Nguyen D, et al. Clinical and virological data of the first cases of COVID-19 in Europe: a case series. *Lancet Infect Dis* 2020; 20: 697–706.

- [29] Wölfel R, Corman VM, Guggemos W, et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature* 2020; 581: 465–469.
- [30] van Doremalen N, Bushmaker T, Morris DH, et al. Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. *N Engl J Med* 2020; 382: 1564–1567.
- [31] Wang W, Xu Y, Gao R, et al. Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. *JAMA* 2020; 323: 1843–1844.
- [32] Zheng S, Fan J, Yu F, et al. Viral load dynamics and disease severity in patients infected with SARS-CoV-2 in Zhejiang province, China, January–March 2020: retrospective cohort study. *BMJ* 2020; 369: m1443.
- [33] de Wit E, van Doremalen N, Falzarano D, et al. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. *Nat Rev Microbiol* 2016; 14: 523–534.
- [34] Lu R, Wang Y, Wang W, et al. Complete Genome Sequence of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) from the First Imported MERS-CoV Case in China. *Genome Announc* 2015; 3: e00818-15.
- [35] Rota PA, Oberste MS, Monroe SS, et al. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science* 2003; 300: 1394–1399.
- [36] Cui J, Li F, Shi Z-L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol* 2019; 17: 181–192.
- [37] Santos I de A, Grosche VR, Bergamini FRG, et al. Antivirals Against Coronaviruses: Candidate Drugs for SARS-CoV-2 Treatment? *Front Microbiol* 2020; 11: 1818.
- [38] Lefeuvre C, Przyrowski É, Apaire-Marchais V. Aspects virologiques et diagnostic du coronavirus Sars-CoV-2. *Actual Pharm* 2020; 59: 18–23.
- [39] Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* 2020; 181: 271-280.e8.
- [40] Zhang H, Penninger JM, Li Y, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) as a SARS-CoV-2 receptor: molecular mechanisms and potential therapeutic target. *Intensive Care Med* 2020; 46: 586–590.
- [41] Ton A-T, Gentile F, Hsing M, et al. Rapid Identification of Potential Inhibitors of SARS-CoV-2 Main Protease by Deep Docking of 1.3 Billion Compounds. *Mol Inform* 2020; 39: e2000028.
- [42] Zhang L, Lin D, Sun X, et al. Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease provides a basis for design of improved α -ketoamide inhibitors. *Science* 2020; 368: 409–412.

- [43] Shamsi A, Mohammad T, Anwar S, et al. Glecaprevir and Maraviroc are high-affinity inhibitors of SARS-CoV-2 main protease: possible implication in COVID-19 therapy. *Biosci Rep* 2020; 40: BSR20201256.
- [44] Graham RL, Sparks JS, Eckerle LD, et al. SARS coronavirus replicase proteins in pathogenesis. *Virus Res* 2008; 133: 88–100.
- [45] Shang J, Ye G, Shi K, et al. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nature* 2020; 581: 221–224.
- [46] Tong TR. Drug targets in severe acute respiratory syndrome (SARS) virus and other coronavirus infections. *Infect Disord Drug Targets* 2009; 9: 223–245.
- [47] Wrapp D, Wang N, Corbett KS, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science* 2020; 367: 1260–1263.
- [48] Suzuki T, Otake Y, Uchimoto S, et al. Genomic Characterization and Phylogenetic Classification of Bovine Coronaviruses Through Whole Genome Sequence Analysis. *Viruses* 2020; 12: E183.
- [49] Naqvi AAT, Fatima K, Mohammad T, et al. Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2020; 1866: 165878.
- [50] Morse JS, Lalonde T, Xu S, et al. Learning from the Past: Possible Urgent Prevention and Treatment Options for Severe Acute Respiratory Infections Caused by 2019-nCoV. *ChemBiochem Eur J Chem Biol* 2020; 21: 730–738.
- [51] Zhang Y-Z, Holmes EC. A Genomic Perspective on the Origin and Emergence of SARS-CoV-2. *Cell* 2020; 181: 223–227.
- [52] Guan Y, Zheng BJ, He YQ, et al. Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. *Science* 2003; 302: 276–278.
- [53] Lau SKP, Woo PCY, Li KSM, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 14040–14045.
