

Liste des sigles et Abréviations

ACE2 : Enzyme de conversion de l'angiotensine 2

ADN : Acide Désoxyribonucléique

Ag : Antigène

ARN : Acide ribonucléique

CDC : Centre pour le contrôle et la prévention des maladies

DASRI : Déchets d'activités de soins à risques infectieux et assimilés

ELISA : Enzyme Linked immunosorbent assay

FN : Faux négatifs

FP : Faux positifs

HAS : Haute autorité de santé

IgM : Immunoglobuline de type M

IgG : Immunoglobuline de type G

IL : Interleukine

INF : Interféron

LBA : Lavage bronchoalvéolaire

OMS : Organisation mondiale de la santé

PCR : Polymérase Chain Réaction

COVID-19 : coronavirus disease appeared in 2019

RT-PCR : Réaction de polymérisation en chaîne par transcription inverse

TDR : Test diagnostic rapide

TROD : Test d'orientation diagnostic

VP : Vrais positifs;

VN : Vrais négatifs;

Liste des figures

| | |
|--|----|
| Figure 1: Structure et génome du SARS-CoV-2. | 5 |
| Figure 2: Phylogénie, structure et réplication du SARS-CoV-2. | 8 |
| Figure 3: réalisation du prélèvement..... | 16 |
| Figure 4: Schéma d'un test immunochromatographique | 23 |
| Figure 5 : Cinétique des marqueurs virologiques au cours d'une infection au Sars-Cov2 | 24 |
| Figure 6: Boîte de SARS-CoV-2 Antibody Test | 28 |
| Figure 7: kit SARS-CoV-2 Antibody Test (Fabricant: Wondfo®)..... | 29 |
| Figure 8: iFlash 3000 , Shenzhen YHLO Biotech | 30 |

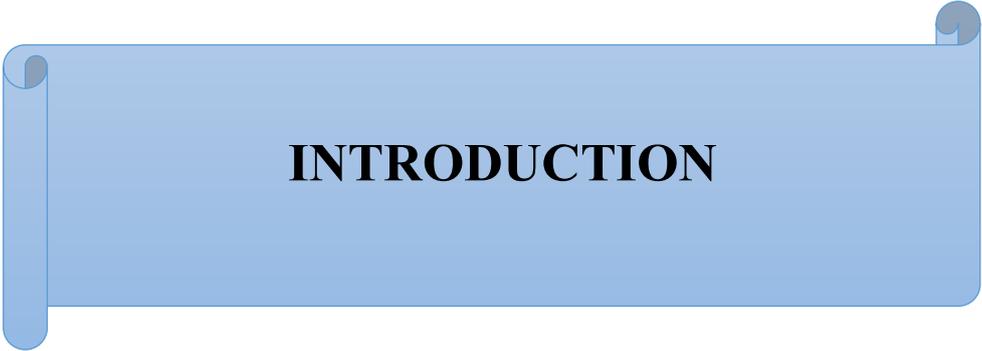
Liste des tableaux

| | |
|---|----|
| Tableau I : signes cliniques | 11 |
| Tableau II : Caractérisation des niveaux de sévérité de la COVID-19 | 13 |
| Tableau III : type d'échantillon | 16 |
| Tableau IV : Échantillons testés | 32 |
| Tableau V : Résultats des tests sérologiques chez les témoins négatifs | 32 |
| Tableau VI : Résultats des tests sérologiques chez les patients positifs (malades et guéris) . | 33 |
| Tableau VII : Tableau de contingence des tests sérologiques chez les malades et guéris | 33 |

Sommaire

| | |
|--|----|
| INTRODUCTION..... | 1 |
| PREMIERE PARTIE : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE | 3 |
| CHAPITRE I : GENERALITES SUR LE SARSCOV-2 | 4 |
| I-1-Définition..... | 4 |
| I-2- Structure et génome du SARS-CoV-2..... | 4 |
| I-3- Epidémiologie | 5 |
| I-4-Virulence du COVID-19 | 6 |
| I-5-Réservoir de virus..... | 6 |
| I-6-Milieu extérieur | 6 |
| I-7-Cycle de multiplication | 6 |
| I-8-Physiopathologie | 9 |
| I-9-Signes cliniques..... | 10 |
| II-1- Pronostic..... | 12 |
| II-2-Contamination, infection cellulaire..... | 13 |
| III. VARIANTS DU CORONAVIRUS | 14 |
| IV-DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE | 15 |
| IV-1- Diagnostique Virologiques (direct)..... | 15 |
| IV-1-1- Prélèvement..... | 15 |
| IV-1-2- RT PCR | 17 |
| IV-1-2-1- But/Objectif | 18 |
| IV-1-2-2- Principe et champs d'application..... | 18 |
| IV-1-3- Tests rapides de détection des antigènes | 19 |
| IV-1-4-Cinétique virale | 19 |
| IV-2- Diagnostique sérologique (indirect) | 20 |
| IV-2-1-Prélèvement | 20 |
| IV-2-2- Tests sérologiques | 21 |
| IV-2-2-1-Technique Elisa « dosage d'immunoabsorption par enzyme liée»..... | 21 |
| IV-2-2-2- Tests rapides immunochromatographiques..... | 22 |
| IV-2-3-Évolution des anticorps sériques | 23 |
| DEUXIEME PARTIE : TRAVAIL EXPERIMENTAL..... | 26 |
| I-MATERIELS ET METHODES | 27 |

| | |
|--|----|
| I-1-Type et cadre d'étude | 27 |
| I-2-Population d'étude..... | 27 |
| I-3-Prélevements | 27 |
| I-4-Parametres étudiés..... | 27 |
| I-5-Méthodes | 27 |
| I-5-1-kit SARS-CoV-2 Antibody Test (Fabricant: Wondfo®) | 27 |
| I-5-2-Réalisation du test | 28 |
| I-5-3-Interprétation des résultats | 29 |
| I-6-Automate Iflash 3000, Shenzhen YHLO Biotech | 29 |
| I-6-1-Principe de Dosage..... | 29 |
| I-6-2-Appareillage | 30 |
| I-6-3-Exploitation statistique..... | 30 |
| II. RESULTATS..... | 32 |
| II-1- Caractéristiques générales des échantillons testés | 32 |
| II-2-Evaluation de la spécificité clinique | 32 |
| II-3-Evaluation de la sensibilité Clinique..... | 33 |
| COMMENTAIRE | 34 |
| CONCLUSION | 37 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 39 |

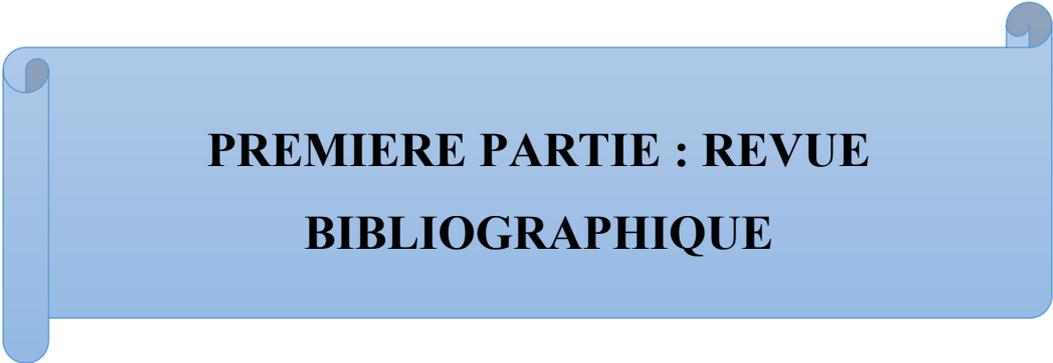


INTRODUCTION

Les coronavirus sont des virus enveloppés à ARN simple brin qui sont capables d'infecter de nombreux animaux dont l'homme. Ces virus sont caractérisés par leurs mutations rapides et leur capacité à franchir les barrières inter-espèces [1]. Le 31 décembre 2019, une épidémie de pneumonies sévères d'étiologie inconnue, survenue dans la ville de Wuhan, province de Hubei, est notifiée par la Chine à l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) [2]. Un nouveau coronavirus est identifié quelques jours plus tard : le SARS-CoV-2, dont le génome présente 96% d'homologie avec un coronavirus de chauves-souris. La maladie liée à l'infection par le SARS-CoV-2 est secondairement nommée COVID-19. Les premiers cas ont été rattachés à la fréquentation d'un marché de fruits de mer et d'animaux de Wuhan, amenant à une première hypothèse de transmission zoonotique, de l'animal à l'Homme. La transmission interhumaine est démontrée dès fin janvier, avec en plus, la possibilité de transmission par des sujets sans symptômes [4 -5].

Les tests sérologiques ont des indications précises dans le cadre de la lutte contre la COVID-19, cependant leur fiabilité est très souvent remise en question, c'est dans ce contexte que nous nous sommes fixés comme **objectif général** de ce travail d'évaluer les performances du TDR SARS-CoV-2 Antibody Test destiné au diagnostic de l'infection au SARS-CoV-2 et objectif spécifiques c'est de déterminer la spécificité et sensibilité du test TDR

La première partie du document porte sur une revue bibliographique relative au SARS-CoV-2 et la place des tests sérologiques dans le diagnostic de la COVID-19. La seconde présente la méthodologie utilisée, les principaux résultats obtenus, la discussion et la conclusion.



**PREMIERE PARTIE : REVUE
BIBLIOGRAPHIQUE**

CHAPITRE I : GENERALITES SUR LE SARSCOV-2

I-1-Définition

Les coronavirus (CoVs), responsables d'infections respiratoires et digestives chez de nombreux mammifères et oiseaux, sont divisés en quatre genres :

- AlphaCoVs,
- BetaCoVs,
- GammaCoVs
- DeltaCoVs [9].

Jusqu'en 2019, six espèces étaient connus comme responsables d'infections humaines :

- Deux alphacoronavirus (HCoV-NL63, HCoV-229E)
- Quatre betacoronavirus (HCoV-OC43, HCoV-HKUI, SARS-CoV-1, MERS-CoV) [1,10].

En janvier 2020, un nouveau betacoronavirus, le SARS-CoV-2, est isolé en Chine chez des patients de la ville de Wuhan présentant un tableau de pneumonie virale sévère [1,11].

I-2- Structure et génome du SARS-CoV-2.

Le SARS-CoV-2 est un virus enveloppé à ARN monocaténaire positivement polarisé qui sera traduit en deux polyprotéines, par la suite clivées en seize protéines non structurales indispensables à la réplication virale [13]. Le tiers restant du génome code essentiellement pour les protéines de structures du virus dont quatre glycoprotéines membranaires : la protéine Spike (S), l'Hémagglutinine-Esterase (HE), les protéines de membrane (M), d'enveloppe (E) ainsi que la protéine de capsid (N).

