



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

En vue de l'obtention du Diplôme de Docteur en Pharmacie

Présenté et soutenu publiquement
Le 08 mars 2021

Thème

Epidémie COVID-19 : Expérience du laboratoire de diagnostic moléculaire de l'UMMTO dans la réponse et la gestion de la crise sanitaire au niveau de la wilaya de Tizi-Ouzou

Réalisé par: *AIT-CHAUCHE Adel AISSAOUI Juba*

Encadré par : *Dr. DJERBOUA Taoufik*

Membres de jury

Pr S.DAOUDI	Professeur Chef du Service de Neurologie de L'hôpital Belloua, CHUTO et Recteur de UMMTO	Président de jury
Pr A.TALEB	Professeur Chef de Service de Réanimation médicale au CHUTO et Doyen De La Faculté De Médecine De Tizi-Ouzou	Examineur
Pr A.TIBICHE	Professeur en Epidémiologie au Service D'épidémiologie et Médecine Préventive CHUTO	Examineur
Dr D.L. ANES BOULAHBAL	Directeur du Laboratoire des Entérovirus , Laboratoire de Référence National OMS pour la Surveillance des Entérovirus et de la Poliomyélite, IPA Annexe Sidi-Ferruche.	Examinatrice

REMERCIEMENT

La réalisation de ce travail a été possible grâce au concours de plusieurs personnes à qui nous voudrions témoigner toute notre reconnaissance.

Avant tout, nous tenons à remercier « *Dieu* » le tout puissant et miséricordieux, de nous avoir donné la volenté, la force, le courage et la patience, pour mener à terme notre travail.

Nous voudrions d'abord adresser toute notre gratitude à notre encadreur, *Dr Djerboua Taoufik*, pharmacien maître-assistant hospitalo-universitaire en Microbiologie clinique à l'université de Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou et chef de service du laboratoire du diagnostic moléculaire SARS-CoV-2, pour sa patience, sa disponibilité, et surtout pour son soutien et ses judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter notre réflexion durant toute la période du travail.

Nous sommes très touchés par l'honneur que vous nous avez fait, en acceptant de nous confier ce travail. Nous serons toujours reconnaissants envers vous cher docteur. Nous espérons avoir mérité votre confiance.

Au *Pr Daoudi Smail*, Recteur de l'université Mouloud Maameri de Tizi Ouzou et chef de service de Neurologie à l'unité Balloua du CHUTO, pour nous avoir permis d'intégrer l'équipe du laboratoire et aussi pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant d'évaluer notre travail et de présider le jury.

Au *Pr Taleb Ammar*, Doyen de la faculté de médecine de l'université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou et chef de service de Réanimation au niveau du CHU Nedir Mohamed T.O, d'avoir accepté d'examiner notre travail.

Au *Pr Tibiche Arezki*, médecin épidemiologiste au niveau du service d'épidémiologie et médecine préventive du CHU Nedir Mohamed T.O, d'avoir accepté d'examiner notre travail.

Au *Dr Anes-Boulahbal Leila*, Chef du laboratoire de référence OMS des entérovirus et de la poliomyélite, IPA annexe sidi-ferruche, en acceptant d'évaluer notre travail.

Au *Dr Benadda Samia Nesrine*, pharmacienne maître assistante hospitalo-universitaire au niveau de l'EHS El Aadi Flici (El Kettar) d'Alger, d'avoir accepté d'examiner notre travail.

Un grand merci à toute l'équipe du laboratoire SARS-CoV-2 UMMTO : *Dr N. Belkaid, Mme D. Sennani et Dr A. Toudert*, pour leur aide, encouragement et bienveillance.

Au *Pr Messoudi Abdelkrim*, Chef de service de psychiatrie et de l'école de formation psychiatrique de l'EHS Mahfoud Boucebci, Cheraga Alger, et ancien Doyen de la faculté de médecine de l'UMMTO, de nous avoir facilité toutes les procédures administratives.

Aux collaborateurs du laboratoire : **Cevital, NovoNordisk, Institut Pasteur d'Alger , BATIVERT, Briqueterie Izerkhef, Moderne Santé, la Wilaya de TO et le CHUTO.**

Aux collègues : *Dr Yata Nabila, Pr Ait Abdelkader Belaid, Mr Hamaz Abdelghani*

Des remerciements très particuliers vont à nos collègues *Hdjira et Kahina*, pour toute l'aide qu'elles nous ont apportée.

Enfin, à toute personne ayant contribué directement et indirectement à la réalisation de ce travail, ainsi que tous ceux qui nous ont accompagné durant tout notre cursus universitaire, vous avez toute notre gratitude.

Mot de l'encadreur

Au jour de la rédaction de ce mémorandum, notre laboratoire aura une année d'existence et d'activité de lutte contre la COVID-19.

Semblant sortie de nulle part, cette pandémie pourtant s'inscrit dans le cours naturel de l'évolution des maladies infectieuses et de l'interaction de l'homme avec son environnement, rien qu'entre l'an 2000 à ce jour, nous avons assisté à l'éclosion de plusieurs pandémies et épidémies à large diffusion : Le SARS-CoV-1 entre 2002 et 2004, la Grippe porcine entre 2009 et 2010, Ebola entre 2013 et 2016, le MERS-CoV depuis 2012 et le SARS-CoV-2 depuis 2019 pour ne citer que ceux-là.

L'Algérie n'est pas à l'abri de ce qui se passe dans le monde et doit être préparée à répondre au mieux en cas de risque d'introduction d'un agent émergent, ou en cas d'émergence locale de maladies infectieuses à risque épidémique comme cela a été le cas avec le Choléra en 2018.

Dans ces situations, les laboratoires de Microbiologie sont la base d'une réponse rapide et efficace, ces derniers doivent cependant être correctement équipés, au même niveau que les laboratoires des pays développés en particulier en matière de biologie moléculaire et génomique et placés à des niveaux stratégiques couvrant l'ensemble du territoire national.

Ce mémoire concentre l'expérience acquise après le traitement de plus de 15 000 prélèvements et d'innombrables situations difficiles, pour constituer un guide pratique qui pourra être utilisé en cas de besoin.

Notre expérience nous a permis de maintenir une activité stable et continue même pendant les moments les plus critiques qui nous ont amené à développer des techniques et des astuces précieuses en temps de grandes demandes.

Grâce à l'aide précieuse des internes en charge de ce mémoire, et qui ont fait le sacrifice colossal d'abandonner leur premier mémoire pourtant terminé pour m'aider à accomplir cet objectif : *Mr J. Aissaoui* et *Mr A. Ait Chaouche*, et sans qui il aura été tout simplement impossible de le faire, j'estime que cet objectif est atteint, eux-mêmes étant solidement formés, la relève est assurée, que ce document soit un vibrant hommage à leur dévouement.

DÉDICACE

Je remercie tout d'abord DIEU tout puissant de m'avoir donné le courage, la force et la patience d'achever ce modeste travail

A MA TRÈS CHÈRE MÈRE : Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour vous. Vous m'avez comblé avec votre tendresse et affection tout au long de mon vie. Vous n'avez cessé de me soutenir et de m'encourager, vous avez toujours été présente à mes côtés pour me consoler quand il fallait. En ce jour mémorable, pour moi ainsi que pour vous, reçoit ce travail en signe de ma vive reconnaissance et ma profonde estime. Puisse le tout puissant te donner santé, bonheur et longue vie afin que je puisse vous combler à mon tour.

A MON TRÈS CHER PÈRE : Autant de phrases et d'expressions aussi éloquentes soit-elles ne sauraient exprimer ma gratitude et ma reconnaissance. Votre patience sans fin, votre compréhension et votre encouragement sont pour moi le soutien indispensable que vous avez toujours su m'apporter. Je te dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon mieux pour rester votre fierté et ne jamais te décevoir. Que Dieu le tout puissant te préserve, t'accorde santé, bonheur, quiétude de l'esprit et te protège de tout mal.

A mon petit frère **Aghiles**, mes sœurs **Massiva** et **Mélissa** sur qui j'ai pu et pourrai compter dans le futur, puissions-nous rester unis et solidaires.

A mes tantes **Zohra** et **Saliha**, mes deuxièmes mamans, celles, qui m'ont soutenue, encouragé et forgé, vous êtes un symbole de mon enfance que DIEU vous protège

A la mémoire de mes grands-parents paternel qui ont été et resterai toujours dans mon esprit et mon cœur

A mes grands-parents maternels je vous souhaite santé et longue vie

A mes chère tantes **Mharzia** et **Abla** j'aurais tellement aimé que vous soyez présentes à mes côtés, soit l'expression des vœux que vous n'avez cessé de formuler dans vos prières. Que Dieu vous préserve santé et longue vie.

A mes meilleurs amis **Hadjira**, **Kahina**, **Samia**, **Nesrine**, **Lamine**, **M'barek**, **Amine** et **Mehdi**, ma deuxième famille, je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection et mes pensées

En témoignage de l'amitié qui nous unit et des souvenirs de tous les moments que nous avons pensés ensemble je vous souhaite une vie pleine de santé bonheur et succès

A mon binôme, non seulement mon ami mais le grand frère que je n'ai pas eu **Adel** sans qui rien n'aurait été possible. Ma modeste contribution à ce travail ne saurait exprimer toute la gratitude que je porte à vous qui aurez eu à me supporter plus que quiconque.

Ainsi qu'à tous mes camarades et collègues pharmaciens que j'ai connus de près ou de loin

Juba AISSAOUI

DÉDICACE

Louange à Dieu tout puissant, qui m'a permis de voir ce jour tant attendu.

Je dédie ce mémoire :

A ma chère maman « Bessou Nadia », celle qui m'a donné la vie, m'a élevé, qui a tout sacrifié pour que j'ai la chance d'arriver là où je suis. Celle qui a toujours été présente pour moi, qui m'a toujours soutenu et qui m'a toujours poussé vers la réussite. Aucun mot ne pourrait exprimer tous les sentiments que je te porte.

A mon cher papa « Nacer Eddine », qui est mon exemple dans la vie, celui qui n'a ménagé aucun effort dans mon éducation, qui m'a toujours appris et inculqué le vrai sens du travail et des responsabilités, tu as travaillé toute ta vie pour pouvoir nous assurer le meilleur avenir que nous puissions avoir. Aucune dédicace ne pourrait exprimer toute la considération et respect que j'ai pour toi.

A mes deux chers petits frères « Alaa Eddine » et « Lyes », qui ont toujours répondu présents pour m'accompagner dans les moments les plus importants de ma vie, et de me soutenir dans les moments les plus difficiles. Puissent nos liens fraternels se consolider et se pérenniser encore plus.

A la mémoire de mon grand père maternelle « Saïd » - que Dieu l'accueille dans son vaste paradis -, pour tout ses encouragements le long de mon parcours scolaire et universitaire, merci pour toute la générosité dont tu faisais part, d'avoir toujours œuvré à m'encourager et à aller de l'avant. Puisse-t-il être fier de ce travail.