- [54] Zhang T, Wu Q, Zhang Z. Probable Pangolin Origin of SARS-CoV-2 Associated with the COVID-19 Outbreak. *Curr Biol CB* 2020; 30: 1578.
- [55] Sit THC, Brackman CJ, Ip SM, et al. Infection of dogs with SARS-CoV-2. *Nature* 2020; 586: 776–778.
- [56] Angeletti S, Benvenuto D, Bianchi M, et al. COVID-2019: The role of the nsp2 and nsp3 in its pathogenesis. *J Med Virol* 2020; 92: 584–588.

- [57] Zhang L, Shen F, Chen F, et al. Origin and Evolution of the 2019 Novel Coronavirus. *Clin Infect Dis* 2020; 71: 882–883.
- [58] Wu D, Zou S, Bai T, et al. Poultry farms as a source of avian influenza A (H7N9) virus reassortment and human infection. *Sci Rep* 2015; 5: 7630.
- [59] Tang X, Wu C, Li X, et al. On the origin and continuing evolution of SARS-CoV-2. *Natl Sci Rev* 2020; 7: 1012–1023.
- [60] Xue B, Blocquel D, Habchi J, et al. Structural disorder in viral proteins. *Chem Rev* 2014; 114: 6880–6911.
- [61] Tang C, Deng Z, Li X, et al. Helicase of Type 2 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Strain HV Reveals a Unique Structure. *Viruses* 2020; 12: E215.
- [62] Müller C, Schulte FW, Lange-Grünweller K, et al. Broad-spectrum antiviral activity of the eIF4A inhibitor silvestrol against corona- and picornaviruses. *Antiviral Res* 2018; 150: 123–129.
- [63] J Alsaadi EA, Jones IM. Membrane binding proteins of coronaviruses. *Future Virol* 2019; 14: 275–286.
- [64] Astuti I, Ysrafil. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): An overview of viral structure and host response. *Diabetes Metab Syndr* 2020; 14: 407–412.
- [65] Minakshi R, Padhan K, Rehman S, et al. The SARS Coronavirus 3a protein binds calcium in its cytoplasmic domain. *Virus Res* 2014; 191: 180–183.
- [66] Du L, He Y, Zhou Y, et al. The spike protein of SARS-CoV — a target for vaccine and therapeutic development. *Nat Rev Microbiol* 2009; 7: 226–236.
- [67] Lan J, Ge J, Yu J, et al. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature* 2020; 581: 215–220.
- [68] Walls AC, Park Y-J, Tortorici MA, et al. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell* 2020; 181: 281-292.e6.
- [69] Chan JF-W, Yip CC-Y, To KK-W, et al. Improved Molecular Diagnosis of COVID-19 by the Novel, Highly Sensitive and Specific COVID-19-RdRp/HeI Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay Validated In Vitro and with Clinical Specimens. *J Clin Microbiol* 2020; 58: e00310-20.
- [70] Yan R, Zhang Y, Li Y, et al. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science* 2020; 367: 1444–1448.

- [71] Xia S, Yan L, Xu W, et al. A pan-coronavirus fusion inhibitor targeting the HR1 domain of human coronavirus spike. *Sci Adv* 2019; 5: eaav4580.
- [72] Xu J, Zhao S, Teng T, et al. Systematic Comparison of Two Animal-to-Human Transmitted Human Coronaviruses: SARS-CoV-2 and SARS-CoV. *Viruses* 2020; 12: E244.
- [73] Qing E, Gallagher T. SARS Coronavirus Redux. *Trends Immunol* 2020; 41: 271–273.
- [74] van Dinten LC, van Tol H, Gorbalenya AE, et al. The predicted metal-binding region of the arterivirus helicase protein is involved in subgenomic mRNA synthesis, genome replication, and virion biogenesis. *J Virol* 2000; 74: 5213–5223.
- [75] Tang T, Bidon M, Jaimes JA, et al. Coronavirus membrane fusion mechanism offers a potential target for antiviral development. *Antiviral Res* 2020; 178: 104792.
- [76] Neuman BW, Buchmeier MJ. Supramolecular Architecture of the Coronavirus Particle. *Adv Virus Res* 2016; 96: 1–27.