Structure du virus : une nucléocapside, hélicoïdale, formée de la protéine de capsid (N) complexée à l'ARN viral, est protégée par une enveloppe phospholipidique dans laquelle sont enchâssées les glycoprotéines de surface (S, HE, M et E).

La protéine S est la protéine qui lie le répéteur cellulaire du SARS-CoV-2 (ACE2) et permet l'entrée dans la cellule. Elle est formée de deux sous-unités :

- **S1** qui contient le domaine de liaison au récepteur cellulaire,
- **S2** qui est essentiel pour la fusion du virus à la membrane cellulaire [14].

Le SARS-CoV-2 appartient aux virus apparentés au SARS-CoV dont le réservoir est la chauve-souris.

Si le génome du SARS-CoV-2 présente 79 % d'homologie avec le SARS-CoV-1 et 52 % d'homologie avec le MERS-CoV [11,12], les virus les plus proches sont des coronavirus de la chauve-souris, notamment le RaTG13-CoV (96 % d'homologie) [4].

m), envelope glycoprotein (E) (Figure 1) as structural components.

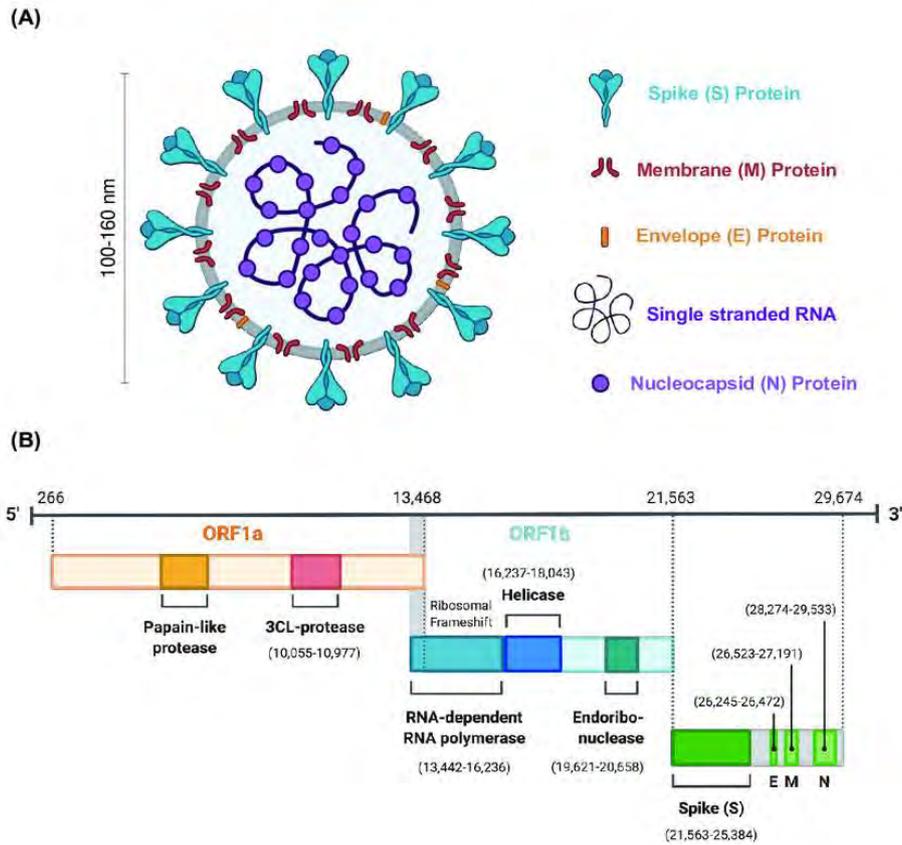


Figure 1: Structure et génome du SARS-CoV-2. [14]

I-3- Epidémiologie

Contagiosité

La période de contagiosité est la durée de temps pendant laquelle la personne infectée peut transmettre la maladie à une autre personne. En se basant sur la détection de l'ARN du virus dans les échantillons respiratoires et la capacité à faire pousser le virus en culture, la période estimée de contagiosité maximale du SRAS-CoV-2 se situe autour de la journée d'apparition des symptômes ; elle débute quelques jours avant et décline de manière graduelle pendant les jours suivants [9]. Une recension des études visant à établir la durée de la période infectieuse a montré que le virus viable a été cultivé à partir d'échantillons respiratoires de 1 à 6 jours avant le début des symptômes. Chez les cas ayant une maladie légère, l'excrétion virale a été documentée jusqu'à 8-10 jours après le début des symptômes. Le pic de la charge virale se situe dans les jours précédant le début de la maladie jusqu'à la première semaine après.

Chez les personnes présentant une maladie grave ou chez les personnes immuno-supprimées, l'excrétion virale peut être prolongée, du virus viable ayant été retrouvé jusqu'à 18-32 jours

après le début de la maladie.

I-4 Virulence du COVID-19

Il est encore difficile de mesurer la virulence du SARS-CoV-2. Selon certains auteurs sa pathogénicité est sensiblement moins grave que les pathologies provoquées par les coronavirus du SRAS et du MERS.

Cette affirmation serait corroborée par les données liées à la mortalité par COVID-19, évaluée à environ 1.4%. Les décès ont concerné essentiellement des patients âgés et porteurs de diverses comorbidités. [19]. Ces estimations pourraient néanmoins être amenées à évoluer en fonction du développement de l'épidémie.

Par comparaison, le taux de létalité du SRAS était de 9,5% et celui du MERS de 34%.

I-5-Réservoir de virus

Le réservoir principal de ce virus semble être la chauve-souris fer à cheval, mais plusieurs questions se posent toujours sur la façon dont il a pu être transmis à l'humain. La transmission du vison vers l'humain a été confirmée dans le contexte des fermes d'élevage de visons infectés par un variant spécifique. Les implications des changements identifiés dans ce variant ne sont pas encore bien comprises [24]. Des cas de transmission de l'humain à l'animal ont été rapportés pour différentes espèces incluant le chat, le chien, le furet, le vison, le hamster et le singe.

I-6-Milieu extérieur

Le SARS-CoV-2 survit en moyenne quatre à cinq jours. Cependant, il est capable de survivre jusqu'à neuf jours sur la surface de certains objets en verre, plastique et métal lorsque la température ambiante ne dépasse pas les 20°C comme cela est le cas en période hivernale. Sa survie n'est de quelques heures lorsque la température est supérieure à 30 °C. Il peut cependant être facilement « désactivé », [26] en moins d'une minute, en désinfectant les surfaces par l'eau oxygénée ou de l'eau de javel.

I-7-Cycle de multiplication

Le cycle de réplication des coronavirus a été largement étudié. Après la fusion et le largage de la nucléocapside dans le cytosol de la cellule hôte, la machinerie cellulaire traduit le gène de la réplicase en deux polyprotéines (pp1a et pp1ab) clivées en nombreuses protéines

indispensables au cycle viral (notamment deux protéases virales et une ARN-polymérase ARN-dépendant) s'assemblant en un large complexe de transcription et de réplication [13,15].

Ce complexe permet d'une part de reproduire l'ARN viral et d'autre part, par le biais de la formation de petits brins d'ARN anti-sens appelés ARN sous-génomiques, la production de protéines de structure des nouveaux virions. Finalement les brins d'ARN synthétisés sont combinés avec la protéine N pour former la nucléocapside et l'assemblage avec les glycoprotéines d'enveloppe permet le bourgeonnement de nouvelles particules virales [15].

La connaissance du cycle viral permet de déterminer les cibles thérapeutiques inhibant sa réplication. Nous proposons ici un bref tour d'horizon des principales stratégies antivirales proposées aujourd'hui comme traitement potentiel de la COVID-19.

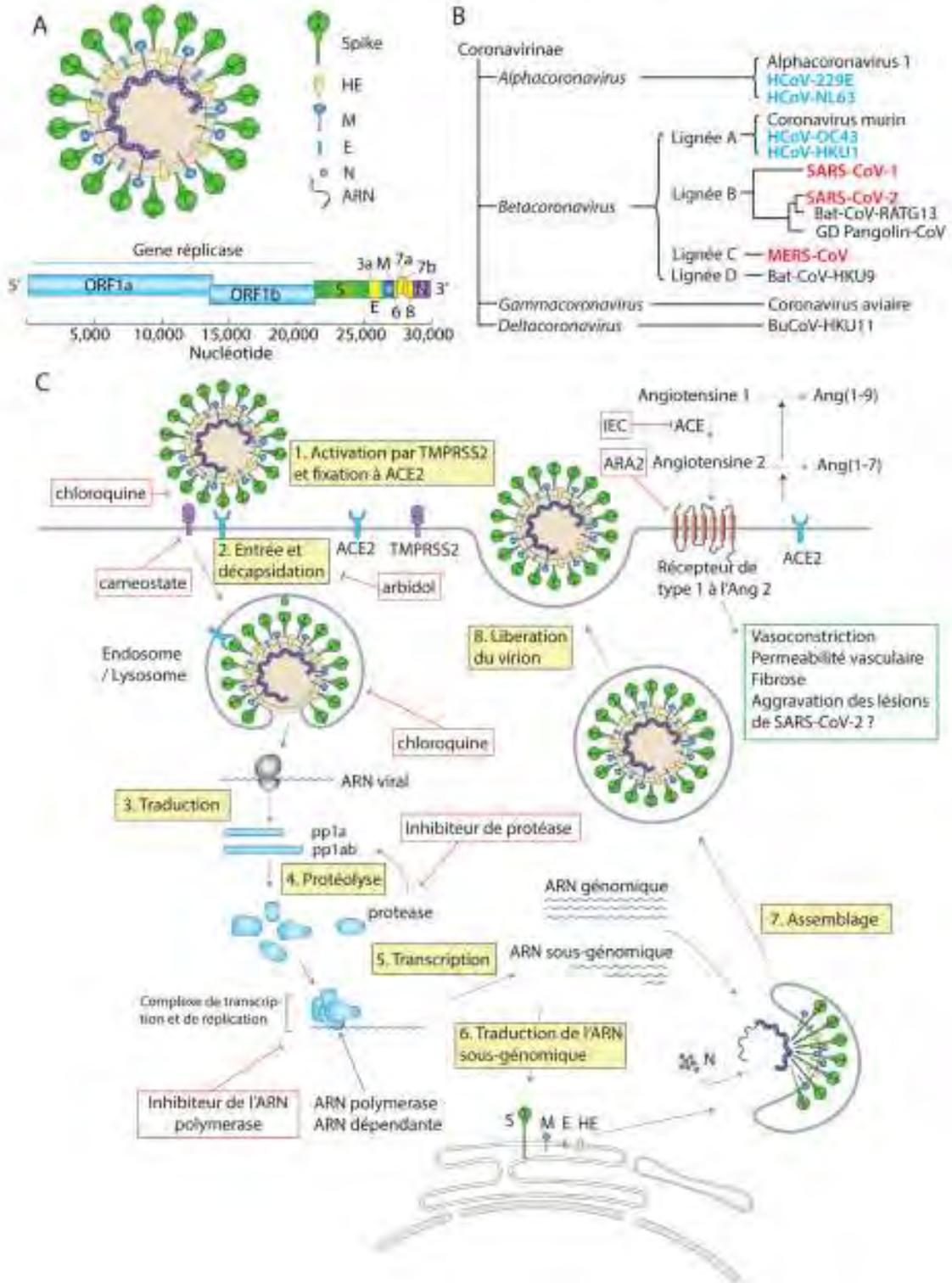


Figure 2: Phylogénie, structure et réplique du SARS-CoV-2. [4]

Le SARS-CoV-2 forme une particule sphérique d'un diamètre de 100-160 nm composés d'ARN simple brin polarisé positivement et de cinq protéines de structure la protéine Spike sous forme trimérique qui se lie au récepteur cellulaire, trois autres protéines transmembranaires (la glycoprotéine d'enveloppe [E], de membrane [M] et l'Hémagglutinine-Esterase [HE]) et la protéine de capsid (N). La nucléocapside formée de l'ARN viral complexé à la protéine N est enchâssée à l'intérieur de l'enveloppe.