A mon grand père paternelle « Saïd », merci d'avoir toujours œuvré à m'encourager et à aller de l'avant. Que Dieu le Tout Puissant vous garde et vous procure santé et bonheur.

A mes grand-mère « Yamina » et « Hamida », qui n'ont jamais manqué une occasion de m'encourager à accomplir de grandes choses. Que Dieu le Tout Puissant vous garde et vous procure santé et bonheur.

A mes deux oncles « Slimane » et « Makram », à mes tantes « Hakima », « Farida », « Nawel », « Sanaa », « Saadia » et à « ma grande sœur Asma », aucun langage ne saurait exprimer mon respect et ma considération pour votre soutien et encouragements. Je vous dédie ce travail en reconnaissance de l'amour que vous

m'offrez et votre bonté exceptionnelle. Que Dieu le Tout Puissant vous garde et vous procure santé et bonheur.

A mon meilleur ami « M. M^{ed} el mehdi », merci de m'avoir accompagné durant toute ces années, d'avoir toujours été là à mes côtés, merci pour les aventures, les fous rires, les sorties et toutes ces journées passées avec toi. Merci pour ces moments de bonheur, de joie et de souffrance et de déprime parfois, ces souvenirs seront gravés à jamais dans ma mémoire et j'espère vous avoir toujours dans ma vie, votre présence est indispensable ; Je vous souhaite plein de réussite et d'épanouissement dans ta vie.

A mes amis « Juba », « M'barek », « Amine » et « Mehdi », mes frères du combat tout au long de ces 6 ans, j'espère vous avoir toujours dans ma vie ; Je vous souhaite plein de réussite et d'épanouissement dans vos vie repectives.

A mes collègues et amies « Hadjira » et « Kahina », pour cette année merveilleuse que j'ai passé avec vous ; et pour toute l'aide que vous m'avez apporté, merci à vous.

A mes amis « Rym », « Samia », « Yasmine », « Tina », « Sarah » et « Walid ».

A tous ceux dont je ne citerai pas le nom car en citer un m'en ferait oublier dix, à ceux qui m'ont accompagné durant ces 24 dernières années pendant plus ou moins de temps, à mes amis d'enfance que je n'aurai certainement plus l'occasion de revoir, à ceux avec qui j'aurai expérimenté la vie, à ceux qui m'ont aidé à me construire et arriver à maturité, à ceux vers qui je me suis tourné dans les moments difficiles et qui m'ont apporté support et conseil, à ceux avec qui j'ai partagé ces 6 dernières années, ceux que j'ai eu du mal à quitter ou ceux que j'aurais aimé apprendre à connaître, ceux qui m'ont appris ou ceux à qui j'ai transmis, ceux avec qui je me serais amusé ou ceux avec qui j'aurais travaillé, ceux qui m'auront aimé ou ceux qui m'ont détesté. Vous m'avez tous marqué d'une manière que je n'exprimerai probablement jamais et chacun de vous aura participé à façonner celui qui, aujourd'hui, n'a pas les mots pour vous remercier.

AIT-CHAOUCHE Adel

Table de matière

Remerciement

Mot de l'encadreur

Dédicace

Table de matière	i
Liste des abréviations	ix
Liste des figures	xv
Liste des tableaux	xviii
Liste des annexes.....	xix
Introduction	1

PARTIE THEORIQUE

Chapitre I : virologie du SARS-CoV-2 et les autres coronavirus humains

1	Le concept de zoonose : l'émergence d'un agent pathogène animal dans la population humaine	2
2	Historique de découverte des coronavirus	3
3	Taxonomie et classification du SARS-CoV-2	3
4	Origine du virus SARS-CoV-2	4
5	Caractères virologiques du SARS-CoV-2	6
5.1	Organisation du génome	6
5.2	Les protéines de structure	7
5.3	Les protéines non structurales	8
6	Mutations et variants émergents.....	10
6.1	Variants du SARS-CoV-2	10
6.1.1	D614G	10
6.1.2	Cluster 5	10
6.1.3	Variant Britannique (VOC-202012/01)	11
6.1.4	Variant Sud-Africain (501-V2)	11
6.1.5	Variant Brésilien (B.1.1.248)	11
6.1.6	Variant Californien CAL.20C	11
7	Récepteurs et cellules sensibles	11
7.1	Récepteurs	11

Table de matière

7.1.1	L'enzyme de conversion de l'angiotensine 2	11
7.1.2	Neuropiline-1	11
7.1.3	TMPRSS2.....	12
7.2	Cellules sensibles.....	12
8	Cycle de réplication du SARS-CoV-2	13
8.1	Entrée dans la cellule hôte	14
8.2	Réplication virale.....	14
8.2.1	Traduction primaire du génome	14
8.2.2	La transcription de l'ARN viral.....	14
8.3	Expression des protéines structurales et accessoires	14
8.4	Libération de nouveaux virions	15

Chapitre II : La COVID -19

1	Définition de la COVID-19	16
2	Epidémiologie	16
2.1	Durée d'incubation	16
2.2	Contagiosité	16
2.3	Transmission.....	16
2.4	Létalité.....	17
2.5	Facteur de risque d'infection au COVID-19	17
3	Physiopathologie de la COVID-19	17
3.1	Rappel sur le système Rénine Angiotensine-Aldostérone (RAA).....	17
3.2	Interactions SARS-CoV-2 – Récepteur et implication dans le développement de la maladie.....	18
3.3	Tropisme cellulaire du SARS-CoV-2.....	20
3.3.1	In Vitro	20
3.3.2	In Vivo.....	20
3.4	Réponse immunitaire anti SARS-CoV -2 et rôle dans le développement des lésions d'organe	20
3.4.1	Immunité innée.....	20
3.4.2	Hypersécrétion cytokinique.....	21
3.4.3	Signature interféron.....	21
3.4.4	Immunité adaptative au SARS-CoV-2	22
3.4.4.1	La réponse TCD4+.....	22
3.4.4.2	La réponse TCD8+.....	23

Table de matière

3.4.4.3	Réponse à lymphocytes B et anticorps	23
3.4.4.4	Rôle de l'immunité adaptative dans l'immunopathologie de la COVID-19 24	
3.5	Interaction Virus-Immunité et développement de la coagulopathie liée à la COVID-19	24
3.6	L'immunité croisée.....	25
3.7	La réinfection.....	25
4	Caractéristiques cliniques, biologiques et radiologiques du COVID-19	26
4.1	Définition de cas COVID-19	26
4.2	Formes cliniques de la COVID-19	27
4.2.1	Incubation et formes asymptomatiques.....	27
4.2.2	Les formes symptomatiques.....	27
4.2.2.1	La COVID-19 bénigne.....	27
4.2.2.2	La COVID-19 modérée.....	28
4.2.2.3	La COVID-19 sévère et SDRA.....	28
4.3	Facteur de risque de complication	29
5	Traitement et thérapeutique	30
5.1	Inhibition de l'entrée du SARS-CoV-2 dans la cellule	32
5.1.1	Chloroquine et hydroxychloroquine.....	32
5.1.2	L'azithromycine	32
5.1.3	Enzyme 2 recombinante de conversion de l'angiotensine humaine (APN01) ...	32
5.1.4	Umifenovir (Chlorhydrate d'arbidol /Arbidol).....	33
5.2	Inhibition de la synthèse de l'ARN viral	33
5.2.1	Remdesivir	33
5.2.2	Favipiravir	33
5.3	Inhibition la protéase virale	34
5.3.1	Ivermectine.....	34
5.3.2	Lopinavir / Ritonavir.....	34
5.4	Les agents immunomodulateurs	34
5.4.1	Les anti-interleukines	34
5.4.2	Le plasma convalescent COVID-19.....	35
5.4.3	Les immunoglobulines polyvalentes	35
5.4.4	Les IFN.....	35
5.4.5	Les corticostéroïdes /AINS	36
5.5	Vaccin.....	36
6	Prévention	37

Table de matière

Chapitre III : Diagnostic virologique et suivi de l'évolution de l'infection et la pandémie SARS-CoV-2

1	Etapes pré-analytiques	38
1.1	Prélèvement	38
1.2	Conditionnement et acheminement	39
1.3	Fiche de renseignements.....	39
2	Diagnostic biologique de l'infection au SARS-Cov-2.....	40
2.1	Diagnostic indirect : La sérologie.....	40
2.2	Diagnostic spécifique direct	41
2.2.1	Culture cellulaire virale	41
2.2.2	Détection d'antigènes intracellulaire.....	41
2.3	Diagnostic spécifique direct par biologie moléculaire	42
2.3.1	Préparation des échantillons pour le diagnostic moléculaire	42
2.3.1.1	Création du lysat	42
2.3.1.1.1	Méthodes physiques.....	43
2.3.1.1.2	Méthodes chimiques	43
2.3.1.1.3	Méthodes enzymatiques.....	43
2.3.1.2	Lavage.....	43
2.3.1.3	Elution.....	43
2.3.2	Polymérase chaine réaction.....	44
2.3.2.1	Application de la PCR dans le diagnostic de l'infection SARS-CoV-2 : LA PCR en temps réel (qRT-PCR)	45
2.3.2.2	Le multiplexage	48
2.3.2.3	Les gènes cible chez le SARS-CoV-2.....	48
2.3.2.4	Contrôle qualité.....	48
2.3.3	Autres techniques appliquées au diagnostic de la COVID-19.....	49
2.3.3.1	Techniques d'amplification isotherme.....	49
2.3.3.1.1	RT-LAMP	49
2.3.3.1.2	Puces à ADN.....	50
2.3.4	Séquençage.....	50
2.3.4.1	Classique.....	51
2.3.4.1.1	Methode de sanger	51
2.3.4.2	NGS (Next Generation Sequencing).....	51
2.3.4.2.1	Séquençage de 2 ^{ème} génération	51
2.3.4.2.1.1	Pyroséquençage 454 de Roche.....	52
2.3.4.2.1.2	Solexa/illumina.....	52

Table de matière

2.3.4.2.1.3	Solid d'Applied Biosystems.....	52
2.3.4.2.1.4	Autres techniques de seconde génération.....	52
2.3.4.2.2	Séquençage de troisième génération.....	54
2.3.4.2.2.1	Technologies des nanopores.....	54
2.3.4.2.2.2	Plateforme de Pacific Biosciences.....	55
2.3.4.2.2.3	Starlight.....	55
2.3.4.3	Avantage et inconvénient des NGS par rapport aux méthodes de séquençage «classique».....	56