- [77] Cong Y, Ulasli M, Schepers H, et al. Nucleocapsid Protein Recruitment to Replication-Transcription Complexes Plays a Crucial Role in Coronaviral Life Cycle. *J Virol* 2020; 94: e01925-19.
- [78] Ruan Z, Liu C, Guo Y, et al. SARS-CoV-2 and SARS-CoV: Virtual screening of potential inhibitors targeting RNA-dependent RNA polymerase activity (NSP12). *J Med Virol* 2021; 93: 389–400.
- [79] Jia HP, Look DC, Shi L, et al. ACE2 receptor expression and severe acute respiratory syndrome coronavirus infection depend on differentiation of human airway epithelia. *J Virol* 2005; 79: 14614–14621.
- [80] Wan Y, Shang J, Graham R, et al. Receptor Recognition by the Novel Coronavirus from Wuhan: an Analysis Based on Decade-Long Structural Studies of SARS Coronavirus. *J Virol*; 94: e00127-20.
- [81] Tortorici MA, Veerler D. Structural insights into coronavirus entry. *Adv Virus Res* 2019; 105: 93–116.
- [82] Zhang N, Jiang S, Du L. Current advancements and potential strategies in the development of MERS-CoV vaccines. *Expert Rev Vaccines* 2014; 13: 761–774.
- [83] Xia S, Zhu Y, Liu M, et al. Fusion mechanism of 2019-nCoV and fusion inhibitors targeting HR1 domain in spike protein. *Cell Mol Immunol* 2020; 17: 765–767.

- [84] Yu F, Du L, Ojcius DM, et al. Measures for diagnosing and treating infections by a novel coronavirus responsible for a pneumonia outbreak originating in Wuhan, China. *Microbes Infect* 2020; 22: 74–79.
- [85] de Wilde AH, Snijder EJ, Kikkert M, et al. Host Factors in Coronavirus Replication. *Curr Top Microbiol Immunol* 2018; 419: 1–42.
- [86] Sawicki SG, Sawicki DL. Coronavirus transcription: a perspective. *Curr Top Microbiol Immunol* 2005; 287: 31–55.
- [87] Hussain S, Pan J, Chen Y, et al. Identification of novel subgenomic RNAs and noncanonical transcription initiation signals of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Virol* 2005; 79: 5288–5295.
- [88] Perrier A, Bonnin A, Desmarests L, et al. The C-terminal domain of the MERS coronavirus M protein contains a trans-Golgi network localization signal. *J Biol Chem* 2019; 294: 14406–14421.
- [89] Letko M, Marzi A, Munster V. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nat Microbiol* 2020; 5: 562–569.
- [90] Song W, Gui M, Wang X, et al. Cryo-EM structure of the SARS coronavirus spike glycoprotein in complex with its host cell receptor ACE2. *PLoS Pathog* 2018; 14: e1007236.
- [91] Millet JK, Whittaker GR. Host cell proteases: Critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis. *Virus Res* 2015; 202: 120–134.
- [92] Simmons G, Gosalia DN, Rennekamp AJ, et al. Inhibitors of cathepsin L prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus entry. *Proc Natl Acad Sci* 2005; 102: 11876–11881.
- [93] Xu H, Zhong L, Deng J, et al. High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. *Int J Oral Sci* 2020; 12: 8.
- [94] Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, et al. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001; 413: 732–738.
- [95] Wu J, Chen ZJ. Innate immune sensing and signaling of cytosolic nucleic acids. *Annu Rev Immunol* 2014; 32: 461–488.
- [96] Yoo J-S, Kato H, Fujita T. Sensing viral invasion by RIG-I like receptors. *Curr Opin Microbiol* 2014; 20: 131–138.

- [97] Wu J, Sun L, Chen X, et al. Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. *Science* 2013; 339: 826–830.
- [98] Seth RB, Sun L, Ea C-K, et al. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* 2005; 122: 669–682.
- [99] Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010; 11: 373–384.
- [100] Ishikawa H, Barber GN. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature* 2008; 455: 674–678.
- [101] Takeuchi O, Akira S. Innate immunity to virus infection. *Immunol Rev* 2009; 227: 75–86.
- [102] Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet Lond Engl* 2020; 395: 497–506.