Génome viral : le gène réplicase (orf1a et orf1b) [4] code pour deux larges polyprotéines (pp1a et pp1b) clivées en seize protéines non structurales incluant deux protéases et une ARN-polymerase ARN-dépendante. Le reste du génome code pour les protéines

I-8-Physiopathologie

Les coronavirus sont des virus à ARN simple brin enveloppés. Ils infectent une grande variété d'espèces et sont divisés en quatre genres ; α , β , γ et δ en fonction de leur structure génomique.

Les coronavirus humains tels que 229E et NL63 sont responsables d'affections respiratoires bénignes et appartiennent au coronavirus α .

En revanche, le SARS-CoV, le coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient (MERS-CoV) et le SARS-CoV-2 responsable du COVID-19 sont classés parmi les coronavirus β , dit émergents.

Les coronavirus ont quatre protéines structurales ; Spike (S), membrane (M), enveloppe (E) et nucléocapside (N). Le récepteur permettant l'entrée du virus dans les cellules qu'il infecte est une molécule présente à leur surface : l'enzyme ACE2. Néanmoins, l'entrée du SARS-CoV-2 dans les cellules cibles se fait également grâce à l'intervention d'une enzyme cellulaire appelée TMPRSS2 (Type II transmembrane serine protéase) [16] qui coopère avec ACE2 pour favoriser l'entrée du virus dans la cellule.

On peut ainsi imaginer l'ACE2 comme une serrure et TMPRSS2 comme la clé avec laquelle le virus peut l'ouvrir pour rentrer. L'ACE2 est une protéine largement exprimée dans le cœur, les vaisseaux, les intestins, les poumons (en particulier dans les pneumocytes de type 2 et les macrophages), les reins, les testicules et le cerveau. Sa présence dans ces différents organes semble expliquer la variété des tableaux cliniques et des complications liées au COVID-19 [17].

Son rôle physiologique est de dégrader l'angiotensine II, afin d'en limiter les effets négatifs (vasoconstriction, inflammation, thrombose) liés à la liaison aux récepteurs AT1.

L'entrée du SARS-CoV2 dans la cellule régule à la baisse les récepteurs ACE2, qui perdent dès lors leur capacité de dégradation de l'angiotensine II.

C'est cette perte d'expression et d'activité de l'ACE2 qui pourrait être à l'origine de l'inflammation pulmonaire importante et des phénomènes microthrombotiques observés [18]

I-9-Signes cliniques

La période d'incubation de la maladie peut s'étendre jusqu'à deux semaines. Les symptômes apparaissent néanmoins chez la plupart des malades entre le quatrième à cinquième jours de la contamination [30].

À 11 jours 97.5% des personnes ont développé des symptômes. La présentation classique de la maladie est celle d'une pneumonie, avec fièvre, toux et dyspnée. L'absence de fièvre au départ n'exclut cependant pas le diagnostic : ainsi, dans une large série américaine, seul un peu plus de 30% des malades présentaient une température $>38^{\circ}\text{C}$ au départ [32]

La très grande majorité des patients développera néanmoins de la fièvre au cours de l'infection (30). Le clinicien veillera à toujours mesurer la saturation du patient qu'il examine, car l'hypoxie peut parfois être très bien tolérée : on a décrit chez un nombre significatif de patients un aspect d'hypoxémie silencieuse.

En dehors de la pneumonie, les symptômes de présentation sont variables (Tableau I). La maladie peut se présenter comme une infection des voies respiratoires supérieures dite banale, et prendre un aspect cliniquement difficilement distinguable d'une autre virose.

Dans certains cas rares, le tableau initial peut aussi être dominé ou limité à une symptomatologie digestive.

Les anomalies du goût et de l'odorat, allant de la perturbation discrète à l'anosmie et/ou l'agueusie complète, ont été bien décrites. Elles peuvent précéder les autres symptômes, ou être les seules manifestations de l'infection dans de rares cas (environ 3% des malades dans une série italienne).

Des éruptions cutanées et des atteintes oculaires (conjonctivite) sont également possibles. Enfin, des présentations atypiques ne sont pas rares, notamment chez la personne âgée, et le clinicien devra rester vigilant et envisager le diagnostic devant un syndrome gériatrique (chute, delirium, déclin fonctionnel).

La maladie prend volontiers un cours bi-phasique : après un début modéré, les symptômes s'aggravent et la dyspnée s'installe vers la fin de la première semaine.

C'est fréquemment à ce moment-là que les patients avec des présentations sévères sont hospitalisés. Dans les cas les plus sévères, l'insuffisance respiratoire s'installe et les patients présentent un tableau de syndrome de détresse respiratoire aiguë.

Cette seconde phase de la maladie se présente fréquemment sous la forme d'un tableau très inflammatoire, voire dans les cas les plus sévères, sous forme d'une tempête cytokinique, ce qui fait penser qu'il y a une place dans le traitement pour les médications immunomodulatrices. Les complications cardio-vasculaires et thromboemboliques [12] de la maladie ne sont pas rares dans les formes sévères, ce qui est probablement à mettre en liaison avec l'atteinte endothéliale.

Une série autopsique allemande a ainsi démontré une thrombose veineuse profonde chez 7 patients sur 12. Pour 4 des malades, l'embolie pulmonaire était la cause directe de la mort

Tableau I : signes cliniques [21]

| Symptômes | Fréquence au déclenchement de la maladie % | Fréquence au cours de la maladie % |
|--------------------|--|------------------------------------|
| Toux | 50 | 88 |
| Fièvre | 42 | 75 |
| Myalgie | 35 | 66 |
| céphalée | 17 | 65 |
| Mal de gorge | 15 | 38 |
| Dyspnée | 10 | 41 |
| Rhinorrhée | 12 | 21 |
| Anosmie | Non évalué | 16 |
| Malaise | 10 | 29 |
| nausée | 2 | 20 |
| Douleur abdominale | 2 | 13 |
| diarrhée | 6 | 32 |

II-1- Pronostic

La proportion de patients asymptomatiques parmi les patients infectés est inconnue et varie de 5% à 75% dans la littérature. Elle a été estimée à 46.5 % des malades dans le bateau de croisière Diamond Princess (19) (pour un total de 3711 passagers et membres d'équipage) mais des chiffres plus élevés (jusqu'à 75%) ont été rapportés [21]

Parmi les malades (symptomatiques), il est difficile de prédire la sévérité de l'infection.

On estime que 80% des malades ont une présentation modérée, 15% sévère, et 5% sont définis comme critiques (avec insuffisance respiratoire, choc ou défaillance multisystémique) (Tableau 2).

De nombreux facteurs de risque ont été identifiés dans de larges cohortes, et incluent en premier lieu l'âge avancé (>65 ans), le sexe masculin et les comorbidités telles que les maladies cardiovasculaires, le diabète, l'hypertension artérielle, les cancers, les maladies respiratoires chroniques (essentiellement la BPCO), l'immunodépression ou encore l'obésité.

Rapidement, tenant compte de la place centrale d'ACE2 dans l'infection COVID-19, il a été postulé que les traitements par inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) et les sartans pouvaient être responsables de la sévérité décrite chez les patients hypertendus. Cette hypothèse semble actuellement battue en brèche, des études récentes montrant que la mortalité était non affectée ou même diminuée par ces traitements. L'importance de l'âge est majeure : ainsi, en Chine, un taux de mortalité de 0,32% chez les moins de 60 ans, 6,4% chez les plus de 60 ans, et 13,4% au-delà de 80 ans a été mis en évidence. A contrario, parmi les enfants, bien que de rares présentations sévères et des décès aient été décrits, les taux d'hospitalisation sont faibles et la très grande majorité des enfants présente un tableau clinique banal. La contribution respective des enfants à la transmission interhumaine et à la dynamique pandémique reste discutée [28].

Tableau II : Caractérisation des niveaux de sévérité de la COVID-19 [15]

| Classifications des cas | Définitions |
|-------------------------|---|
| Asymptomatique | RT-PCR positive et aucune plainte |
| Légers | Symptômes d'infection aiguë des voies respiratoires supérieures (fièvre, fatigue, myalgie, toux, mal de gorge, écoulement nasal, éternuements) ou symptômes digestifs (nausées, vomissements, douleurs abdominales, diarrhée) |
| Modérés | Pneumonie (fièvre fréquente, toux) sans hypoxémie évidente, avec des lésions au CT-scan |
| Sévères | Pneumonie (fièvre fréquente, toux) avec hypoxémie évidente (Saturation < 93%), avec des lésions au CT-scan |
| Critiques | Syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA), peut avoir un choc, une encéphalopathie, une lésion myocardique, une insuffisance cardiaque, un dysfonctionnement de la coagulation et une lésion rénale aiguë |

II-2-Contamination, infection cellulaire

▪ Voies de transmissions :

Gouttelettes Le SARS-CoV-2 se transmet essentiellement par l'émission de gouttelettes respiratoires.

Ces gouttelettes chargées de particules virales pourraient infecter un sujet susceptible soit par contact direct avec une muqueuse (transmission directe) soit par contact avec une surface infectée par les muqueuses nasales, buccales ou conjonctivales (transmission indirecte).

Elles peuvent être projetées à plusieurs mètres de distance mais ne persistent pas dans l'air.

Bien que le virus puisse survivre au moins trois heures après aérosolisation expérimentale, il n'existe à ce jour aucune donnée montrant la transmission par aérosols du SARS-CoV-2. En revanche, le virus peut survivre plusieurs jours sur des surfaces inertes [22].

Autres voies de transmission En dehors des prélèvements respiratoires, l'ARN viral a également été détecté dans les selles et le sang des patients infectés.