PARTIE PRATIQUE

Rappel des objectifs.....	57
---------------------------	----

CHAPITRE I : matériel et méthodes

1	Type d'étude.....	58
2	Population d'étude.....	58
2.1	Critères d'inclusion.....	58
2.2	Critères de non inclusion.....	58
2.3	Critères d'exclusion.....	58
3	Ethique.....	58
4	Conception du laboratoire.....	59
5	Matériel et méthodes.....	60
5.1	Matériel.....	60
5.1.1	Appareillage.....	60
5.1.1.1	Appareils de sécurité microbiologique.....	60
5.1.1.2	Appareils d'agitation et de centrifugation des échantillons.....	60
5.1.1.3	Automates d'extraction.....	61
5.1.1.4	Automates d'amplification.....	61
5.1.1.5	Appareils informatiques et logiciels.....	62
5.1.1.6	Appareils de conservations des réactifs et des échantillons.....	62
5.1.1.7	Appareils utilisés pour le nettoyage et la stérilisation.....	62
5.1.2	Le consommable.....	63
5.1.2.1	Equipements de protection individuelle (EPI).....	63
5.1.2.2	Matériel de prélèvement et transport d'échantillons.....	64
5.1.2.3	Produits d'hygiène et d'antiseptie pour les personnes.....	64
5.1.2.4	Produits de désinfection de l'environnement de travail.....	64

Table de matière

5.1.2.5	Matériel utilisé dans la collecte des déchets	65
5.1.2.6	Matériel, réactifs et consommable utilisés pour l'étape d'extraction	66
5.1.2.7	Matériel, réactifs et consommable utilisés pour l'étape d'amplification	68
5.1.3	Petit matériel de laboratoire	68
5.1.3.1	Verrerie	68
5.1.3.2	Micropipettes	69
6	Méthodes.....	70
6.1	La sécurité au laboratoire SARS-CoV-2	70
6.1.1	Normes d'hygiène	70
6.1.2	Normes vestimentaires et de circulation du personnel.....	70
6.1.3	Traitement des déchets	71
6.1.4	Circuit des prélèvements et de l'information	73
6.1.4.1	Circuit des prélèvements	74
6.1.4.2	Circuit de l'information	74
6.2	Réception, enregistrement et préparation des prélèvements	75
6.2.1	Préparation du laboratoire	75
6.2.2	Réalisation du prélèvement nasopharyngé.....	75
6.2.3	Traitement des prélèvements.....	77
6.3	Diagnostic de l'infection au SARS-CoV-2 par PCR.....	78
6.3.1	Les contrôles de qualité.....	78
6.3.1.1	Les contrôles de qualité internes au laboratoire.....	78
6.3.1.1.1	Contrôles de qualité de la procédure.....	78
6.3.1.1.2	Vérification des Machines	79
6.3.1.2	Contrôle de qualité externe	79
6.3.2	L'extraction des acides nucléiques.....	79
6.3.2.1	Techniques manuelles	79
6.3.2.2	Techniques automatisées	80
6.3.3	L'étape d'amplification.	81
6.3.3.1	Préparation du Master Mix	81
6.3.3.2	Lacement d'un nouveau cycle PCR.....	82
6.3.4	Lecture et interprétation des résultats (amplification SANSURE)	83
6.3.5	Conservation des prélèvements et des extraits	83

Table de matière

Chapitre II : Résultats et discussion

1	Apport du laboratoire sur le plan technique.....	85
1.1	Optimisation de l'extraction	85
1.2	Optimisation de l'amplification.....	85
1.3	Evaluation de la PCR sans extraction.....	86
2	Expérience du laboratoire sur le plan logistique.....	88
2.1	Financement de l'achat de réactifs et du consommable	88
3	Impact financier de l'expérience technique	90
4	Etude statistique	90
4.1	Contexte global de l'étude.....	90
4.1.1	Répartition de la demande en tests PCR selon les caractéristiques démographiques	91
4.1.1.1	Pyramide des âges/sexe :	92
4.1.2	La provenance	94
4.1.3	Services	95
4.2	Etude des résultats des tests PCR	96
4.2.1	Evolution de la demande en tests PCR dans le temps.....	96
4.2.2	Evolution du nombre de positifs et des taux de positivité.....	97
4.2.2.1	Evolution globale	97
4.2.2.2	Répartition des cas positifs selon les caractéristiques démographiques	98
4.2.2.3	Provenance	100
4.2.2.4	Services	100
4.2.2.5	Selon les comorbidités associées	101
4.2.2.6	Symptômes.....	102
4.2.2.7	Evolution du nombre de positifs en fonction de la différence entre la DDS et la DDD :	104
4.3	Etude des décès.....	104
4.3.1	Etude globale des décès.....	105
4.3.2	Etude des décès selon les caractéristiques démographiques	107
4.3.3	Provenance	109
4.3.4	Services	109
4.3.5	Comorbidité.....	110
4.3.6	Symptômes	111
4.4	Etude de la corrélation entre la charge virale estimée par les Cts, la demande en tests PCR et le nombre de positifs	112
	Conclusion et recommandations	118

Table de matière

Annexes	120
Références bibliographiques	129

Liste des abréviations

Liste des abréviations

% : Pourcent.

°C : Degré Celsius.

5'UTR 5' : Untranslated Transcribed Region.

A : Adénosine.

AB7500 : Applied Biosystems 7500.

ACE2 : : Angiotensin-Converting Enzyme 2.

ACoV : Avian coronavirus.

ADAR : Adenosine Desaminase Acting on RNA.

ADN/DNA : Acide désoxyribonucléique.

ADNc : Acide désoxyribonucleique complémentaire.

ADNdb : Acide désoxy-ribonucléique double brin.

AEH : Ain El Hammame.

AINS : Anti-inflammatoires non stéroïdiens.

ALAT : Alanine aminotransférase.

APOBEC : ARNm de l' apolipoprotéine B éditant les protéines catalytiques de type.

ARN/RNA : Acide ribonucléique.

ARN+ : Acide Ribonucléique de polarité positive.

ARNdb : Acide ribonucléique double brin.

ARNm : Acide Ribonucléique messenger.

ARNm sg : Acide Ribonucléique messenger subgénomique.

ASAT : Aspartate aminotransférase.

AVC : Accident vasculaire cérébral.

BGI : Beijing Genomics Institute.

C : Cytosine.

CD4 : Cellule dendrétique 4.

CD8 : Cellule dendrétique 8.

CDC : Centers for Disease Control and Prevention.

CHU : Centre Hospitalo-Universitaire.

CHUTO : Centre Hospitalo-Universitaire Tizi Ouzou.

CIVD : Coagulation intravasculaire disséminée.

CoV : Coronavirus.

COVID – : Coronavirus disease négatif.

COVID + : Coronavirus disease positif.

Liste des abréviations

COVID-19 : Coronavirus disease 2019.

CQ : Contrôle qualité

CQ-ARN : Contrôle qualité acide ribonucléique.

CQ-NEG : Contrôle qualité négatif.

CQ-POS : Contrôle qualité positif.

CRFK : Cellule de rein du chat.

CRP : Protéine C réactive.

Ct : Threshold cycle (cycle de seuil).

CTR : Complexe de transcription/réplication.

CUL2 RING E3 : Cullin-RING E3 ubiquitin ligase complexes.

DAOM : Déchets Assimilés aux Ordures Ménagères.

DASRI : Déchets d'activités de soins à risques infectieux.

dATP : Adénosine désoxyribonucléotides triphosphate.

DBK : Draâ Ben Khedda.

dCTP : Cytosine désoxyribonucléotides triphosphate.

DDD : Date du diagnostic.

DDS : Date de début de symptômes.

dGTP : Guanine désoxyribonucléotides triphosphate.

DNase : Désoxyribonucléase.

Dr : Docteur

DSP : Direction de la santé et de la population.

dTTP : Thymine désoxyribonucléotides triphosphate.

DZD : Dinar algérien (monnaie de l'Algérie).

E : Prptéine de l'Enveloppe.

ECA : Enzyme de conversion de l'angiotensine.

ECP : Effet cytopathique.

EDTA : Acide éthylènediaminetétraacétique.

EHPAD : Etablissement d'hébergement pour personnes âgées dépendantes.

EPI : Equipement de Protection Individuelle.

ERGIC : Compartiment intermédiaire ER-Golgi.

Fc : Flow Cellule.

FFP1 : Feltering facepiece type 1

FiO2 : Fraction inspirée en Oxygène.

FRhK4 : : Cellule de rein du singe rhésus.

G : Guanine.

Liste des abréviations

G/GM-CSF : Granulocytes – macrophage colony –stimulating factor.

h : Heure.

H+ : Hydron.

HAS : Haute autorité de santé.

HCoV-229E : Human Coronavirus 229E.

HCoV-HKU1 : Human Coronavirus HKU1.

HCoV-NL63 : Human Coronavirus NL63.

HCoV-OC43 : Human Coronavirus OC43.

Hel : Hélicase.

HTA : Hyper Tension Artériel.

IBV : Infectious bronchitis virus.

ICTV : International Commitee on Taxonomy of Viruses.

IFN : Intérféron.

IFN-1 : Intérféron.

IFN- λ : Intérféron lamda.

Ig : Immunoglobuline.

IgG : Immunoglobuline type G.

IL-1 : Interleukine 1.

IL-2 : Interleukine 2.

IL-22 : Interleukine 22.

IL-6 : Interleukine 6.

IL-7 : Interleukine 7.

IP10 : Interferon –inducible protein 10.

IPA : Institut Pasteur d'Algérie

IRSA : Syndrome d'insuffisance respiratoire aigue.

ISC : Contrôle interne standard.

JSK : Jeunesse Sportive de Kabylie (club sportif).

kb : kilobases.

kg : kilogramme.

LBA :Llavage bronchoalvéolaire.

LDH : Lactate deshydrogénases.

LGC Ltd : Laboratory of the Government Chemist Limited company.

LLC-MK2 : Cellule épithéliale de rien du singe singe rhésus.

LNI : Larbaa Nath Irathen.

m² : mètre carré (unité de mesure des surfaces).

Liste des abréviations

MCP-1 : Monocyte chemoattractant protein.
MCV : Maladies cardiovasculaires.
MERS-CoV : Middle East respiratory syndrome Coronavirus.
MIP1a : Macrophage inflammatory protein 1 alha.
ml : Millilitre
MSPRH : Ministère de la Santé de la Population et de la Réforme Hospitalière.
N : Nucléocapside.
NB : Nota bene (notez bien).
NGS : Next generation sequencing.
NMPAC : National Médical Products Administration of China.
NSB-2 : Niveau de Sécurité Biologique 2.
NSB3 : Niveau sécurité biologique 3.
nsp : Non structural protein.
OIE : Office International des Epizooties.
OMS : : Organisation Mondial de la Santé.
ORF1b : Open reading frame 1 b.
PaO2 : pression artérielle partielle d'oxygène.
Pb : Paire de base.
PC : Personnel Computer.
PCR : Polymerase chaine réaction.
PCT : Piquant Coupant Tranchant.
pH : Potential hydrogène
PK-13 : Porcin kidney.
PLpro : Papain-like protease.
PN/NP : Prélèvement nasopharyngé.
PNN : Polynucléaire neutrophile.
Protéine M : Protéine de la Membrane.
Protéine N : Protéine de la Nucléocapside.
Protéine S : Protéine de Spicule (Spike).
PSM : Poste de Sécurité Microbiologique.
qPCR : Quantitative Polymerase Chain Reaction.
qRT-PCR Quantitative reverse transcription polymerase chaine réaction.
R0 : Taux de reproduction
RAA : Rénine angiotensine-aldosterone.
RaTG13 : Bat CoronavirusRaTG13.