- [103] Chen C, Zhang XR, Ju ZY, et al. [Advances in the research of mechanism and related immunotherapy on the cytokine storm induced by coronavirus disease 2019]. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi Zhonghua Shaoshang Zazhi Chin J Burns* 2020; 36: 471–475.
- [104] Liu Y, Yang Y, Zhang C, et al. Clinical and biochemical indexes from 2019-nCoV infected patients linked to viral loads and lung injury. *Sci China Life Sci* 2020; 63: 364–374.
- [105] Liu Q, Wang RS, Qu GQ, et al. Gross examination report of a COVID-19 death autopsy. *Fa Yi Xue Za Zhi* 2020; 36: 21–23.
- [106] Li Q, Guan X, Wu P, et al. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus-Infected Pneumonia. *N Engl J Med*. Epub ahead of print 29 January 2020. DOI: 10.1056/NEJMoa2001316.
- [107] Lee P-I, Hsueh P-R. Emerging threats from zoonotic coronaviruses-from SARS and MERS to 2019-nCoV. *J Microbiol Immunol Infect* 2020; 53: 365–367.
- [108] Zhang W, Du R-H, Li B, et al. Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patients: implication of multiple shedding routes. *Emerg Microbes Infect* 2020; 9: 386–389.
- [109] Hamming I, Timens W, Bulthuis M, et al. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *J Pathol* 2004; 203: 631–637.

- [110] Sohrabi C, Alsafi Z, O'Neill N, et al. World Health Organization declares global emergency: A review of the 2019 novel coronavirus (COVID-19). *Int J Surg Lond Engl* 2020; 76: 71–76.
- [111] Jin Y-H, Cai L, Cheng Z-S, et al. A rapid advice guideline for the diagnosis and treatment of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) infected pneumonia (standard version). *Mil Med Res* 2020; 7: 4.
- [112] Wang D, Hu B, Hu C, et al. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus–Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA* 2020; 323: 1061–1069.
- [113] Poutanen SM, Low DE, Henry B, et al. Identification of severe acute respiratory syndrome in Canada. *N Engl J Med* 2003; 348: 1995–2005.
- [114] Lu H, Stratton CW, Tang Y-W. Outbreak of pneumonia of unknown etiology in Wuhan, China: The mystery and the miracle. *J Med Virol* 2020; 92: 401–402.
- [115] Byambasuren O, Cardona M, Bell KJL, et al. Estimating the extent of true asymptomatic COVID-19 and its potential for community transmission: systematic review and meta-analysis. Epub ahead of print 15 May 2020. DOI: 10.1101/2020.05.10.20097543.
- [116] Chen N, Zhou M, Dong X, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *The Lancet* 2020; 395: 507–513.
- [117] Lee N, Hui D, Wu A, et al. A major outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *N Engl J Med* 2003; 348: 1986–1994.
- [118] Assiri A, Al-Tawfiq JA, Al-Rabeeh AA, et al. Epidemiological, demographic, and clinical characteristics of 47 cases of Middle East respiratory syndrome coronavirus disease from Saudi Arabia: a descriptive study. *Lancet Infect Dis* 2013; 13: 752–761.
- [119] Wang H, Xiao X, Lu J, et al. Factors associated with clinical outcome in 25 patients with avian influenza A (H7N9) infection in Guangzhou, China. *BMC Infect Dis* 2016; 16: 534.
- [120] Pascarella G, Strumia A, Piliago C, et al. COVID-19 diagnosis and management: a comprehensive review. *J Intern Med* 2020; 288: 192–206.
- [121] Liu K, Fang Y-Y, Deng Y, et al. Clinical characteristics of novel coronavirus cases in tertiary hospitals in Hubei Province. *Chin Med J (Engl)* 2020; 133: 1025–1031.
- [122] Mahieu R, Dubée V. Caractéristiques cliniques et épidémiologiques de la Covid-19. *Actual Pharm* 2020; 59: 24–26.

- [123] Wang W, Tang J, Wei F. Updated understanding of the outbreak of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in Wuhan, China. *J Med Virol* 2020; 92: 441–447.
- [124] Yang X, Yu Y, Xu J, et al. Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study. *Lancet Respir Med* 2020; 8: 475–481.