Si certains virus ont pu être cultivés vivants à partir des selles [25] et que le SARS-CoV-2 est capable d'infecter les entérocytes humains, il n'existe pas aujourd'hui de preuve définitive d'une transmission féco-orale significative. De même, malgré l'existence possible d'une virémie, la transmission intra-utérine du virus reste à démontrer à ce jour, bien que quelques cas suspects aient été rapportés.

Enfin l'isolement de l'ARN viral dans les urines reste à ce jour très peu décrit

Pénétration du virus dans la cellule hôte La protéine S du SARS-CoV-2 utilise le récepteur cellulaire ACE2. Une metalloprotéase dont la fonction première est la dégradation de l'angiotensine II en angiotensine I pour rentrer dans la cellule hôte.

Bien étudiée chez le SARS-CoV-1, la liaison de la sous unité S1 à ACE2 entraîne une modification conformationnelle de la protéine S, exposant S2 et permettant l'endocytose puis la fusion membranaire.

Cette fusion nécessite l'activation de S par le clivage au niveau de la jonction S1/S2 et d'un autre site de S2, notamment réalisée par la protéase membranaire TMPRSS2 (transmembrane protease serine 2) [29].

Dans le cas du SARS-CoV2, l'ajout d'un site de clivage furine permet un clivage des sous unités S1/S2 dès la biosynthèse virale et pourrait majorer le potentiel infectant du virus.

En dehors d'ACE2, le SARS-CoV-2 pourrait également utiliser d'autres récepteurs cellulaires de la protéine S pour infecter les cellules n'exprimant pas ACE2, ainsi que démontrée sur des lymphocytes T in vitro.

III. VARIANTS DU CORONAVIRUS

Les variants du coronavirus Sars-Cov-2, d'abord nommés en fonction de l'endroit où ils ont été décelés la première fois, sont désormais nommés selon l'alphabet grec afin de "faciliter et rendre plus pratique leur évocation par des publics non scientifiques" et ne plus stigmatiser le pays où il a été décelé, indique l'Organisation mondiale de la santé (OMS).

Dix variants, de la lettre grecque Alpha (α) à la lettre Lambda (λ), ont été identifiés dans le monde. Les quatre premiers sont désignés comme VOC (variants of concern, variant préoccupant en français) par l'OMS. Il s'agit de :

- Variant Alpha ("anglais" ou "britannique") découvert le 20 septembre 2020, dans le Kent, une région située au Sud-Est de l'Angleterre. Le 14 décembre, le Royaume-Uni signale à l'OMS la circulation de ce variant. Il est rapidement reconnu le 18 décembre 2020 comme "variant préoccupant".

- Variant Beta ("sud-africain") repéré pour la première fois en mai 2020 et devenu majoritaire dans toute l'Afrique du sud à la fin 2020. Il a été désigné "variant préoccupant" le 18 décembre 2020.

- Variant Gamma ("brésilien") détecté en novembre 2020 classé comme préoccupant par l'OMS en janvier 2021.

- Variant Delta ("indien") apparu en Inde en novembre 2020. Il est d'abord désigné variant d'intérêt le 4 avril dernier avant de devenir "variant préoccupant" le 11 mai 2021. C'est celui qui est en passe de devenir majoritaire en France et en Europe.

Six autres variants sont estampillés VOI par OMS, c'est-à-dire "variants of interest", "variants d'intérêt" en français :

- Variant Epsilon, détecté initialement aux Etats-Unis, dans le sud de la Californie entre mars et juillet 2020. Désigné "variant d'intérêt" en mai 2021.
 - Variant Eta, repéré concomitamment dans plusieurs pays en décembre 2020. Il est classé "variant d'intérêt" le 17 mars 2021.
 - Variant Theta, apparu aux Philippines en février 2021 et classé "variant d'intérêt" le 1er juin 2021.
- Variant Iota, décelé à New York aux Etats-Unis en novembre dernier et classé VOI, le 24 mars 2021.
- Variant Kappa, repéré en Inde en octobre 2020. Il est désigné "variant d'intérêt" le 4 avril 2021.
 - Variant Lambda, apparu au Pérou en décembre dernier. C'est le plus récent à avoir été classé comme "variant d'intérêt", le 14 juin dernier. Il semble inquiéter de nombreux pays dans la mesure où sa capacité de résistance à l'immunité (vaccinale ou naturelle) serait accrue par rapport aux autres variants

IV-DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE

IV-1- Diagnostique Virologiques (direct)

IV-1-1- Prélèvement

Tout d'abord, il faut suivre les mesures de prévention de contamination lorsque des échantillons sont prélevés sur un cas suspect.

L'examineur doit porter des gants, un masque respiratoire FFP2/N95, une blouse et des lunettes de protection ou une visière protectrice.

Le patient doit être coopératif, il doit être assis dans une position détendue et confortable pendant le prélèvement de l'échantillon; demandez au patient de se moucher d'abord, et de placer la tête légèrement en arrière soutenez-la avec la main non dominante, ou appuyez-la contre le mur afin de minimiser les mouvements subis incontrôlés pendant la prise d'échantillon et tenez-vous debout légèrement en décalé par rapport au patient pour éviter le risque de contamination en cas de toux ou d'éternuement soudain. Informez le patient de la gêne potentielle pendant le prélèvement de l'échantillon. [18]

L'écouvillon horizontalement dans la narine gauche ou droite, faites-le avancer avec précaution tout en maintenant une trajectoire proche à la fois de la cloison et du plancher nasal, parallèle au palais ne dirigez pas l'écouvillon vers le haut mais maintenez le à l'horizontal et poussez le doucement ; une résistance est ressentie lorsque l'écouvillon atteint le nasopharynx postérieur (pour un adulte, cela correspond à 5-6 cm), laissez l'écouvillon

pendant quelques secondes tout en frottant doucement la paroi dans un mouvement en faisant tourner l'écouvillon sur son axe, retirez l'écouvillon lentement et doucement; insérez immédiatement l'écouvillon dans le tube de prélèvement d'échantillons qui contient 2 à 3 ml de milieu de transport universel (UTM) viral

briser la tige à hauteur de la marque indiqués sur la tige; si pour une raison quelconque, un écouvillon nasal ne peut être prélevé, un écouvillon oropharyngé peut également être prélevé par la bouche, sans toucher la langue, les dents.

Une fois encore, informez le patient que le frottis peut être inconfortable pendant un court instant et peut déclencher un réflexe nauséeux.

Les échantillons collectés peuvent être mis au réfrigérateur à 4°C pendant un maximum de 3 jours et être traités par le laboratoire dans ce laps de temps trois jours. L'idéal est toutefois d'analyser l'échantillon aussi tôt que possible après le prélèvement

Tableau III : type d'échantillon[18]

| Type d'échantillon | Matériel de prélèvement | Transport au laboratoire | Conservation jusqu'à l'analyse | Observations |
|---|---|--|--|---|
| Écouvillonnage nasopharyngé et oropharyngé | Écouvillons floqués en Dacron ou en polyester | 4 °C dans un milieu de transport viral | ≤5 jours : 4 °C >5 jours : -70 °C | Les écouvillons nasopharyngés et oropharyngés doivent être placés dans le même tube contenant le milieu de transport viral... |
| Lavage broncho alvéolaire | Conteneur stérile | 4 °C | ≤48 heures : 4 °C >48 heures : -70 °C | Ne pas utiliser de milieu de transport pour ce type de prélèvement. A transmettre immédiatement au laboratoire |
| Produit d'aspiration endo-trachéale, d'aspiration naso pharyngée ou de lavage nasal | Conteneur stérile | 4 °C | ≤48 heures : 4 °C >48 heures : -70 °C | Ne pas utiliser de milieu de transport pour ce type de prélèvement. A transmettre immédiatement au laboratoire |

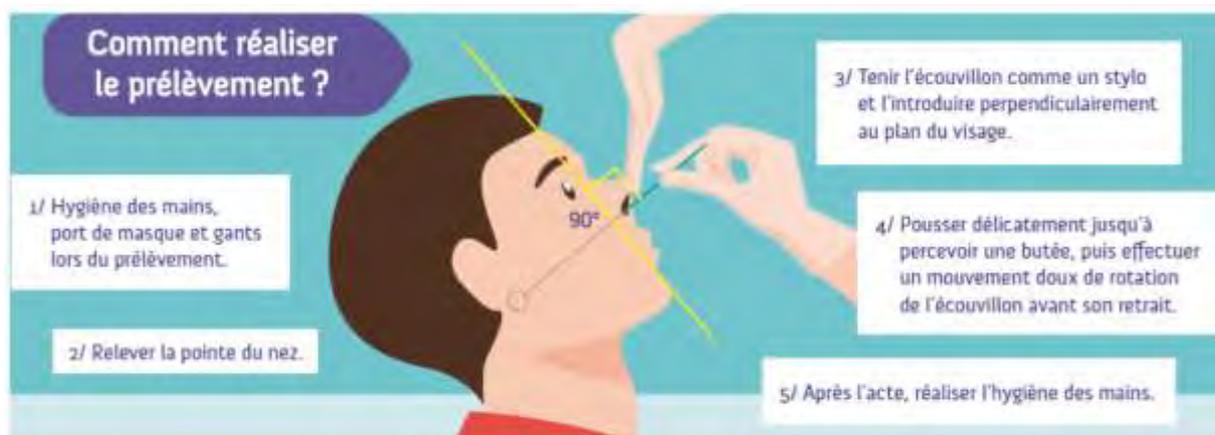


Figure 3: réalisation du prélèvement [19]

Remarque :

Le choix du type de prélèvement peut être modifié selon les nouvelles données.

Pour le transport des échantillons destinés à la détection du virus, utiliser un milieu de transport viral (MTV).

Eviter de congeler et décongeler plusieurs fois les échantillons.

Veiller à la disponibilité du matériel suivant : conteneurs de transport, sacs et emballages pour échantillons, glacières, équipement de protection individuelle (EPI), produits de décontamination des surfaces. [19]

Acheminer le prélèvement au laboratoire national de référence de l'IPA (Sidi-Fredj)

Tous les échantillons prélevés à des fins d'analyse en laboratoire doivent être considérés comme potentiellement infectieux. } Trier et éliminer les déchets générés (infectieux ou non) lors de la réalisation des prélèvements (piquant/tranchant/solide/mou...) :

Autoclave ;

Ou inactivation par eau de Javel à 0,5 % de chlore.

Puis incinérer les déchets.

IV-1-2- RT PCR

La recherche de matériel viral peut consister, comme c'est le cas de la PCR, à l'amplification d'une séquence génétique du virus. C'est un test très sensible, mais qui nécessite un appareillage qui n'existe qu'en laboratoire, et auquel est associé un certain temps de traitement. [22]

Des alternatives à la PCR classique proposent de réaliser une amplification du matériel génétique dans des conditions isothermes, ce qui permet de gagner du temps de chauffe, mais elles utilisent des appareils peu disponibles par rapport aux appareils classiques.