Liste des abréviations

RBD : Region Binding Domain.
RCA : Rolling circle amplification
RdRp: RNA-dependent RNA Polymerase, ARN dependant ARN polymerase.
RE : Réticulum Endoplasmique.
rhACE2 : Enzyme 2 recombinante de conversion de l'angiotensine humaine.
RK-13 : Rabbit kidney.
RmYN02 : Bat Coronavirus RmYN02.
RNase : Ribonucléase.
ROS : les espèces réactives de l'oxygène.
ROX : 5-Carboxy-X-rhodamine (fluorophore)..
RT-LAMP : Reverse Transcription Loop-Mediated Isotherml amplification.
RT-PCR : Reverse transcriptase Polymerase Chain Reaction.
SARS-CoV Severe acute respiratory syndrome coronavirus.
SARS-CoV-1 : Severe acute respiratory syndrome coronavirus 1.
SARS-CoV-2 : severe acute respiratory syndrome coronavirus 2.,
SDRA : Syndromr Detresse Respiratoire Aigue.
SDS : Dodécylsulfate de sodium.
sec : Seconde (unité de mesure du temps).
SIT: Société d'imagerie thoracique.
SpO2 : Saturation artérielle en oxygène.
STAT2 : Signal transducer and activator of transcription 2.
T : Thymine.
TDR : Test de depistage rapide.
TE : Tris-EDTA.
Th1 : T helper cell type 1.
Th2 : T helper cell type 2.
TMPRSS2 : Protéase transmembranaire à sérine 2.
TNF- α : Tumeur necrosis factor alpha.
TP : Taux de prothrombine.
TROD : Test rapide a orientation diagnostique.
TRS : Séquences de régulation de la transcription.
UMMTO : : Université Mouloud MAMMERI de Tizi Ouzou.
UV : Ultraviolet.
VeroE6 : Cellule épithéliale de rein du singe vert african.
VIH : Virus de l'Immunodéficiency Humain.

Liste des abréviations

VTM : Viral Transport Media.

WTO : wilaya de Tizi Ouzou.

\bar{X} : Moyenne.

ZMW : Zero mode waveguide.

μl : Microlitre (unité de mesure des volumes).

Liste des figures

Liste des figures

Figure 1 : Le processus d'émergence d'une zoonose.	2
Figure 2 : Classification du SARS-CoV-2 et les autres coronavirus humains.....	4
Figure 3 : Transmission du SARS-CoV-2 de l'animal à l'homme et vice-versa.	5
Figure 4 : L'organisation du génome du SARS-CoV-2 et les différences avec le SARS-CoV-1 et le MERS-CoV.	6
Figure 5 : Structure du SARS-CoV-2.....	8
Figure 6 : ECP du SARS-CoV-2.	12
Figure 7 : Cycle de réplication du virus SARS-CoV-2 chez l'homme.....	13
Figure 8 : Pharmacologie du système rénine angiotensine aldostérone.....	18
Figure 9 : Vue générale du système rénine-angiotensine-aldostérone en cas d'infection par le COVID-19.	18
Figure 10 : Physiopathologie lié à l'infection par le SARS CoV-2.....	19
Figure 11 : Les acteurs incriminés dans l'hyper inflammation suite à l'infection par le virus SARS-CoV-2.....	21
Figure 12 : L'évolution de la réponse immunitaire selon la sévérité de la COVID 19. ...	22
Figure 13 : Rôle de la réponse TCD8+/TCD4+ dans l'infection à SARS-CoV-2.	23
Figure 14 : Effets de la maladie à coronavirus 2019 sur le système cardiovasculaire et de coagulation	25
Figure 15 : Structure et réplication du SARS-CoV-2 et cible thérapeutique antivirale..	31
Figure 16 : Les sept stratégies explorées en tant que vaccins contre la maladie à coronavirus 2019.	36
Figure 17 : Réalisation de l'écouvillonnage nasopharyngé dans le cadre de la recherche du virus SARS-CoV-2.	38
Figure 18 : Glacière isotherme collectrice de produits biologique.	39
Figure 19 : Cinétique des marqueurs diagnostics.	40
Figure 20 : Principe de l'extraction par les billes magnétique.	44
Figure 21 : Les étapes de la PCR.	45
Figure 22 : Principe de détection par Taq Man.	46
Figure 23 : Les trois phases de la PCR.....	46
Figure 24 : Modèle graphique de la PCR en temps réel où l'intensité de la fluorescence est exprimée en fonction du nombre de cycles.	47
Figure 25 : RT-LAMP.	50
Figure 26 : Étapes de séquençage de l'ADN par méthode de SANGER.	51
Figure 27 : Illustration des similitudes et des différences entre les différentes plateformes de NGS.	53
Figure 28 : La technologie de nanopore.	54
Figure 29 : Conception du laboratoire SARS-CoV-2 UMMTO.	59
Figure 30 : Appareils de sécurité microbiologique.	60
Figure 31 : Appareils d'agitation.....	60
Figure 32 : Appareils de centrifugation.	61
Figure 33 : Automates d'extraction.....	61
Figure 34 : Automates d'amplification (thermocycleurs).	61

Liste des figures

Figure 35 : Onduleurs.....	62
Figure 36 : Appareils de conservation des échantillons et des réactifs.	62
Figure 37 : Appareils de nettoyage et de stérilisation.	63
Figure 38 : Équipements de protection individuelle.	63
Figure 39 : Produits d'hygiène et d'antiseptie pour les personnes.....	64
Figure 40 : produits de désinfection de l'environnement du travail.	65
Figure 41 : Matériels de recueil de déchets.....	66
Figure 42 : Kits d'extraction manuelle par colonne.....	66
Figure 43 : Kits d'extraction par billes magnétiques.....	67
Figure 44 : Produits utilisés pour la régénération des réactifs.	67
Figure 45 : Matériel utilisé pour la préparation des colonnes et des plaques.....	67
Figure 46 : Kits de RT-PCR pour SARS-CoV-2.	68
Figure 47 : Consommable des thermocycleus.....	68
Figure 48 : Verrerie.....	69
Figure 49 : Micropipettes.	69
Figure 50 : Circuit des prélèvements et de l'information.....	73
Figure 51 : Cycle de taches effectuées quotidiennement au laboratoire.	75
Figure 52 : Dépôt des prélèvements sus la table d'entrée.....	77
Figure 53 : RT-PCR avec ¼ du volume du Master Mix.	86
Figure 54 : RT-PCR sans extraction (courbes vertes).	86
Figure 55 : RT-PCR sans extraction avec dépôt direct.	87
Figure 56 : Répartition de la demande en tests PCR selon le sexe.	91
Figure 57 : Répartition de la demande en tests PCR selon l'âge.	91
Figure 58 : Répartition des demandes en tests PCR selon l'âge et le sexe	92
Figure 59 : Pyramide âge/sexe de la population de la WTO en 2018.....	92
Figure 60 : Répartition des demandes en tests PCR selon la région de provenance.....	94
Figure 61 : Répartition des demandes en tests PCR selon le service.....	95
Figure 62 : Évolution de la demande en tests PCR dans le temps	96
Figure 63 : Évolution du nombre de positifs par jour.	97
Figure 64 : Évolution du nombre de positifs par mois.....	97
Figure 65 : Évolution des taux de positivité et de négativité par mois.	98
Figure 66 : Répartition des cas positifs selon le sexe.....	98
Figure 67 : Répartition des cas positifs selon l'âge.	99
Figure 68 : Répartition des cas positifs selon l'âge et le sexe.	99
Figure 69 : Répartition des cas positifs selon la région de provenance.....	100
Figure 70 : Répartition des cas positifs selon le service.....	100
Figure 71 : Répartition des demandes en PCR selon la présence ou l'absence d'une comorbidité associée et aussi selon les résultats de la PCR.....	101
Figure 72 : Répartition des comorbidités chez les cas positifs.	102
Figure 73 : Répartition des demandes de tests PCR selon la présence ou l'absence de symptômes associés.	102
Figure 74 : Répartition des sujets symptomatique selon le type de symptômes.....	103
Figure 75 : Évolution des demandes en PCR selon la différence entre la DDS et la DDD.	104
Figure 76 : Taux global de positivité chez les sujets décédés.	105
Figure 77 : Évolution du nombre total de décès par jour.....	105

Liste des figures

Figure 78 : Évolution des décès COVID +/COVID – par jour	106
Figure 79 : Évolution des décès COVID +/COVID – par mois.....	106
Figure 80 : Évolution des cas positifs et des décès COVID + par mois.	106
Figure 81 : Répartition des décès COVID + selon le sexe.....	107
Figure 82: Répartition des décès COVID + selon l'âge.	107
Figure 83 : Répartition des décès COVID + selon l'âge et le sexe.	108
Figure 84 : Répartition des décès selon la région de provenance.	109
Figure 85 : Répartition des décès du CHUTO selon le service	109
Figure 86 : Répartition des décès COVID +/COVID – selon la présence ou pas d'une comorbidité associée.....	110
Figure 87 : Répartition des décès selon le type de comorbidité associée.....	110
Figure 88 : Répartition des décès selon la présence ou pas de symptômes associés.....	111
Figure 89 : Fréquence de symptômes présents chez sujets décédés.	111
Figure 90 : Hypothèse de la corrélation entre la baisse des Ct et l'augmentation des demandes en tests PCR ainsi que les cas positifs et les décès liés au COVID-19.....	112
Figure 91 : Évolution journalière des Ct.....	114
Figure 92 : Évolution mensuelle des Ct.....	114
Figure 93 : Évolution des CTs et de la demande en tests PCR par mois.	115
Figure 94 : Évolution des CTs et des cas positifs par mois.....	115
Figure 95 : Évolution des CTs et les décès COVID + par mois.....	116
Figure 96 : Évolution hebdomadaire de la demande générale en tests PCR.....	116
Figure 97 : Évolution hebdomadaire des cas positifs et des Cts moyens.	117
Figure 98 : Évolution hebdomadaire des cas positifs et décès positifs.	117

Liste des tableaux

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les principaux gènes exprimés par le SARS-CoV-2.	7
Tableau 2 : Les principales protéines non structurales du SARS-CoV-2.....	9
Tableau 3 : Principales signes biologiques et radiologiques de COVID 19	29
Tableau 4 : Les avantages et les inconvénients des tests sérologiques.....	40
Tableau 5 : Les avantages et les inconvénients des tests antigéniques commercialisés. ...	41
Tableau 6 : Les différents événements produits au niveau du laboratoire.....	71
Tableau 7 : Interprétation des différents résultats des contrôles.	78
Tableau 8 : Avantages et inconvénients des différentes techniques d'extraction.	80
Tableau 9 : Interprétation des Ct.	83
Tableau 10 : Récapitulatif des résultats de l'expérience sans extraction.....	87
Tableau 11 : Impact des améliorations technique sur le plan financier.	90

Liste des annexes

Liste des annexes

Annexe 1 : Les molécules à activité antivale approuvées par la FDA ayant action sur le SARS-CoV-2.	120
Annexe 2 : Caractéristique des vaccins candidats promoteurs contre la COVID-19 Et enjeu relatif de leur utilisation.	121
Annexe 3 : Caractéristiques des vaccins candidats contre la COVID-19 et enjeux relatifs à leur utilisation.	122
Annexe 4 : Ions et molécules inhibant la PCR	125
Annexe 5 : Application et technologies recommandé pour le séquençage du génome SARS-CoV-2.	127
Annexe 6 : Fiche de notification des cas COVID-19.	127
Annexe 7 : Protocole d'extraction manuelle.	127
Annexe 8 : Protocole des kits d'amplification utilisé dans le laboratoire de diagnostic moléculaire du virus SARS-CoV-2.	128

Introduction

Introduction

La COVID-19 c'est imposé comme l'une des principales causes de mortalité dans le monde entre 2019 et 2021. Cette maladie qui a été décrite pour la première fois à Wuhan en Chine dès 16 novembre 2019 c'est très rapidement propagé à l'ensemble du globe provoquant une crise sanitaire inédite.