- [125] Gao H-N, Lu H-Z, Cao B, et al. Clinical findings in 111 cases of influenza A (H7N9) virus infection. *N Engl J Med* 2013; 368: 2277–2285.
- [126] Wang J, Qi H, Bao L, et al. A contingency plan for the management of the 2019 novel coronavirus outbreak in neonatal intensive care units. *Lancet Child Adolesc Health* 2020; 4: 258–259.
- [127] Gao W, Tamin A, Soloff A, et al. Effects of a SARS-associated coronavirus vaccine in monkeys. *Lancet Lond Engl* 2003; 362: 1895–1896.
- [128] Zumla A, Chan JFW, Azhar EI, et al. Coronaviruses - drug discovery and therapeutic options. *Nat Rev Drug Discov* 2016; 15: 327–347.
- [129] Gao Y, Yan L, Huang Y, et al. Structure of the RNA-dependent RNA polymerase from COVID-19 virus. *Science* 2020; 368: 779–782.
- [130] Wang M, Cao R, Zhang L, et al. Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. *Cell Res* 2020; 30: 269–271.
- [131] Tan J, Verschueren KHG, Anand K, et al. pH-dependent conformational flexibility of the SARS-CoV main proteinase (M(pro)) dimer: molecular dynamics simulations and multiple X-ray structure analyses. *J Mol Biol* 2005; 354: 25–40.
- [132] Wang Y, Zhang D, Du G, et al. Remdesivir in adults with severe COVID-19: a randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial. *Lancet Lond Engl* 2020; 395: 1569–1578.
- [133] Schlagenhauf P, Grobusch MP, Maier JD, et al. Repurposing antimalarials and other drugs for COVID-19. *Travel Med Infect Dis* 2020; 34: 101658.
- [134] Huang M, Tang T, Pang P, et al. Treating COVID-19 with Chloroquine. *J Mol Cell Biol* 2020; 12: 322–325.
- [135] Hong W. Combating COVID-19 with Chloroquine. *J Mol Cell Biol* 2020; 12: 249–250.
- [136] Gao J, Tian Z, Yang X. Breakthrough: Chloroquine phosphate has shown apparent efficacy in treatment of COVID-19 associated pneumonia in clinical studies. *Biosci Trends* 2020; 14: 72–73.

- [137] Fung TS, Liu DX. Coronavirus infection, ER stress, apoptosis and innate immunity. *Front Microbiol* 2014; 5: 296.
- [138] Greene CM, Hiemstra PS. Innate Immunity of the Lung. *J Innate Immun* 2020; 12: 1–3.
- [139] Liu J, Cao R, Xu M, et al. Hydroxychloroquine, a less toxic derivative of chloroquine, is effective in inhibiting SARS-CoV-2 infection in vitro. *Cell Discov* 2020; 6: 16.
- [140] FitzGerald GA. Misguided drug advice for COVID-19. *Science* 2020; 367: 1434.
- [141] Grein J, Ohmagari N, Shin D, et al. Compassionate Use of Remdesivir for Patients with Severe Covid-19. *N Engl J Med* 2020; 382: 2327–2336.
- [142] Cao X. COVID-19: immunopathology and its implications for therapy. *Nat Rev Immunol* 2020; 20: 269–270.
- [143] Xu X, Han M, Li T, et al. Effective treatment of severe COVID-19 patients with tocilizumab. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2020; 117: 10970–10975.
- [144] Golchin A, Seyedjafari E, Ardeshirylajimi A. Mesenchymal Stem Cell Therapy for COVID-19: Present or Future. *Stem Cell Rev Rep* 2020; 16: 427–433.
- [145] Shen C, Wang Z, Zhao F, et al. Treatment of 5 Critically Ill Patients With COVID-19 With Convalescent Plasma. *JAMA* 2020; 323: 1582–1589.
- [146] Chen L, Xiong J, Bao L, et al. Convalescent plasma as a potential therapy for COVID-19. *Lancet Infect Dis* 2020; 20: 398–400.
- [147] Duan YJ, Liu Q, Zhao SQ, et al. Trial of Chloroquines in the Treatment of COVID-19 and Its Research Progress in Forensic Toxicology. *Fa Yi Xue Za Zhi* 2020; 36: 157–163.