La recherche de matériel viral peut également consister à rechercher des protéines du virus directement, c'est le principe des tests antigéniques.

Leur avantage est de fonctionner très rapidement et d'être réalisable en dehors du laboratoire (il s'agit de tests rapides d'orientation diagnostique TROD), mais leur sensibilité est moins bonne que les tests PCR, d'où leur recommandation pour les seules personnes symptomatiques.

La polymérase chain reaction (PCR) est une technique de biologie moléculaire permettant de dupliquer une séquence d'acide désoxyribonucléique (ADN) connue à partir d'une faible

quantité d'échantillons. Cette amplification permet de disposer d'une quantité suffisante de matériel génétique pour identifier un agent biologique. Pour détecter le Sars-CoV-2, qui est un virus à acide ribonucléique (ARN), il faut obtenir la transformation de l'ARN en ADN grâce à une enzyme : la transcriptase inverse. L'ADN est donc amplifié par PCR, c'est la reverse transcription polymérase chain reaction dite RT-PCR.

IV-1-2-1- But/Objectif

La polymérase Chain réaction (PCR) est une technique de biologie moléculaire permettant de dupliquer une séquence d'acide désoxyribonucléique (ADN) connue à partir d'une faible quantité d'échantillons. Cette amplification permet de disposer d'une quantité suffisante de matériel génétique pour identifier un agent biologique. Pour détecter le Sars-CoV-2, qui est un virus à acide ribonucléique (ARN), il faut obtenir la transformation de l'ARN en ADN grâce à une enzyme : la transcriptase inverse. L'ADN est donc amplifié par PCR, c'est la reverse transcription polymérase Chain réaction dite RT-PCR.

La RT-PCR permet la détection qualitative du virus SARS-CoV-2 à partir d'écouvillonnages nasopharyngés chez des patients suspect.

L'ARN du SARS-CoV-2 est généralement détectable dans les écouvillonnages nasopharyngés durant la phase aiguë de l'infection. Un résultat positif indique la présence d'ARN de SARS-CoV-2. Une corrélation clinique avec l'histoire du patient et d'autres modalités diagnostiques est nécessaire pour déterminer la contagiosité (statut infectieux) du patient.

IV-1-2-2- Principe et champs d'application

La RT-PCR (amplification en chaîne par la polymérase, précédée d'une transcription inverse) en temps réel, permettant l'amplification et la détection de l'ARN du virus SARS-CoV-2

Le système comprend, l'instrument Integrated Cyclor (cycleur intégré) de 3M (ou Liaison MDX de Diasorin molecular), un disque d'amplification directe (« Direct amplification disc ») et des accessoires qui leur sont rattachés. Des sondes fluorescentes sont utilisées avec des amorces complémentaires pour amplifier l'ARN du virus SARS-CoV-2 et du contrôle interne. Les amorces/sondes ciblent deux régions différentes du génome du SARS-CoV-2 : l'ORF1ab et le gène S. Le gène S encode la glycoprotéine de spicule (spike) du SARS-CoV-2. La région ORF1ab encode des protéines non structurales bien conservées et est donc moins susceptible à la recombinaison. Un contrôle interne d'ARN est utilisé pour détecter l'échec ou l'inhibition de la réaction RT-PCR.

IV-1-3- Tests rapides de détection des antigènes

C'est un test immunochromatographique développé pour la détection rapide de l'antigène CoV-2 du SRAS sur un échantillon nasopharyngé (7-9). Il a été mis au point pour identifier les patients COVID-19 positifs. A ce titre c'est test de screening rapide, qui constitue une alternative à la RT-qPCR, et permet de prendre rapidement des décisions cliniques et de quarantaine. Ce test a une sensibilité de < 25. Sa faible sensibilité constitue donc un handicap majeur pour une utilisation visant à détecter tous les cas COVID-suspects.

IV-1-4-Cinétique virale

Le séquençage du génome complet du virus indique la présence de différents géotypes dans les prélèvements nasopharyngés et les crachats. Ces résultats pourraient s'expliquer par une réplication virale indépendante dans le nasopharynx et les poumons.

Les patients atteints de COVID-19 ont une charge virale plus élevée avant les symptômes, ce qui pourrait expliquer la nature à propagation rapide de cette épidémie. En effet, le virus SARSCoV-2 est détecté dans les voies respiratoires supérieures dès les phases précoces de l'infection et avant même l'apparition de symptômes. Il existe un consensus sur la présence du virus dès deux jours précédant l'apparition des premiers symptômes (avec des extrêmes à quatre ou cinq jours) puis un pic un jour avant. [23]

Le virus SARS-CoV-2 se réplique activement dans la gorge pendant les cinq premiers jours après apparition des symptômes (JAS), des résultats positifs RT-PCR sont obtenus entre JAS1 et JAS5. Après JAS5, la charge virale diminuerait dans les écouvillonnages nasopharyngés.

Alors que dans la plupart des cas, les symptômes s'atténuent au bout de la fin de la première semaine, l'ARN viral est détectable dans les prélèvements de gorge pendant la deuxième semaine.

À partir de JAS8, il n'y pas d'association entre la détection de l'ARN viral issu de prélèvement nasopharyngé et le caractère infectant du virus (cf. culture in vitro).

De l'ARN viral a été détecté dans d'autres milieux biologiques (selles, plasma) mais pas dans les urines des patients infectés.

Des échantillons de selles et des crachats sont restés positifs pour l'ARN viral pendant plus de trois semaines chez certains patients et ce, malgré une résolution complète des symptômes.

Dans les échantillons de plasma de donneurs de sang, l'ARN viral n'a pas été détecté à l'exception d'une publication (Chang et al.) rapportant une détection dans quatre échantillons de plasma de donneurs de sang. À ce jour, et en l'état actuel des connaissances, l'ARN viral est détecté de façon optimale dans les échantillons nasopharyngés jusqu'à J7 après

l'apparition des symptômes. Après ce délai, la détection n'est plus optimale au sein de ces prélèvements. Le diagnostic peut être recherché par d'autres méthodes : autres prélèvements (crachats...) ou autres examens.

En l'attente d'une caractérisation plus précise de la cinétique de production de virus infectieux, il doit être considéré qu'en cas de résultat positif d'une RT-PCR à partir de prélèvement nasopharyngé ou de voies aériennes basses, le patient est porteur d'un virus potentiellement infectieux.

IV-2- Diagnostic sérologique (indirect)

Les tests sérologiques permettent uniquement de déterminer si une personne a produit des anticorps en réponse à une infection par le virus.

La production d'IgM et/ou d'IgG n'étant détectable chez les patients symptomatiques qu'à partir de la deuxième semaine suivant l'apparition des symptômes, les tests sérologiques ne sont donc pas recommandés dans le cadre du diagnostic précoce de l'infection COVID-19 lors de la première semaine suivant l'apparition des symptômes.

La présence des anticorps détectée par les tests disponibles actuellement ne permet pas de déterminer leur activité neutralisante.

Les tests sérologiques ne permettent pas de statuer si la personne est contagieuse ou pas. En effet, il n'y a pas de corrélation établie entre production d'anticorps et présence du virus infectieux par conséquent, à ce jour, les tests sérologiques auraient une place dans la surveillance épidémiologique, dans l'identification des personnes étant ou ayant été en contact avec le virus (en complément de la RT-PCR qui reste le test de première intention pour le diagnostic de la phase aiguë du COVID-19) mais pas pour identifier les personnes potentiellement protégées contre le virus[25].

IV-2-1-Prélèvement

Le prélèvement se fait au niveau du pli du coude par ponction veineuse. Il n'est pas indispensable d'être à jeun.

Les tests sérologiques permettent la détection qualitative et/ou quantitative des anticorps IgG / IgM anti SARS-CoV-2 dans les échantillons de sang total, de sérum ou de plasma humain Les échantillons de sang sont mis dans un emballage classique après désinfection des tubes. Le délai d'acheminement d'un échantillon vers le laboratoire est de 24 à 48H.

Pour établir un diagnostic, deux prélèvements espacés de deux à quatre semaines sont souvent utiles pour montrer une ascension marquant une infection récente. Les dépistages nécessitent en général un seul prélèvement.

IV-2-2- Tests sérologiques

Des tests sérologiques permettent de mesurer des anticorps (IgM et IgG circulants) de patients atteints de COVID.

On distingue les tests dit tests ELISA et les tests immunochromatographiques. Ces derniers incluent les tests rapides de détection d'anticorps. [25]

La question qui se pose est celle de l'utilisation de ces tests comme outil épidémiologique. La réponse à cette question dépend de leur fiabilité en termes de spécificité (éviter les faux positifs) et de sensibilité (éviter les faux négatifs).

A ce jour, de très nombreux tests sont proposés, dont de nombreux tests chinois, avec des spécificités et des sensibilités variables mais globalement élevées.

La variabilité des résultats dépend de la fenêtre immunitaire. Elle doit être adéquate, ni trop tôt ni trop tard, afin de générer un résultat qui soit interprétable.

IV-2-2-1-Technique Elisa « dosage d'immunoabsorption par d'enzyme liée»

C'est une technique immuno-enzymatique de détection qui se fait en laboratoire et qui permet de visualiser une réaction antigène-anticorps grâce à une réaction colorée produite par l'action sur un substrat d'une enzyme préalablement fixée à anticorps.

L'utilisation d'anticorps monoclonaux rend la détection spécifique et la réalisation d'une gamme en parallèle (droite de référence réalisée en diluant de manière sériée avec un contrôle positif) permet de quantifier les anticorps du patient présents dans le sang.

Plusieurs tests sont commercialisés dont anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG, Euroimmun, Germany, EDI New Coronavirus COVID-19 IgG ELISA, Epitope Diagnostics (EDI), USA, et recomWell SARS-CoV-2 IgG ELISA, Mikrogen, Germany [6].

Une réaction enzymatique rend toutefois cette technique dépendante de la température, du pH et de l'éclairement.

Concrètement, l'ELISA nécessite la réalisation de différentes étapes successives : antigène spécifique du virus SARS-CoV-2 (la protéine N contenue dans la nucléocapside virale ou le récepteur de liaison du virus dit RBD (Receptor Binding Domain) est fixé pendant une nuit dans le fond d'un puit d'une plaque 96 puits (« coating »).

Les anticorps présents dans l'échantillon de plasma du patient vont se fixer spécifiquement sur l'antigène. Un anticorps de détection va ensuite fixer les anticorps humains à doser.

Ces anticorps de détection sont couplés à une enzyme qui en présence de son substrat le transforme en produit de réaction détectable et mesurable grâce à l'apparition d'une coloration. L'intensité de celle-ci est proportionnelle à la quantité d'enzyme présent et donc à la concentration d'anticorps recherché.

Certaines de ces étapes (dont le coating) prennent plusieurs heures. Le test ELISA ne peut être effectué sur une goutte de sang. Ce n'est donc pas un test rapide et il ne peut être réalisé au lit du malade.