L'Algérie a déclaré son premier cas de COVID-19 le 25 février 2020, avec la Wilaya de Blida comme principal foyer, mais rapidement, l'ensemble du territoire national a été touché.[1]

Le diagnostic virologique par qRT-PCR, c'est rapidement imposé comme la technique de référence aussi bien pour la détection de la maladie que comme outil solide de lutte contre la propagation du virus, comme prouvé par la Chine qui a été l'un des premiers pays à juguler l'extension de la pandémie en adoptant une politique de dépistage massif.

Le problème de la disponibilité de la qRT-PCR s'est imposé en Algérie très tôt après l'écllosion de l'épidémie, en ce temps seul l'IPA d'Alger assurait le test pour l'ensemble du territoire national.

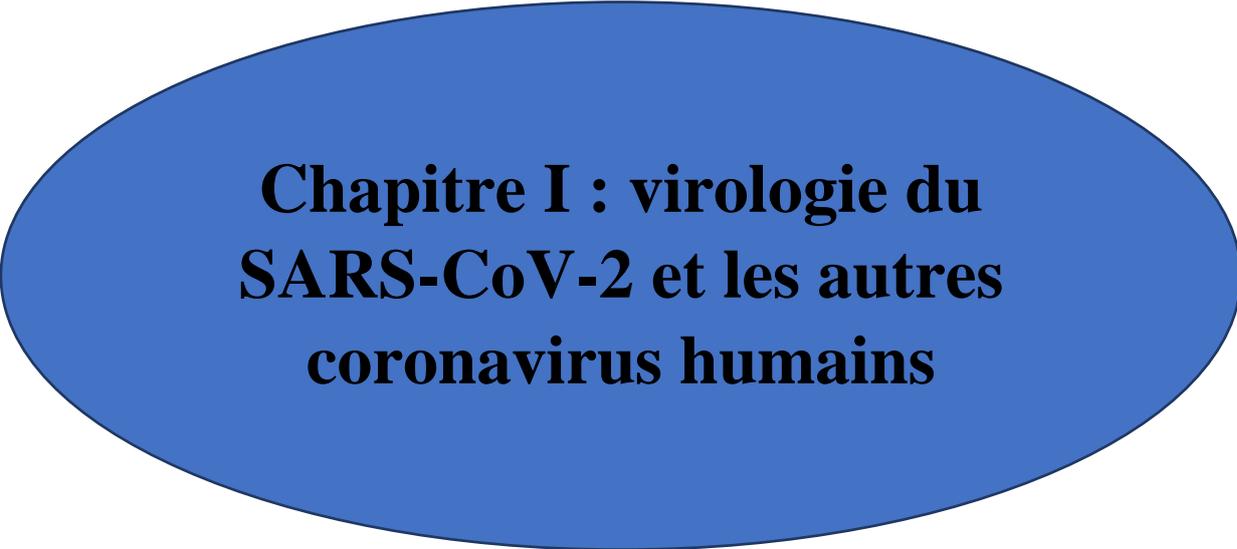
Ceci a motivé plusieurs acteurs locaux, notamment à Tizi-Ouzou qui a été la première à mettre en marche un laboratoire Universitaire dédié au diagnostic de la maladie par qRT-PCR qui est opérationnel depuis le 01 Avril 2020.

Dans ce sens, notre travail vient exposer l'expérience du laboratoire de diagnostic moléculaire de l'UMMTO dans la réponse et la gestion de cette crise sanitaire dans la wilaya de TiziOuzou, et a pour objectifs :

1. Rapporter l'expérience du laboratoire de diagnostic COVID-19 dans la réponse à l'épidémie dans la wilaya de Tizi Ouzou.
 - ✓ Décrire le parcours du laboratoire et l'expérience acquise sur le plan technique, logistique et de la maîtrise du risque biologique.
2. Faire le point sur le Bilan d'activité du laboratoire.
 - ✓ Bilan global de la période 01/04/2020 au 31/12/2020.
 - ✓ Bilan détaillé de la période 24/08/2020 au 31/12/2020.



**PARTIE
THEORIQUE**



**Chapitre I : virologie du
SARS-CoV-2 et les autres
coronavirus humains**

Chapitre I : virologie du SARS-CoV-2 et les autres coronavirus humains

1 Le concept de zoonose : l'émergence d'un agent pathogène animal dans la population humaine

Les maladies émergentes sont définies par l'Office International des Epizooties (OIE) comme des infections nouvelles causées par l'apparition ou la modification de l'épidémiologie d'un agent pathogène existant au sein d'une population. Ce phénomène existe depuis longtemps et semble s'être intensifié au cours du derniers siècle : depuis 1940, plus de 300 maladies infectieuses ont émergé ou réémergé à travers le monde. [2]

Les zoonoses, maladies animales transmissibles à l'homme, représentent près de 60% d'entre elles. Parmi ces zoonoses, 72% trouvent leur origine dans la faune sauvage, principalement chez les rongeurs, les primates, les chiroptères, ainsi que chez d'autres espèces mammifères et non mammifères. [2, 3]

De nombreux virus issus de la faune sauvage ont été impliqués dans les récents épisodes épidémiques et pandémiques, comme ceux liés au virus de l'immunodéficience humaine (VIH), au coronavirus associé au syndrome respiratoire aigüe sévère (SARS-CoV-1) ou encore du virus Ebola.[2]

Le processus de transformation d'un agent pathogène uniquement animal en un agent pathogène humain peut être décrit selon 05 stades, d'après Wolfe (figure 01). [4]

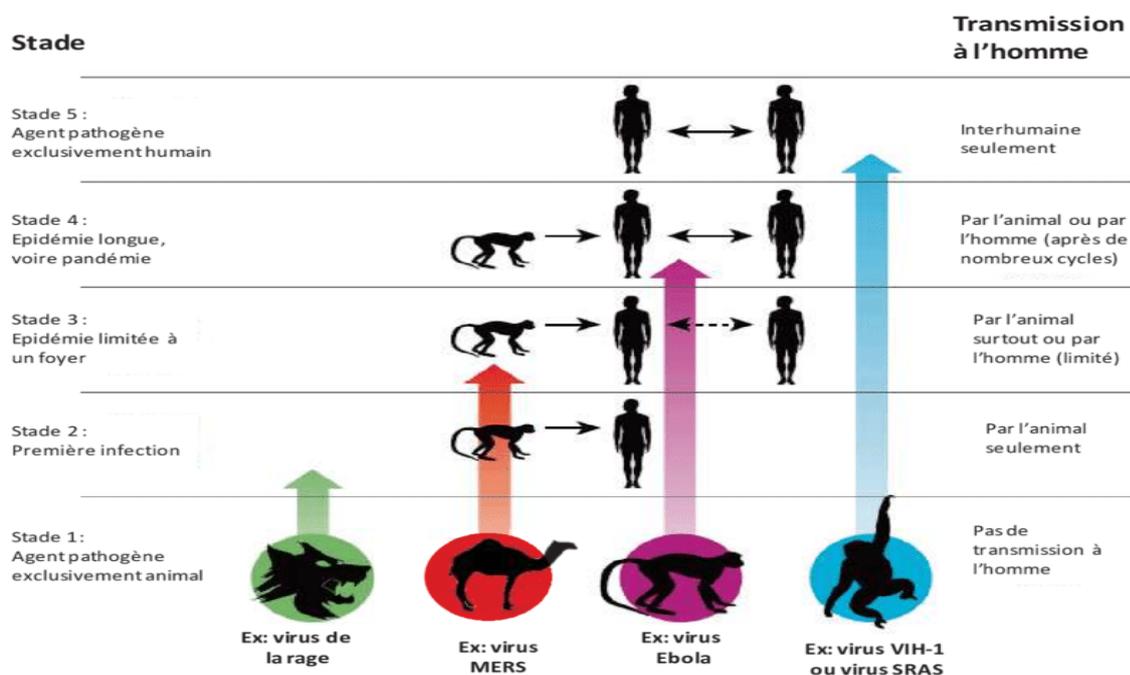


Figure 1 : Le processus d'émergence d'une zoonose.[5]

Chapitre I : virologie du SARS-CoV-2 et les autres coronavirus humains

2 Historique de découverte des coronavirus

L'histoire de la recherche sur les coronavirus a commencé en 1931, lorsque les vétérinaires américains A.F. fish. Schalk et M.C. Hawn ont décrit la "nouvelle maladie respiratoire" chez les poulets, qui a reçu le titre "bronchite infectieuse des poulets". L'agent étiologique de cette maladie (IBV - Infectious bronchitis virus), aujourd'hui appelé coronavirus des oiseaux (ACoV - Avian coronavirus) (*Gammacoronavirus*). [6]

Les premiers coronavirus humains sont le HCoV-229E et le HCoV-OC43 qui ont été isolés en culture cellulaire dans les années 1960, à partir de sécrétions respiratoires d'individus présentant une infection respiratoire aiguë. [7]

Depuis le début du 21^{ème} siècle, 05 coronavirus ont apparus dont 03 ont franchi la barrière des espèces pour provoquer une pneumonie mortelle chez l'homme :

- Coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère (SARS-CoV) est apparu dans la province de Guangdong de Chine en 2002 et s'est répandu sur les 05 continents par voie aérienne infectant 8098 personnes et causant 774 décès.
- Coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient (MERS-CoV) : en 2012 le MERS-CoV a émergé dans la péninsule arabique, il a été exporté vers 27 pays, infectant 2494 personnes et revendiquant 858 vies.
- Coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère 2 (SARS-CoV-2) a été découvert en décembre 2019 à Wuhan province du Hubei en Chine.