- [148] Bhatnagar T, Murhekar MV, Soneja M, et al. Lopinavir/ritonavir combination therapy amongst symptomatic coronavirus disease 2019 patients in India: Protocol for restricted public health emergency use. *Indian J Med Res* 2020; 151: 184–189.
- [149] Day M. Covid-19: European drugs agency to review safety of ibuprofen. *BMJ* 2020; 368: m1168.
- [150] Atluri S, Manchikanti L, Hirsch JA. Expanded Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells (UC-MSCs) as a Therapeutic Strategy in Managing Critically Ill COVID-19 Patients: The Case for Compassionate Use. *Pain Physician* 2020; 23: E71–E83.
- [151] Ekins S, Lane TR, Madrid PB. Tilorone: a Broad-Spectrum Antiviral Invented in the USA and Commercialized in Russia and beyond. *Pharm Res* 2020; 37: 71.

- [152] Gurwitz D. Angiotensin receptor blockers as tentative SARS-CoV-2 therapeutics. *Drug Dev Res* 2020; 81: 537–540.
- [153] Jawhara S. Could Intravenous Immunoglobulin Collected from Recovered Coronavirus Patients Protect against COVID-19 and Strengthen the Immune System of New Patients? *Int J Mol Sci* 2020; 21: E2272.
- [154] Capuano A, Scavone C, Racagni G, et al. NSAIDs in patients with viral infections, including Covid-19: Victims or perpetrators? *Pharmacol Res* 2020; 157: 104849.
- [155] Omrani AS, Saad MM, Baig K, et al. Ribavirin and interferon alfa-2a for severe Middle East respiratory syndrome coronavirus infection: a retrospective cohort study. *Lancet Infect Dis* 2014; 14: 1090–1095.
- [156] Sheahan TP, Sims AC, Leist SR, et al. Comparative therapeutic efficacy of remdesivir and combination lopinavir, ritonavir, and interferon beta against MERS-CoV. *Nat Commun* 2020; 11: 222.
- [157] Elfiky AA. Ribavirin, Remdesivir, Sofosbuvir, Galidesivir, and Tenofovir against SARS-CoV-2 RNA dependent RNA polymerase (RdRp): A molecular docking study. *Life Sci* 2020; 253: 117592.
- [158] Cruz FF, Rocco PRM. The potential of mesenchymal stem cell therapy for chronic lung disease. *Expert Rev Respir Med* 2020; 14: 31–39.
- [159] Leng Z, Zhu R, Hou W, et al. Transplantation of ACE2- Mesenchymal Stem Cells Improves the Outcome of Patients with COVID-19 Pneumonia. *Aging Dis* 2020; 11: 216–228.
- [160] Duan K, Liu B, Li C, et al. Effectiveness of convalescent plasma therapy in severe COVID-19 patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2020; 117: 9490–9496.
- [161] Zhang C, Wu Z, Li J-W, et al. Cytokine release syndrome in severe COVID-19: interleukin-6 receptor antagonist tocilizumab may be the key to reduce mortality. *Int J Antimicrob Agents* 2020; 55: 105954.
- [162] Luo P, Liu Y, Qiu L, et al. Tocilizumab treatment in COVID-19: A single center experience. *J Med Virol* 2020; 92: 814–818.
- [163] Sexton NR, Smith EC, Blanc H, et al. Homology-Based Identification of a Mutation in the Coronavirus RNA-Dependent RNA Polymerase That Confers Resistance to Multiple Mutagens. *J Virol* 2016; 90: 7415–7428.
- [164] Wang X-W, Li J-S, Jin M, et al. Study on the resistance of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus. *J Virol Methods* 2005; 126: 171–177.

- [165] Deng X, StJohn SE, Osswald HL, et al. Coronaviruses resistant to a 3C-like protease inhibitor are attenuated for replication and pathogenesis, revealing a low genetic barrier but high fitness cost of resistance. *J Virol* 2014; 88: 11886–11898.
- [166] Kleine-Weber H, Elzayat MT, Wang L, et al. Mutations in the Spike Protein of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Transmitted in Korea Increase Resistance to Antibody-Mediated Neutralization. *J Virol* 2019; 93: e01381-18.
- [167] Wu C, Liu Y, Yang Y, et al. Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods. *Acta Pharm Sin B* 2020; 10: 766–788.