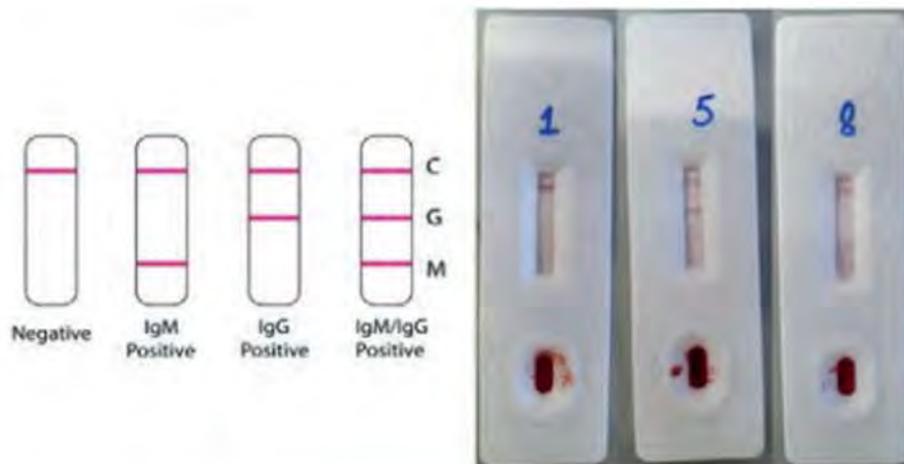
IV-2-2-2- Tests rapides immunochromatographiques

C'est un test d'immunodétection de type « sandwich » et se présentent sous forme de dispositifs à flux latéral simples d'utilisation,

Les TDR sont généralement constitués d'une cassette en plastique avec des puits pour l'échantillon et le tampon, une membrane de nitrocellulose, une ligne de test à laquelle sont fixés des antigènes spécifiques pour la détection des complexes anticorps-antigènes cibles conjugués et une ligne témoin à laquelle sont fixés des antigènes spécifiques pour la détection des anticorps conjugués. [8]

Dans le cas du SARS-CoV-2, l'analyte le plus souvent ciblé par les TDR est la nucléocapside du virus, cette protéine étant privilégiée en raison de son abondance relative. En règle générale, tout l'équipement nécessaire à la réalisation du test, y compris le matériel de prélèvement des échantillons, est fourni dans le kit commercial, à l'exception d'un minuteur.

Par opposition au test ELISA, ce sont des tests rapides qui permettent d'établir un diagnostic en quelques minutes.



Test Immunochromatographique COVID-19 sur bandelette de nitrocellulose CMTA/UCLouvain et Zentech : (1) Test négatif ; (5) Présence d'IgG ++ et d'IgM + ; (8) IgM ++

Figure 4: Schéma d'un test immunochromatographique [15]

IV-2-3-Évolution des anticorps sériques

La plupart des virus à ARN avec un tropisme respiratoire confèrent de fait une bonne immunité protectrice sur le long terme. Les SARS-CoV-2 stimule une réponse immunitaire.

Dans la phase précoce de la maladie, les anticorps IgM commencent à apparaître, de manière inconstante, dans les 5 à 7 premiers jours suivant l'apparition des symptômes avec un temps moyen de séroconversion de 10 à 11 jours. Ils sont habituellement bien détectables après 15 jours, avec un taux de séroconversion proche de 100%, mais ils diminuent ensuite assez rapidement pour disparaître après 6 à 7 semaines (notons qu'au 15ème jour post-infection, le taux de positivité de la RT-qPCR est de moins de 50%).

Les IgG sont généralement détectables plus tardivement, habituellement bien détectables 15 jours après le début de l'infection, et leur taux s'accroît progressivement jusqu'à la 5ème ou 6ème semaine après début des symptômes [10-14]

Les données sur la séroconversion dans les cas asymptomatiques et modérément symptomatiques sont forcément peu nombreuses car ce type de patients ne fait que très rarement l'objet de tests sérologiques.

Lorsqu'ils sont présents, les IgM et/ ou IgG sont être un marqueur fiable d'infection silencieuse ou à bas bruit dans cette cohorte peu ou pas symptomatique. Toutefois, le titre en anticorps est très variable d'un patient à l'autre.

Les patients d'âge moyen ou très âgés ont des taux plasmatiques significativement plus élevés que les patients jeunes. A l'inverse, le taux d'anticorps est généralement élevé chez les patients ayant présenté un COVID sévère mais leur caractère neutralisant n'est pas fréquemment évalué

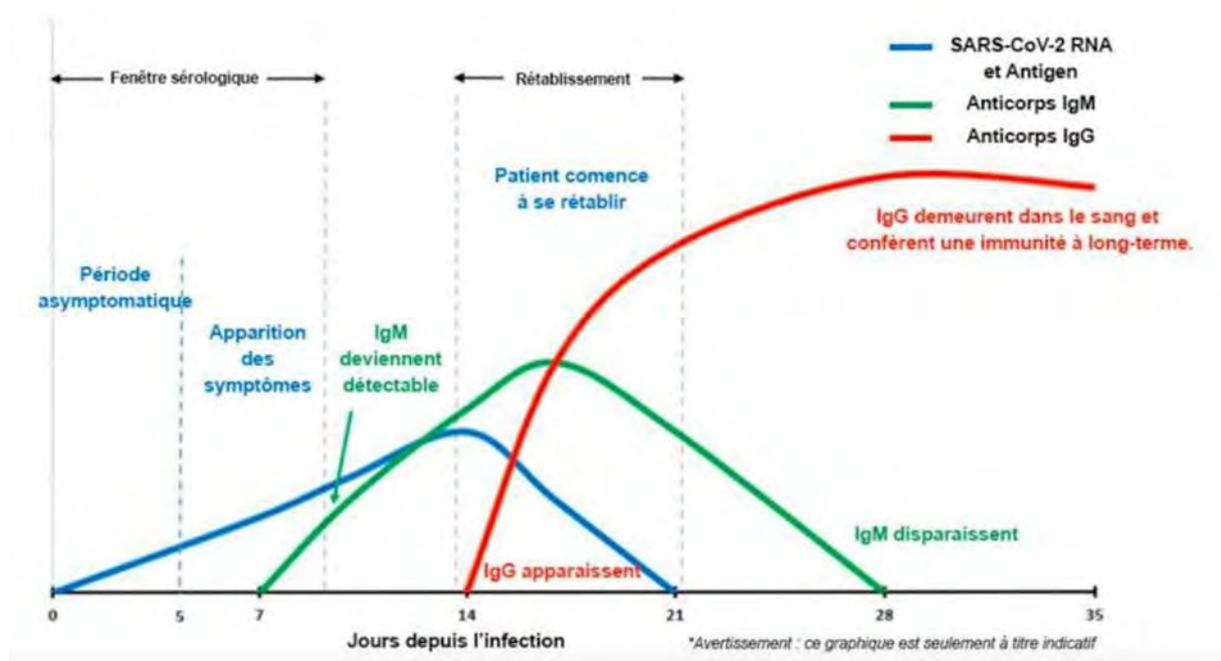


Figure 5 : Cinétique des marqueurs virologiques au cours d'une infection au Sars-Cov2[27]

La séroconversion n'est pas accompagnée de l'élimination direct du virus, mais d'un déclin régulier de la charge virale. La réponse en anticorps ne suffit donc pas à elle seule à éliminer le virus.

Environ 50 % des cas de patients COVID-19 avec des symptômes modérés présentent une séroconversion entre J7-J11 après le début des symptômes.

Le taux de séroconversion chez les patients symptomatiques semble important avec un pic à J14. Chez les patients avec des symptômes légers, le pic d'anticorps semble décalé comme cela a été observé au cours de l'infection par SARS-CoV.

La réponse immunitaire serait plus importante chez les patients âgés de 40 et plus.

Les patients hospitalisés avec des formes sévères présenteraient des anticorps entre 5-6 jours après les premiers symptômes avec une activité neutralisante à partir de 7-14 jours (Grzelak et al.). [25]

Ces résultats sont convergents avec ceux d'une étude chinoise réalisée sur 173 patients hospitalisés chez lesquels seulement 40 % des cas avaient développé des anticorps à J7.

La totalité de ces patients présentaient des anticorps à J15 (Zhao et coll)

Il n'y a pas suffisamment de recul pour apprécier la réponse immunitaire des patients infectés.

Il semble cependant que ceux ayant présenté une forme sévère développent des anticorps plus vite, et avec des titres plus importants que ceux ayant eu des symptômes modérés.

À ce jour, et en l'état actuel des connaissances, il est admis que la détection d'IgM et/ou d'IgG est optimale chez tous les patients à partir de J15.



**DEUXIEME PARTIE : TRAVAIL
EXPERIMENTAL**

I-MATERIELS ET METHODES

I-1-Type et cadre d'étude

Il s'agissait d'une étude prospective analytique, d'une durée de deux mois allant du 1^{er} Février 2021 au 1^{er} Avril 2021. Le recrutement des patients s'était déroulé au niveau du centre de traitement épidémiologique (CTE) du CHNU de Fann et les tests biologiques ont été réalisés au laboratoire de Biochimie-Hématologie

I-2-Population d'étude

Ce travail avait porté sur des patients infectés par le **SARS-CoV-2** suivis au niveau du CTE de l'hôpital FANN

❖ **Critères d'inclusion** : ont été inclus dans cette étude

- Les patients chez qui le diagnostic de la COVID-19 était évoqué sur la base des arguments cliniques et biologiques (RT-PCR positive)
- Les patients déclarés guéris (RT-PCR négative)
- Témoins négatifs des sérums de patients qui n'ont jamais été en contact avec le virus des c'est des sérums conservés de plus de deux ans a moins 20°

❖ **Critères de non-inclusion** : l'étude ne concernait pas les patients déclarés suspects (résultats RT-PCR douteux) en observation au niveau du CTE de l'hôpital FANN

I-3-Prélevements

Les prélèvements sanguins ont été réalisés chez les sujets, au repos et par ponction veineuse au niveau du pli du coude avec garrot. Le sang était recueilli dans un Tube Sec, centrifugé à 3500 tours/5min.