En plus de ces 03 coronavirus hautement pathogènes, deux autres coronavirus à faible pathogénicité sont endémique chez l'homme : le HCoV-NL63 décrit en 2004 au Pays-Bas et le HCoV-HKU1 découvert en 2005 à Hong-Kong. [8]

3 Taxonomie et classification du SARS-CoV-2

Nomenclature

Initialement appelé 2019-nCoV pour nouveau coronavirus 2019, il a été renommé par l'ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) en SARS-CoV-2 après analyses taxonomiques poussées. [9]

Chapitre I : virologie du SARS-CoV-2 et les autres coronavirus humains

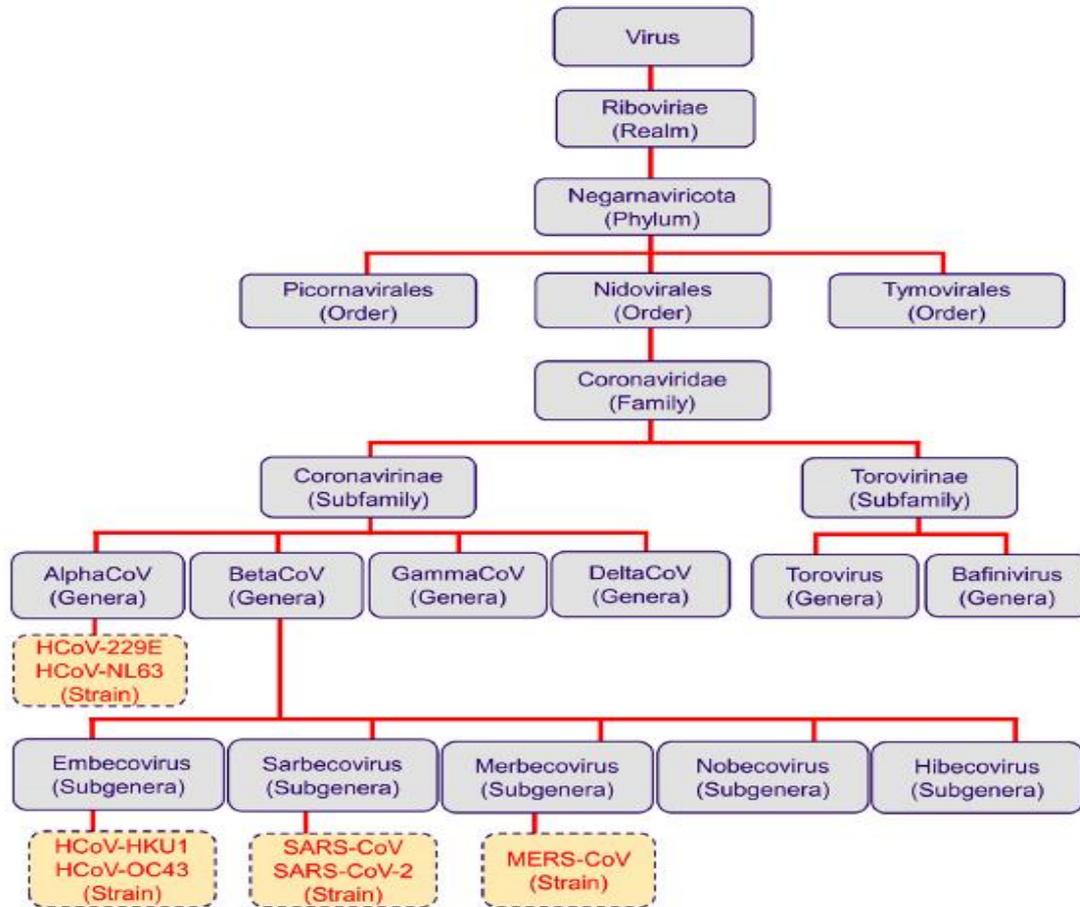


Figure 2 : Classification du SARS-CoV-2 et les autres coronavirus humains.[10]

4 Origine du virus SARS-CoV-2

Après un an de son identification, l'origine exacte du virus reste controversée.

L'origine zoonotique des CoV est largement documentée. Les virus de cette famille infectent plus de 500 espèces de chiroptères (ordre de mammifères comprenant plus de 1 200 espèces de chauves-souris) qui représentent un réservoir important pour son évolution, en permettant, entre autres, la recombinaison des génomes chez des animaux infectés simultanément par différentes souches virales.[11]

Il est admis que la transmission zoonotique des CoV à l'homme passe par une espèce hôte intermédiaire, dans laquelle des virus mieux adaptés aux récepteurs humains peuvent être sélectionnés, favorisant ainsi le franchissement de la barrière d'espèce. [11]

Dès l'obtention des premières séquences, des arbres phylogénétiques ont été construits pour retrouver l'origine du SARS-CoV-2. Ces derniers ont montré que :

- ✚ Les virus connus les plus proches du SARS-CoV-2 viennent de deux chauves-souris Rhinolophe ou « fer à cheval », trouvées dans le Yunnan en 2013 et 2019. L'identité entre les génomes est d'environ 96% pour l'une (RaTG13) et 93% pour l'autre

Chapitre I : virologie du SARS-CoV-2 et les autres coronavirus humains

(RmYN02), mais ce taux d'identité varie le long du génome. En particulier, il est assez faible (60%-70%) dans la région RBD (Region Binding Domain) de liaison à la protéine humaine ACE2, qui permet l'entrée dans la cellule hôte. [12]

- Plus éloigné globalement (90% d'identité), se trouve un virus de pangolin, dont la région RBD est à l'inverse très proche du SARS-CoV-2, avec une seule mutation en acide aminé, contre une douzaine pour la chauve-souris. [12, 13]

Dans un premier temps, il a été suggéré qu'en raison des similarités observées ci-dessus, le SARS-CoV-2 serait un recombinant dans la région RBD de virus de chauve-souris et de pangolin. [12]

Mais depuis, l'observation de l'évolution de cette région dans les souches humaines a montré que celle-ci mute rapidement, avec une vingtaine de mutations en acides aminés présentes parmi les souches humaines disponibles aujourd'hui. L'hypothèse alternative d'une adaptation du virus de chauve-souris dans cette région, plutôt qu'une recombinaison avec le virus du pangolin est envisageable mais la question n'est pas tranchée. [12]

Une autre hypothèse serait que la transmission pour l'homme aurait comme origine certains types d'élevages animaux :

En novembre 2020, un variant du SARS-CoV-2 a été identifié dans des élevages de visons. « A ce jour, huit pays, à savoir le Danemark, l'Espagne, les États-Unis d'Amérique, la Grèce, l'Italie, la Lituanie, les Pays-Bas et la Suède, ont signalé à l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE) la présence de COVID-19 chez des visons d'élevage » déclare l'OMS. [14]

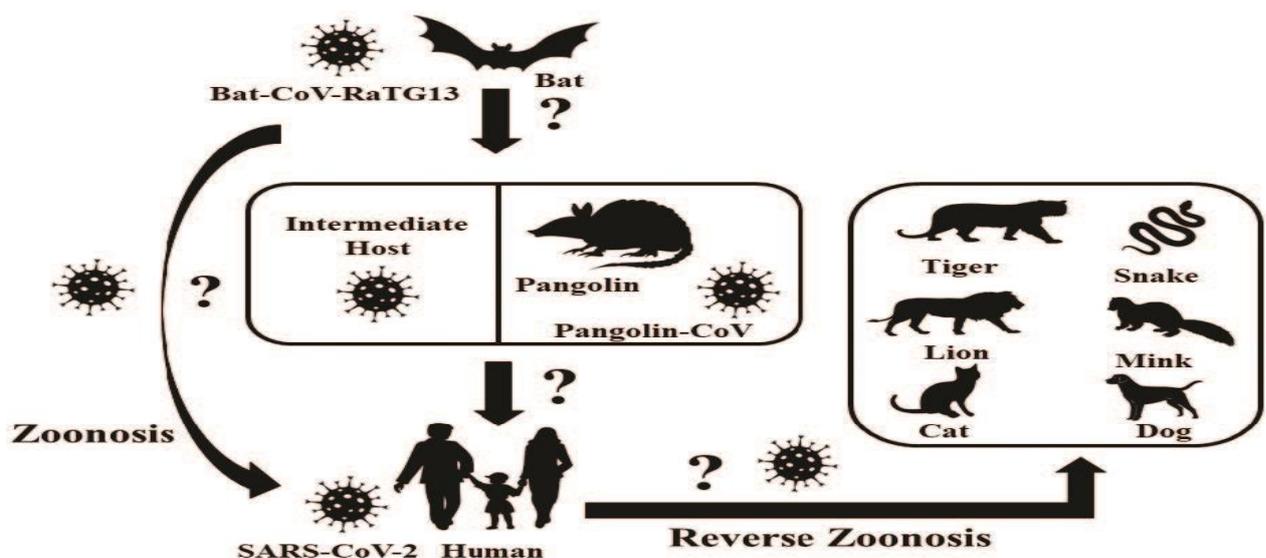


Figure 3 : Transmission du SARS-CoV-2 de l'animal à l'homme et vice-versa. [15]

Chapitre I : virologie du SARS-CoV-2 et les autres coronavirus humains

5 Caractères virologiques du SARS-CoV-2

5.1 Organisation du génome

Le génome du SARS-CoV-2 est de 29.9 kb. Il s'agit d'une molécule d'ARN monocaténaire linéaire non segmentée, de polarité positive. Le génome comprend deux régions non codantes en 5' et en 3'. La partie codante est divisée en plusieurs parties. Les deux premiers tiers du génome sont constitués de deux grandes régions chevauchantes, *Open Reading Frame* (ORF) 1a et ORF1b, codant le complexe de réplication-transcription, dont le gène *RNA-dependent RNA Polymerase* (*RdRp*) qui code l'ARN polymérase ARN-dépendante. Le dernier tiers du génome code pour quatre protéines essentielles de structure, dont la glycoprotéine (S), la protéine de l'enveloppe (E), la protéine matricielle (M) et la protéine nucléocapside (N).[16] (Voir tableau 01)