- [168] Fan H-H, Wang L-Q, Liu W-L, et al. Repurposing of clinically approved drugs for treatment of coronavirus disease 2019 in a 2019-novel coronavirus-related coronavirus model. *Chin Med J (Engl)* 2020; 133: 1051–1056.
- [169] Mercorelli B, Palù G, Loregian A. Drug Repurposing for Viral Infectious Diseases: How Far Are We? *Trends Microbiol* 2018; 26: 865–876.
- [170] Roper RL, Rehm KE. SARS vaccines: where are we? *Expert Rev Vaccines* 2009; 8: 887–898.
- [171] Mubarak A, Alturaiki W, Hemida MG. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV): Infection, Immunological Response, and Vaccine Development. *J Immunol Res* 2019; 2019: 6491738.
- [172] Schindewolf C, Menachery VD. Middle East Respiratory Syndrome Vaccine Candidates: Cautious Optimism. *Viruses* 2019; 11: E74.
- [173] Hilgenfeld R, Peiris M. From SARS to MERS: 10 years of research on highly pathogenic human coronaviruses. *Antiviral Res* 2013; 100: 286–295.
- [174] McDonald I, Murray SM, Reynolds CJ, et al. Comparative systematic review and meta-analysis of reactogenicity, immunogenicity and efficacy of vaccines against SARS-CoV-2. *NPJ Vaccines* 2021; 6: 74.
- [175] Chen W-H, Strych U, Hotez PJ, et al. The SARS-CoV-2 Vaccine Pipeline: an Overview. *Curr Trop Med Rep* 2020; 1–4.
- [176] Funk CD, Laferrière C, Ardakani A. A Snapshot of the Global Race for Vaccines Targeting SARS-CoV-2 and the COVID-19 Pandemic. *Front Pharmacol* 2020; 11: 937.
- [177] Moran A, Beavis KG, Matushek SM, et al. Detection of SARS-CoV-2 by Use of the Cepheid Xpert Xpress SARS-CoV-2 and Roche cobas SARS-CoV-2 Assays. *J Clin Microbiol* 2020; 58: e00772-20.

- [178] Rhoads DD, Cherian SS, Roman K, et al. Comparison of Abbott ID Now, DiaSorin Simplexa, and CDC FDA Emergency Use Authorization Methods for the Detection of SARS-CoV-2 from Nasopharyngeal and Nasal Swabs from Individuals Diagnosed with COVID-19. *J Clin Microbiol* 2020; 58: e00760-20.
- [179] Mitchell SL, George KS. Evaluation of the COVID19 ID NOW EUA assay. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol* 2020; 128: 104429.
- [180] Dao Thi VL, Herbst K, Boerner K, et al. A colorimetric RT-LAMP assay and LAMP-sequencing for detecting SARS-CoV-2 RNA in clinical samples. *Sci Transl Med* 2020; 12: eabc7075.
- [181] Loeffelholz MJ, Alland D, Butler-Wu SM, et al. Multicenter Evaluation of the Cepheid Xpert Xpress SARS-CoV-2 Test. *J Clin Microbiol* 2020; 58: e00926-20.
- [182] Visseaux B, Le Hingrat Q, Collin G, et al. Evaluation of the QIAstat-Dx Respiratory SARS-CoV-2 Panel, the First Rapid Multiplex PCR Commercial Assay for SARS-CoV-2 Detection. *J Clin Microbiol* 2020; 58: e00630-20.
- [183] Pachetti M, Marini B, Benedetti F, et al. Emerging SARS-CoV-2 mutation hot spots include a novel RNA-dependent-RNA polymerase variant. *J Transl Med* 2020; 18: 179.
- [184] Harrington A, Cox B, Snowdon J, et al. Comparison of Abbott ID Now and Abbott m2000 Methods for the Detection of SARS-CoV-2 from Nasopharyngeal and Nasal Swabs from Symptomatic Patients. *J Clin Microbiol* 2020; 58: e00798-20.
- [185] Customer Update to our ID NOW COVID-19 Test. *Abbott*, <https://www.abbott.com/corpnewsroom/diagnostics-testing/customer-update-on-our-idnow-covid-19-test.html> (accessed 27 November 2021).