I-4-Parametres étudiés

La recherche des anticorps IgG et/ou IgM anti **SARS-CoV-2** dans le sérum

I-5-Méthodes

I-5-1-kit SARS-CoV-2 Antibody Test (Fabricant: Wondfo®)

Le test Wondfo **SARS-CoV-2 Antibody Test** est basé sur le principe du dosage immunologique de capture pour la détermination des anticorps totaux (**non discriminatif**) anti-SARS-Cov-2 IgM / IgG dans le sang total humain et l'échantillon de plasma. Le kit se présente sous forme d'une boîte (**Figure6**), qui comprend :

- ❖ **20 Tests unitaires (cassette)** en sachet aluminium avec dessicant
- ❖ **20** pipettes de transfert jetables
- ❖ **Flacon** compte-gouttes de solution buffer (1*6ml)
- ❖ **1 notice** qui présente le test et donne les instructions d'utilisation



Figure 6: Boîte de SARS-CoV-2 Antibody Test [27]

I-5-2-Réalisation du test

Les tests ont été réalisés sur des échantillons de sérum en suivant les étapes ci-dessous :

- Porter des gants
- Ramener les échantillons de sérum à la température ambiante
- Ouvrir le sachet de protection du TDR et sortir la cassette en vérifiant sa validité
- Placer la cassette sur une surface plate et propre
- Identifier la cassette avec le numéro de l'échantillon
- Ajouter la quantité (10ul) de sérum selon le fabricant dans le puits d'échantillon (**S**) de la cassette de test, puis ajouter une quantité de tampon d'échantillon dans le puits tampon immédiatement.
- Jeter la pipette dans le conteneur destiné aux déchets biologiques dangereux (DASRI).
- Déclencher le chronomètre et suivre le test à partir de cet instant.
- Laisser incuber à température ambiante et lire les résultats au bout de **15 mn** à la température ambiante entre 15-30°C (ne pas dépasser 20mn).

I-5-3-Interprétation des résultats

Les lectures des tests réalisés ont été effectuées par deux biologistes de manière indépendante avant confrontation. Tous les résultats ont été validés par le biologiste responsable de l'évaluation des tests.

L'interprétation des résultats se fait comme suit :

- ❖ **NÉGATIF** : Si un seul trait apparaît au niveau de la zone contrôle (C); Aucune bande de couleur n'apparaît dans la zone de test.
- ❖ **IgM/IgG POSITIF** : Présence de la bande C et d'une bande test (T). Le résultat traduit la présence d'anticorps anti- SARS-COV-2.
- ❖ **INVALIDE** : Absence de la bande C.



Figure 7: kit SARS-CoV-2 Antibody Test (Fabricant: Wondfo®) [27]

I-6-Automate Iflash 3000, Shenzhen YHLO Biotech

I-6-1-Principe de Dosage

La détection et le titrage des anticorps IgG/IgM anti SARS-CoV-2 se fait par technique Chemiluminescence indirecte selon les étapes suivantes :

- ❖ Des billes magnétiques enduites d'antigène (**phase solide**)
- ❖ Durant l'incubation, les particules paramagnétiques coatées présentes dans la cuvette se lient à l'anticorps (**sérum patient**) cible lié de façon covalente à l'ester d'acridinium.
- ❖ Lorsque la cuvette est exposée à un champ magnétique, les particules paramagnétiques coatées et l'anticorps liés aux particules sont attirés vers les aimants.
- ❖ Tandis que les aimants retiennent les particules paramagnétiques, l'échantillon et le réactif non liés aux particules paramagnétiques sont éliminés par le lavage.

L'émission de lumière est mesurée en unités relatives de lumière (RLUs). Dès que la lumière émise par l'oxydation de l'ester d'acridinium est quantifiée, le système calcule la concentration en analyte

I-6-2-Appareillage



Figure 8: iFlash 3000 , Shenzhen YHLO Biotech

I-6-3-Exploitation statistique

Le logiciel Excel a été utilisé pour le recueil et l'analyse des données.

Les performances des tests ont été évaluées sur la base du calcul de la sensibilité et la spécificité clinique

RESULTATS

II. RESULTATS

II-1- Caractéristiques générales des échantillons testés

Un total de 177 échantillons connus (négatifs et positifs) a été testé avec le kit SARS-CoV-2 Antibody Test (Fabricant : Wondfo®) et sur l'automate Iflash 3000. Le Tableau 4 présente les caractéristiques des différents échantillons testés.

Tableau IV : Échantillons testés

| Types d'échantillons | Nombre |
|---------------------------|--------|
| Témoins négatifs | 75 |
| Patients COVID-19 positif | 27 |
| Patients guéris | 75 |
| Total | 177 |

II-2-Evaluation de la spécificité clinique

Les performances des TDR calculées sur la base des résultats obtenus chez 75 témoins négatifs font ressortir une spécificité globale de 100% pour la détection des Ig anti SARS-CoV-2 (IgG et/ou IgM) (Tableau 5).

Tableau V : Résultats des tests sérologiques chez les témoins négatifs

| Tests sérologiques | FP | VN | Spécificité |
|--------------------------|----|----|-------------|
| Test SARS-CoV-2 Antibody | 0 | 75 | 100% |
| Automate Iflash 3000 | 0 | 75 | 100% |

FP=Faux positif ; VN=Vrais négatifs

II-3-Evaluation de la sensibilité Clinique

L'évaluation de la sensibilité globale (IgG et/ou IgM) chez les témoins positifs (malades et guéris) fait ressortir une sensibilité globale de 83,33% du TDR SARS-CoV-2 Antibody après vérification sur l'automate Iflash 3000 une sensibilité globale de 98,03% a été retrouvée.

Tableau VI : Résultats des tests sérologiques chez les patients positifs (malades et guéris)

| Tests sérologiques | VP | FN | Sensibilité |
|--------------------------|-----|----|-------------|
| Automate Iflash 3000 | 100 | 2 | 98,03 % |
| Test SARS-CoV-2 Antibody | 85 | 17 | 83,33% |

Lorsque la répartition a été faite en fonction du groupe de sujets ; les résultats obtenus avec le TDR SARS-CoV-2 Antibody font ressortir, des sensibilités cliniques de 88,88% et 86,66% respectivement chez les malades et chez les sujets guéris (Tableau 7).

Tableau VII : Tableau de contingence des tests sérologiques chez les malades et guéris

| | | VP | FN | Sensibilité |
|--------------------------|-----------------|----|----|-------------|
| Test SARS-CoV-2 Antibody | COVID-19 + | 24 | 3 | 88,88% |
| | Patients guéris | 65 | 10 | 86,66% |

COMMENTAIRE

L'infection à SARS-CoV-2 appelée COVID-19 (coronavirus disease 2019) est à l'origine de pneumonies potentiellement mortelles d'où l'intérêt d'un diagnostic positif précoce.

La vitesse de propagation du **SARS-CoV-2** a conduit les scientifiques partout dans le monde à mener de nombreuses recherches pour mieux connaître et affronter ce virus redoutable, qualifié par l'OMS d'« ennemi de l'humanité ». La RT-PCR constitue la méthode de première intention pour le diagnostic de l'infection au SARS-CoV-2.

L'épidémie du COVID-19 évoluant en dents de scie dans la majorité des pays associée à l'effet de la vaccination posent ainsi le nouveau challenge d'évaluer l'immunité de la population à grande échelle. De nombreux tests sérologiques aux performances très variables sont proposés, il est nécessaire d'évaluer leurs performances afin de ne pas mésestimer la séroprévalence COVID-19

C'est dans ce contexte que nous nous sommes fixé comme objectif général d'évaluer les performances du test Wondfo SARS-CoV-2 Antibody destiné au diagnostic indirect de l'infection au SARS-COV-2. ce dernier se présente sous forme de tests unitaires, qui détectent les anticorps (IgG et/ou IgM) anti SARSCOV-2. Il est facile à réaliser et les résultats sont disponibles au bout de 15 minutes et sont faciles à interpréter.

L'évaluation au niveau de notre laboratoire a retrouvé une excellente spécificité (100%) similaire à celle retrouvée avec la technique automatisable sur le iflash 3000. L'évaluation de la sensibilité globale (IgG et/ou IgM) chez les patients positifs (malades et guéris) fait ressortir une sensibilité globale de **83,33%** du TDR **SARS-CoV-2** Antibody alors que les mêmes échantillons analysés sur l'automate Iflash 3000 ont révélé une sensibilité globale de 98,03%. Lorsque la répartition a été faite en fonction du groupe de sujets ; les résultats obtenus avec le TDR **SARS-CoV-2** Antibody font ressortir, des sensibilités cliniques de 88,88% et 86,66% respectivement chez les malades et chez les sujets guéris.

Les résultats trouvés dans notre laboratoire sont similaires à ceux présentés dans la notice du fabricant indiquant une spécificité et une sensibilité globale respectivement de 99,57% et 86,43%. L'utilité clinique d'un test TDR sérologique dépend de plusieurs facteurs dont ses performances (sensibilité et spécificité cliniques), le contexte épidémiologique dans lequel il est utilisé (prévalence) et enfin le moment où le test est réalisé en relation avec la cinétique des anticorps au cours de la maladie.

La cinétique de production des anticorps contre le virus est encore aujourd'hui mal caractérisée principalement chez les patients asymptomatiques, la durée de protection éventuelle est également mal connue. Il est primordial que les tests sérologiques puissent être validés sur leurs premières performances analytiques et cliniques dès aujourd'hui avant leur

achat et leur utilisation en routine. La haute autorité de santé définit des critères de qualité et d'exigence vis-à-vis de l'ensemble des tests sérologiques détectant les anticorps spécifiques dirigés contre le **SARS-CoV-2** afin de faciliter leur développement et leur évaluation, elle considère que les valeurs seuils minimales sont estimées à 98 % pour la spécificité clinique et à 90 % ou 95 % selon l'usage du test pour la sensibilité clinique.

CONCLUSION

En réponse à la pandémie croissante de COVID-19, une multitude de tests sérologiques ont été mis au point pour détecter des anticorps spécifiques de nature IgG et IgM dirigés contre le virus du SARS-CoV-2. Deux types de tests sont actuellement disponibles [63] : les tests quantitatifs avec titrage des anticorps par dosage immunoenzymatique (ELISA) et les tests qualitatifs faciles à utiliser, principalement basés sur l'immunochromatographie. L'utilité clinique d'un test TDR sérologique dépend de plusieurs facteurs dont ses performances (sensibilité et spécificité cliniques), le contexte épidémiologique dans lequel il est utilisé (prévalence) et enfin le moment où le test est réalisé en relation avec la cinétique des anticorps au cours de la maladie. Les tests de diagnostics rapides ont des indications précises dans le cadre de la lutte contre la COVID-19, toutefois leur fiabilité est très souvent remise en question. C'est dans ce contexte que nous nous sommes fixés comme objectif d'étude d'évaluer les performances (sensibilité, spécificité) du TDR SARS-CoV-2 Antibody[®] destiné au diagnostic de l'infection au SARS-CoV-2.