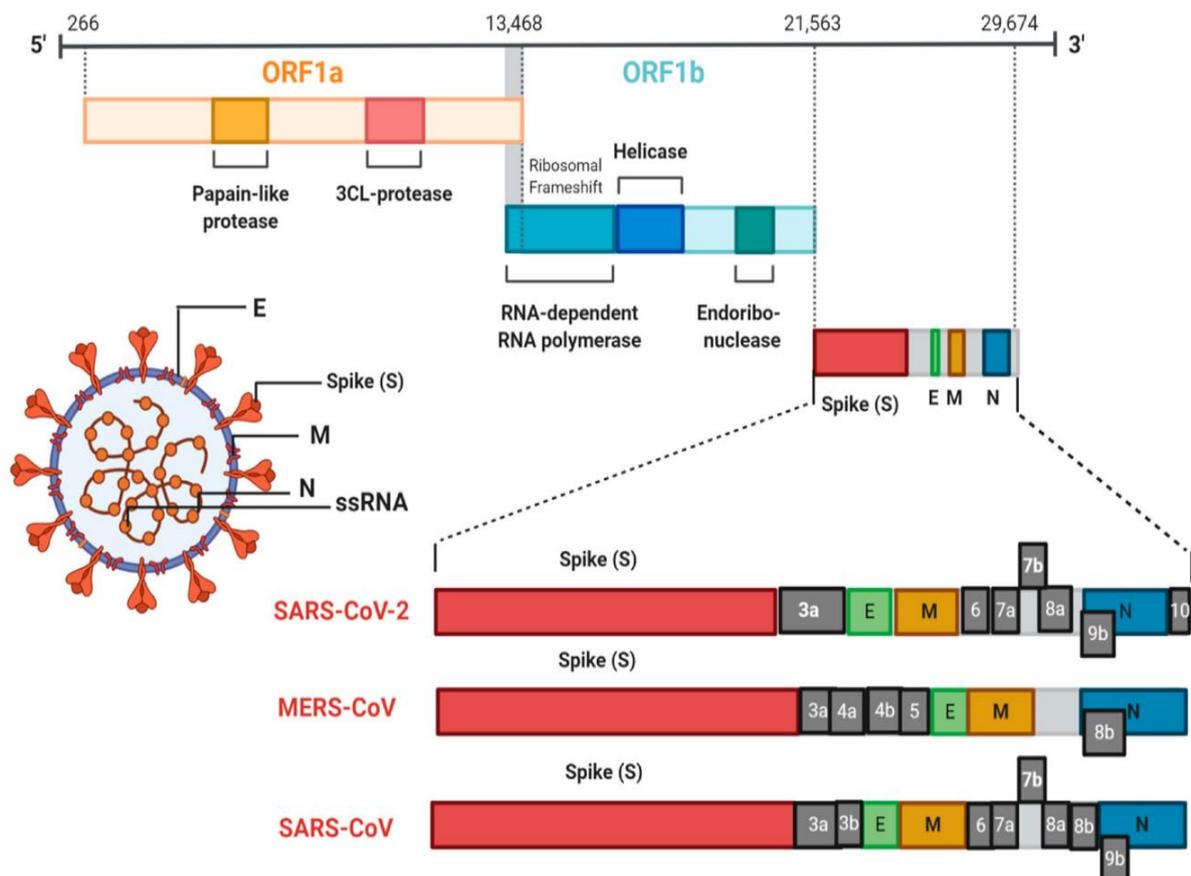


Figure 4 : L'organisation du génome du SARS-CoV-2 et les différences avec le SARS-CoV-1 et le MERS-CoV. [17]

Chapitre I : virologie du SARS-CoV-2 et les autres coronavirus humains

Tableau 1 : Les principaux gènes exprimés par le SARS-CoV-2. [18-24]

Gène	Protéine	Fonction
ORF1ab	Polyprotéine ORF1ab	Précurseur des protéines non structurales.
ORF1a	Polyprotéine ORF1a	Précurseur des protéines non structurales.
ORF2 (S)	Péplomère (protéine S)	Elle est clivée en sous-unités glycosylées, S1 et S2. S1 se lie au récepteur de l'hôte, ACE2, tandis que S2 médie la fusion virale et membranaire de l'hôte.
ORF4 E	Protéine d'enveloppe (protéine E)	C'est une protéine membranaire de type III à un seul passage impliquée dans l'assemblage viral, le bourgeonnement et la pathogénèse.
ORF5 (M)	Protéine de membrane (protéine M)	C'est le composant structural le plus abondant du virion et très conservé. Médie l'assemblage et le bourgeonnement des particules virales par le recrutement d'autres protéines structurales dans le « compartiment intermédiaire ER-Golgi (ERGIC) ». Interaction avec N pour l'empaquetage d'ARN dans le virion.
ORF9a (N)	Protéine de nucléocapside (protéine N)	Elle se lie à l'ARN génomique viral et forme une ribonucléocapside hélicoïdale. Impliqué dans la protection du génome, la réplication de l'ARN viral, l'assemblage des virions et l'évasion immunitaire (y compris la suppression de l'IFN-I).
ORF10	Protéine ORF10	Elle interagit avec les facteurs de la complexe ligase CUL2 RING E3 et peut donc moduler l'ubiquitination.

5.2 Les protéines de structure

Quatre principales protéines structurales sont à l'origine de la morphologie du virus. De l'intérieur vers l'extérieur, on trouve :

- Les protéines de nucléocapside (N) qui se lient à l'ARN pour former la capsidie lors de l'assemblage du virion.
- Les protéines de membrane (M) qui entourent la capsidie du virion.
- Les protéines d'enveloppe (E) sont plus petites et interagissent avec les protéines M pour former l'enveloppe virale.
- Les protéines de spicule (S) sont des glycoprotéines membranaires (péplomère) qui forment les pointes de la couronne observée en microscopie électronique. Chaque protéine S est subdivisée en deux sous-unités S1 et S2, correspondant à la partie globulaire et à la tige du spicule. [5]

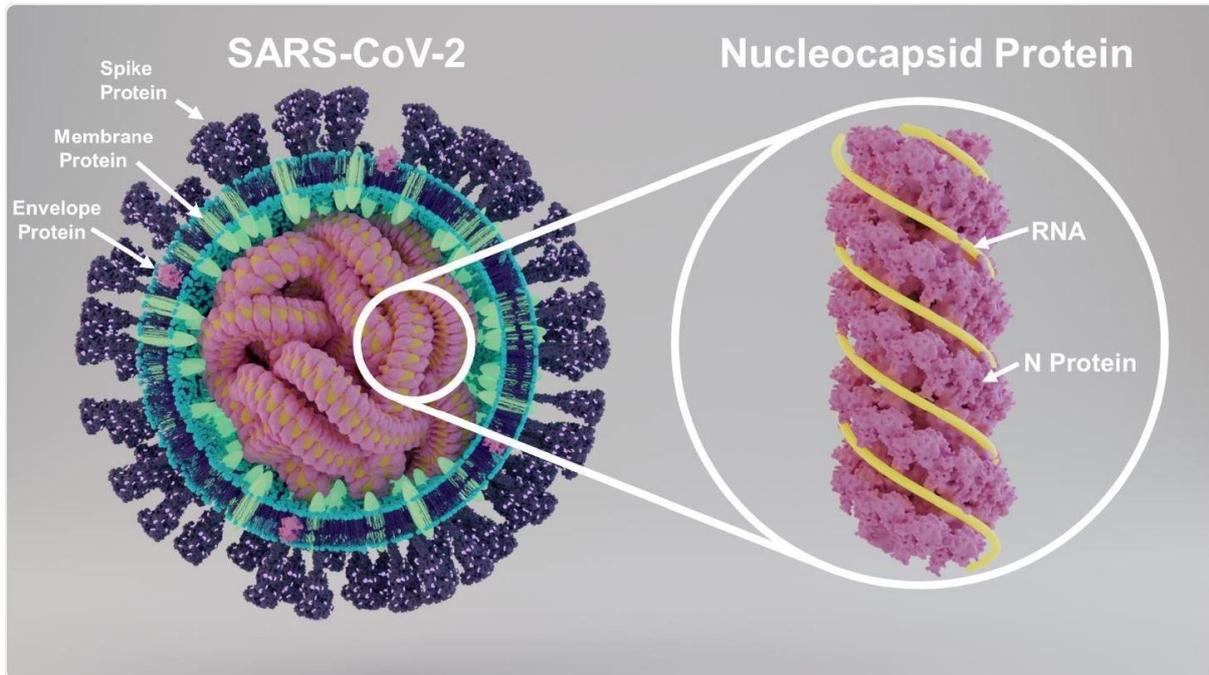


Figure 5 : Structure du SARS-CoV-2.[25]

Les protéines S jouent un rôle primordial dans l'interaction hôte-virus. Elles sont responsables de l'attachement du virus à la cellule cible (via la sous-unité S1) et de la fusion membranaire (via la sous-unité S2) qui permet l'entrée du virus dans la cellule. Le spicule est également la cible principale des réponses immunitaires cellulaires et humorales de l'hôte et induit la formation d'anticorps neutralisants. En conséquence, elle présente des régions hypervariables lui permettant d'échapper à la pression immunitaire et d'élargir le tropisme cellulaire.[5]

5.3 Les protéines non structurales

Le virus dispose de plusieurs protéines non structurales (nsp), dont l'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp). Cette enzyme intervient dans la réplication du virus et permet la synthèse d'ARN subgénomiques.

L'hélicase (Hel) intervient dans la réplication du génome viral, dans la régulation de la transcription et traduction ainsi que dans l'épissage des ARNm. [26]

D'autres protéines non structurales sont présentes chez les coronavirus, dont le nombre varie en fonction des espèces, ceux du SARS-CoV-2 représentés dans la figure ci-dessous.

Chapitre I : virologie du SARS-CoV-2 et les autres coronavirus humains

Tableau 2 : Les principales protéines non structurales du SARS-CoV-2. [24, 27-37]

Protéine	Fonction
nsp1	Elle inhibe probablement la traduction de l'hôte en interagissant avec la sous-unité ribosomale 40S, conduisant à une dégradation de l'ARNm de l'hôte par clivage près de leurs 5'UTR. Favorise l'expression des gènes viraux et l'immunoévasion en interférant avec la signalisation médiée par l'interféron.
nsp2	Elle interagit avec les facteurs de l'hôte prohibitin 1 et prohibitin 2, qui sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires, y compris la biogenèse mitochondriale. Il semble que nsp2 peut modifier le milieu intracellulaire et perturber la signalisation intracellulaire de l'hôte.
nsp3	C'est une protéase de type papaine (PLpro) et une protéine membranaire multipasse qui traite la polyprotéine virale pour libérer nsp1, nsp2 et nsp3. Il présente également des activités de désubiquitination.
nsp4	Protéine membranaire multi-passes, nécessaire pour la réplication virale en induisant l'assemblage des vésicules cytoplasmiques à double membrane.
nsp5	Elle clive en 11 sites dans la polyprotéine pour libérer les nsp4-nsp16. Il est également responsable de la maturation des nsp.
nsp6	C'est une protéine membranaire à passes multiples qui induit des vésicules à double membrane dans les cellules infectées. Il limite également l'expansion de l'autophagosome et interfère avec la livraison par l'autophagosome de facteurs viraux aux lysosomes pour destruction.
nsp7	Elle forme un hexadécamère avec nsp8 comme cofacteur pour l'ARN polymérase ARN-dépendante (nsp12).
nsp8	Elle forme un hexadécamère avec nsp7 comme cofacteur de l'ARN polymérase ARN-dépendante (nsp12). La mutation de certains résidus dans nsp8 est mortelle pour le virus en affectant la synthèse de l'ARN.
nsp9	Elle fonctionne dans la réplication virale en tant que protéine dimère liant l'ARNss.
nsp10	Elle forme un dodécamère et interagit avec nsp14 et nsp16 pour stimuler leurs activités respectives d'exoribonucléase 3'-5' et 2'-O-méthyltransférase dans la formation de la machinerie de coiffage de l'ARNm viral.
nsp11	Sa fonction, est inconnue.
nsp12	C'est l'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp) effectuant à la fois la réplication et la transcription du génome viral. Il a une identité > 95% avec la polymérase du SRAS-CoV-1.
nsp13	C'est une hélicase de superfamille 1 multifonctionnelle capable d'utiliser à la fois l'ADNdb et l'ARNdb comme substrats avec une polarité 5'-3'. En plus de travailler avec nsp12 dans la réplication du génome viral, il est également impliqué dans le coiffage de l'ARNm viral.
nsp14	Elle a à la fois des activités d'exoribonucléase 3'-5' (relecture pendant la réplication de l'ARN) et de la N7-guanine méthyltransférase (coiffage de l'ARNm viral).et correction des erreurs induites par la réplication.
nsp15	C'est une endoribonucléase qui favorise le clivage de l'ARN aux extrémités 3' des uridyates. La perte de nsp15 affecte à la fois la réplication virale et la pathogenèse.
nsp16	Son activité 2'-O-méthyltransférase est essentielle pour le coiffage de l'ARNm viral.