L'exploration des données de notre étude nous a permis de trouver une spécificité de 100%. La sensibilité globale (IgG et/ou IgM) chez les patients infectés et les patients guéris faisait ressortir un taux de **83,33%** avec le kit TDR SARS-CoV-2 Antibody[®]. Lorsque la répartition de la population d'étude a été faite en fonction de ces deux groupes de sujets ; les résultats de la sensibilité obtenus avec le TDR SARS-CoV-2 Antibody[®] étaient de 88,88% et 86,66% respectivement chez les sujets infectés et chez les sujets guéris. De plus, les résultats trouvés dans notre laboratoire sont superposables à ceux présentés dans la notice du fabricant indiquant une spécificité et une sensibilité globale respectivement de 99,57% et 86,43. Cependant, ces résultats retrouvés avec le kit TDR SARS-CoV-2 Antibody[®] ne s'alignent aux exigences de la Direction des Laboratoires (Sénégal) qui exige un taux de sensibilité de 90% et de spécificité de 95%.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1-Baay M , Bruno L, Arnaud F, Arnaud M, Melanie S, Philippe D. « SARS-CoV-2: Vir,Epid,Imm and Vacc Dev ».Biol 2020; 66 : 35-40[Consulté le 06/07/2021] disponible à partir d'URL. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2020.06.005>.

2-Bonny V, Maillard A, Mousseaux C, Plaçais L, Richier Q. « COVID-19 : physiopathologie d'une maladie à plusieurs visages ». La Revue de Médecine Interne 41, n° 6 (juin 2020): 375-89. [Consulté le 06/07/2021] disponible à partir d'URL <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2020.05.003>.

3- Hadjadj J, Nader Y, Barnabei L, Corneau A, Boussier J, Pere H. Impaired type I interferon activity and exacerbated inflammatory responses in severe Covid-19 patient [Consulté le 06/07/2021] disponible a partir d'URL: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.04.19.20068015v1>.

4- Miriam E, Kanta S, Stephen M, Deborah R. Inactivation of the coronavirus that induces severe acute respiratory syndrome. SARS-CoV Journal of Virological Methods 121 (2004) 85-91

5- Helena F, Ron K , Daniella V, Rita C Barbara C. « Immune-Mediated Approaches against COVID-19 ». Nature Nanotechnology 15, n° 8 (août 2020): 630-45. [Consulté le 06/07/2021] disponible à partir d'URL: <https://doi.org/10.1038/s41565-020-0732-3>.

6- Mihayl V, Raphaël D « Human Coronaviruses: Insights into Environmental Resistance and Its Influence on the Development of New Antiseptic Strategies ». Viruses 4, n° 11 (12 novembre 2012): 3044-68. [Consulté le 06/07/2021] disponible a partir d'URL <https://doi.org/10.3390/v4113044>.

7-Jamai A , Zina L, Ghita Y, Mustapha M « Covid-19 : virologie, épidémiologie et diagnostic biologique ». Option/Bio 31, n° 619-620 (juillet 2020): 15-20. [Consulté le 06/07/2021] disponible a partir d'URL [https://doi.org/10.1016/S0992-5945\(20\)30178-1](https://doi.org/10.1016/S0992-5945(20)30178-1).

8-Bonny V , Maillard A, Mousseaux C, Plaçais L, Richier Q. « COVID-19 : physiopathologie d'une maladie à plusieurs visages ». La Revue de Médecine Interne 41, n° 6 (juin 2020): 375-89. [Consulté le 06/07/2021] disponible a partir d'URL <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2020.05.003>.

9 Plaçais, L ,Richier Q « COVID-19 : caractéristiques cliniques, biologiques et radiologiques chez l'adulte, la femme enceinte et l'enfant. Une mise au point au cœur de la pandémie ». La Revue de Médecine Interne 41, n° 5 (mai 2020): 308-18. - [Consulté le 06/07/2021] disponible a partir d'URL <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2020.05.003>.<https://doi.org/10.1016/j.revmed.2020.04.004>.

10- Van Doremalen N, Bushmaker T, Morris DH,. Aerosol and Surface Stability of SARSCoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. N Engl J Med. 2020;382(16):1564-1567.

11-Jie-Ming,Q, Bin C, Rong-Chang C. « Clinical Features of COVID-19 ». In COVID-19, 13-39. Elsevier, 2021. [Consulté le 06/07/2021] disponible a partir d'URL <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824003-8.00003-6>.

12-Mahieu R, Vincent D. « Caractéristiques cliniques et épidémiologiques de la Covid-19 ». *Actualités Pharmaceutiques* 59, n° 599 (octobre 2020): 24-26. [Consulté le 06/07/2021] disponible à partir d'URL <https://doi.org/10.1016/j.actpha.2020.08.006>.

13-Ravaoarisoa E., Andriamiandranoro T, Raherinjafy R, Jahevitra M, Razanatsiorimalala S, Andrianaranjaka V, Randrianarivehojosia M. « Évaluation de la performance du test de diagnostic rapide du paludisme OnSite à Miandrivazo, Madagascar ». *Bulletin de la Société de pathologie exotique* 110, n° 4 (octobre 2017): 254-59. [Consulté le 06/07/2021] disponible à partir d'URL <https://doi.org/10.1007/s13149-017-0568-8>.

14-Lacroix A. « La détection et la caractérisation de coronavirus et astrovirus chez les chiroptères au Cambodge et au Laos », s. d., 380.

15-Andreani J, Boschi C, Raoult D, Colson B, La Scola. « Épidémiologie des Coronavirus 229E dans les infections respiratoires ». *Médecine et Maladies Infectieuses* 50, n° 6 (septembre 2020): S161. [Consulté le 06/07/2021] disponible à partir d'URL <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2020.06.344>.

16- Qin C, Zhou L, Hu Z, Zhang S, Yang S, Tao Y. Dysregulation of immune response in patients with COVID-19 in Wuhan, China. *Clin Infect Dis* 2020, [Consulté le 06/07/2021] disponible à partir d'URL <http://dx.doi.org/10.1093/cid/ciaa248>.

17- Ferreira D, Eduardo C, Pablo E, Bonvehi D. « Algorithms for Testing COVID-19 Focused on Use of RT-PCR and High-Affinity Serological Testing: A Consensus Statement from a Panel of Latin American Experts ». *International Journal of Infectious Diseases* 103 (février 2021): 260-67. [Consulté le 06/07/2021] disponible à partir d'URL <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.11.173>.

18- Waked, R., Makhoul J, Saliba G « Are Two Consecutive Negative RT-PCR Results Enough to Rule out COVID-19? » *New Microbes and New Infections* 37 (septembre 2020): 100750. [Consulté le 06/07/2021] disponible à partir d'URL <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2020.100750>.

19- Mahieu R, Vincent D « Caractéristiques cliniques et épidémiologiques de la Covid-19 ». *Actualités Pharmaceutiques* 59, n° 599 (octobre 2020): 24-26. [Consulté le 06/07/2021] disponible à partir d'URL <https://doi.org/10.1016/j.actpha.2020.08.006>.

20-Marian A, Anita M, Alex R, Marleen J. « Clinical Features and Prognostic Factors in Covid-19-A Prospective Cohort Study ». *EBioMedicine* 67 (mai 2021): 103378. [Consulté le 06/07/2021] disponible à partir d'URL <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103378>.

21- Pondaven-Letourmy, S, Alvin F, Boumghit Y, Simon F. « Comment réaliser un prélèvement rhinopharyngé chez l'adulte et l'enfant en période de la pandémie de la maladie COVID-19 ». *Annales françaises d'Oto-rhino-laryngologie et de Pathologie Cervico-faciale* 137, n° 4 (septembre 2020): 301-3. [Consulté le 06/07/2021] disponible à partir d'URL <https://doi.org/10.1016/j.aforl.2020.06.001>.

- 22- Bonny V, Maillard A, Mousseaux C, Plaçais L** « COVID-19 : physiopathologie d'une maladie à plusieurs visages ». *La Revue de Médecine Interne* 41, n° 6 (juin 2020): 375-89. [Consulté le 06/07/2021] disponible à partir d'URL <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2020.05.003>.
- 23- Mahieu R ,Vincent D** « Caractéristiques cliniques et épidémiologiques de la Covid-19 ». *Actualités Pharmaceutiques* 59, n° 599 (octobre 2020): 24-26. [Consulté le 06/07/2021] disponible a partir d'URL <https://doi.org/10.1016/j.actpha.2020.08.006>.
- 24-Greffé S, Espinasse F, Duran C, Labrune S** « Évaluation Par RT-PCR Du Portage Nasopharyngé Du SARS-Cov-2 Chez Les Personnels de Santé Symptomatiques Suspects de COVID-19 Dans Un CHU de La Banlieue Parisienne ». *La Revue de Médecine Interne* 41, n° 8 (août 2020): 510-16. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2020.06.017>.
- 25- Koçak, F , Jean-Michel M.** « La place du pharmacien dans la détection de la Covid-19 ». *Actualités Pharmaceutiques* 59, n° 601 (décembre 2020): 41-43. [Consulté le 06/07/2021] disponible a partir d'URL <https://doi.org/10.1016/j.actpha.2020.10.023>.
- 26- Sakamaki I, Yoshitomo M, Hideki T, Yusuke T, Yasutaka F, Hitoshi K, Akitoshi U.** « Monitoring of Viral Load by RT-PCR Caused Decision Making to Continue ECMO Therapy for a Patient with COVID-19 ». *Journal of Infection and Chemotherapy* 26, n° 12 (décembre 2020): 1324-27. [Consulté le 06/07/2021] disponible a partir d'URL <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2020.08.014>.
- 27- Trisnawati I, Riat E, Dyah A.** « Prolonged Nucleic Acid Conversion and False-Negative RT-PCR Results in Patients with COVID-19: A Case Series ». *Annals of Medicine and Surgery* 59 (novembre 2020): 224-28. <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2020.09.040>.
- 28- Isikba, M , Travis S, Henry J .** « When to Rule out COVID-19: How Many Negative RT-PCR Tests Are Needed? » *Respiratory Medicine Case Reports* 31 (2020): 101192. [Consulté le 06/07/2021] disponible a partir d'URL <https://doi.org/10.1016/j.rmcr.2020.101192>.
- 29-Qin C, Zhou L, Hu Z, Zhang S, Yang S, Tao Y.** Dysregulation of immune response in patients with COVID-19 in Wuhan, China. *Clin Infect Dis* 2020, [Consulté le 06/07/2021] disponible a partir d'URL <http://dx.doi.org/10.1093/cid/ciaa248>.
- 30- Pan A , Liu L , Wang C.** Association of Public Health Interventions With the Epidemiology of the COVID-19 Outbreak in Wuhan, China. *JAMA*. 2020.
- 31- Matthew B** Le cycle viral de SARS-CoV-2. Institut Mondor de Recherche Biomédicale – Université Paris-Créteil[Consulté le 06/07/2021] disponible a partir d'URL (<http://arbre-des-connaissances-apsr.org/2020/05/29/le-cycle-viral-de-sars-cov-2/>)
- 32- Du Z, Zhu F, Guo F, Yang B, Wang T.** Detection of antibodies against SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Journal of Medical Virology*. 2020. [Consulté le 06/07/2021] disponible a partir d'URL <https://doi.org/10.1002/jmv.25820> PMID: 32243608