Chapitre I : virologie du SARS-CoV-2 et les autres coronavirus humains

6 Mutations et variants émergents

Les CoV présentent une diversité génétique liée notamment à la plasticité de leur génome, et à plusieurs autres facteurs dont l'apparition des mutations, le phénomène de recombinaison ainsi que les modifications induites par l'hôte infectée.[38]

Les mutations apparaissent au cours de la réplication virale par le biais de la polymérase virale qui est peu fidèle (1 nucléotide erroné pour 10^4 nucléotides copiés). Ces mutations sont rapidement corrigées par une protéine nsp14 dont la fonction principale est la correction d'erreurs.

Les événements de recombinaison intra et interspécifiques facilités par la nature discontinue de la transcription.[38]

Les cas de pressions de mutation directionnelle exercées sur le génome du SARS-CoV-2 à partir des systèmes de défense antiviraux de l'hôte :

- APOBEC (ARNm de l'apolipoprotéine B éditant les protéines catalytiques de type polypeptide).
- ADAR (*Adenosine Desaminase Acting on RNA*).
- ROS (les espèces réactives de l'oxygène).[39]

6.1 Variants du SARS-CoV-2 [40-43]

6.1.1 D614G

Un variant du SARS-CoV-2 présentant une substitution D614G dans le gène codant pour la protéine de spicule (Spike) est apparu fin janvier ou début février 2020. Sur une période de plusieurs mois, il a remplacé la souche initiale du SARS-CoV-2 identifiée en Chine et est devenu en juin 2020 le virus dominant en circulation dans le monde. Des études sur des cellules respiratoires humaines et des modèles animaux ont montré que, par rapport à la souche initiale du virus, la souche portant la substitution D614G présente une infectiosité et une transmissibilité accrues. Le SARS-CoV-2 porteur de la substitution D614G ne provoque pas de maladie plus sévère et n'altère pas l'efficacité des outils de diagnostic en laboratoire.

6.1.2 Cluster 5

En août et septembre 2020, un variant du SARS-CoV-2 lié à l'infection parmi des visons d'élevage et transmis ensuite à l'homme a été identifié dans le Jutland du Nord (Danemark). Ce variant, appelé « Cluster 5 » par les autorités Danoises.

Chapitre I : virologie du SARS-CoV-2 et les autres coronavirus humains

6.1.3 Variant Britannique (VOC-202012/01)

Le 14 décembre 2020, les autorités du Royaume-Uni ont notifié à l'OMS un variant qu'elles ont désigné sous le nom de SARS-CoV-2 VOC 202012/01 (Variant Of Concern, année 2020, mois 12, variant 01). Ce variant porte 23 substitutions de nucléotides et n'est pas lié sur le plan phylogénétique au virus SARS-CoV-2 qui circulait au Royaume-Uni au moment où il a été détecté.

6.1.4 Variant Sud-Africain (501-V2)

Le 18 décembre, les autorités nationales sud-africaines ont annoncé avoir détecté un nouveau variant du SARS-CoV-2 qui se propage rapidement dans trois provinces du pays. L'Afrique du Sud a nommé ce variant 501Y.V2, en raison de la mutation N501Y. Si le SARS-CoV-2 VOC 202012/01 porte également la mutation N501Y, l'analyse phylogénétique a montré que les variants du Royaume-Uni et d'Afrique du Sud sont différents.

6.1.5 Variant Brésilien (B.1.1.248)

Au Brésil, une variante appelée P.1 a émergé qui a été identifiée pour la première fois chez des voyageurs en provenance du Brésil, qui ont été testés lors d'un dépistage de routine dans un aéroport au Japon, début janvier.

6.1.6 Variant Californien CAL.20C

Un nouveau variant de la COVID-19 aurait été pour la première fois détecté aux Etats-Unis, plus précisément en Californie du Sud, une fois en juillet 2020 puis fréquemment en octobre. Au 22 janvier 2021, le variant californien représentait 44% des cas positifs à la Covid-19 dans le sud de la Californie.

7 Récepteurs et cellules sensibles

7.1 Récepteurs

7.1.1 L'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 (ACE2)

Il s'agit d'une métallocarboxypeptidase transmembranaire qui catalyse le clivage de l'angiotensine I (1–10) en angiotensine (1–9) et de l'angiotensine II (1–8) en angiotensine (1–7). L'ACE2 est le point d'entrée de certains coronavirus dans les cellules. C'est le cas pour le coronavirus humain NL63, le SARS-CoV-1 et le SARS-CoV-2. [44, 45]

7.1.2 Neuropiline-1

Pour infecter efficacement les cellules humaines, le SARS-CoV-2 est capable d'utiliser un récepteur membranaire autre que l'ACE2 qui est le Neutropilin-1, qui est très abondant dans

Chapitre I : virologie du SARS-CoV-2 et les autres coronavirus humains

de nombreux tissus humains, y compris les voies respiratoires, les vaisseaux sanguins et les neurones. La découverte décisive a été faite par une équipe germano-finlandaise de chercheurs dirigée par les neuroscientifiques Mika Simons, de l'université technique de Munich ; en Allemagne et le virologue Giuseppe Balistreri, de l'université d'Helsinki, en Finlande.[46, 47]

7.1.3 TMPRSS2

La protéase transmembranaire à sérine 2 (TMPRSS2) est utilisée par le SARS-CoV-2 après la fixation de ce dernier sur le récepteur ACE2, pour l'amorçage de la protéine S en deux sous unités fonctionnelles.[48]

7.2 Cellules sensibles (in vitro)

Le SARS-CoV-2 est capable d'infecter et de se répliquer efficacement dans les lignées continues humaines de type Caco-2, Calu3, U251, Huh7, 293T avec une multiplication plus notable dans les 02 premières. Plusieurs lignées non-humaines sont aussi sensibles et permissives pour le virus comme les VeroE6 (Singe), FRhK4 (singe), LLC-MK2 (singe), CRFK (chat), RK-13 (Lapin), PK-13 (Porc).

L'effet cytopathique n'a cependant été observé que chez les cellules non-humaines VeroE6 et FRhK4 qui s'est manifesté par un arrondissement, détachement, dégénérescence et formation de Syncytia. L'ECP n'a pas été observé avec les cellules humaines qui de plus ont montré une longévité prolongée au de la d'une semaine.[49, 50]

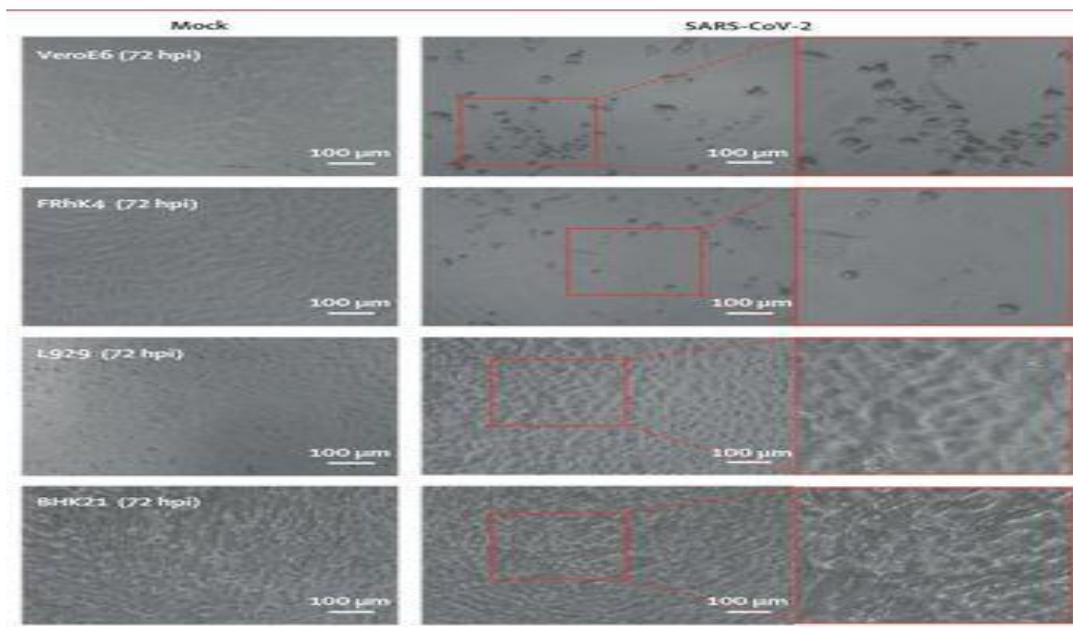


Figure 6 : ECP du SARS-CoV-2.[49]

Chapitre I : virologie du SARS-CoV-2 et les autres coronavirus humains

Ces données sont concordantes avec les observations cliniques en matière d'incidence de diarrhées, de sévérité / mortalité faible mais une plus forte contagiosité que SARS-CoV-2 par rapport au SARS-CoV-1.[51]

8 Cycle de réplication du SARS-CoV-2

Il n'y a encore qu'une compréhension rudimentaire du cycle de vie spécifique du virus SRAS-CoV-2. Une grande partie des connaissances actuelles a été extrapolée à partir d'études sur le SARS-CoV et le MERS-CoV.[52]

Le cycle de multiplication de SARS-CoV-2 dans la cellule comporte les étapes d'attachement, de pénétration et décapsidation puis les synthèses des macromolécules (acides nucléiques et protéines). Ces synthèses vont permettre l'assemblage des nucléocapsides puis l'enveloppement et la libération des virions.[53]

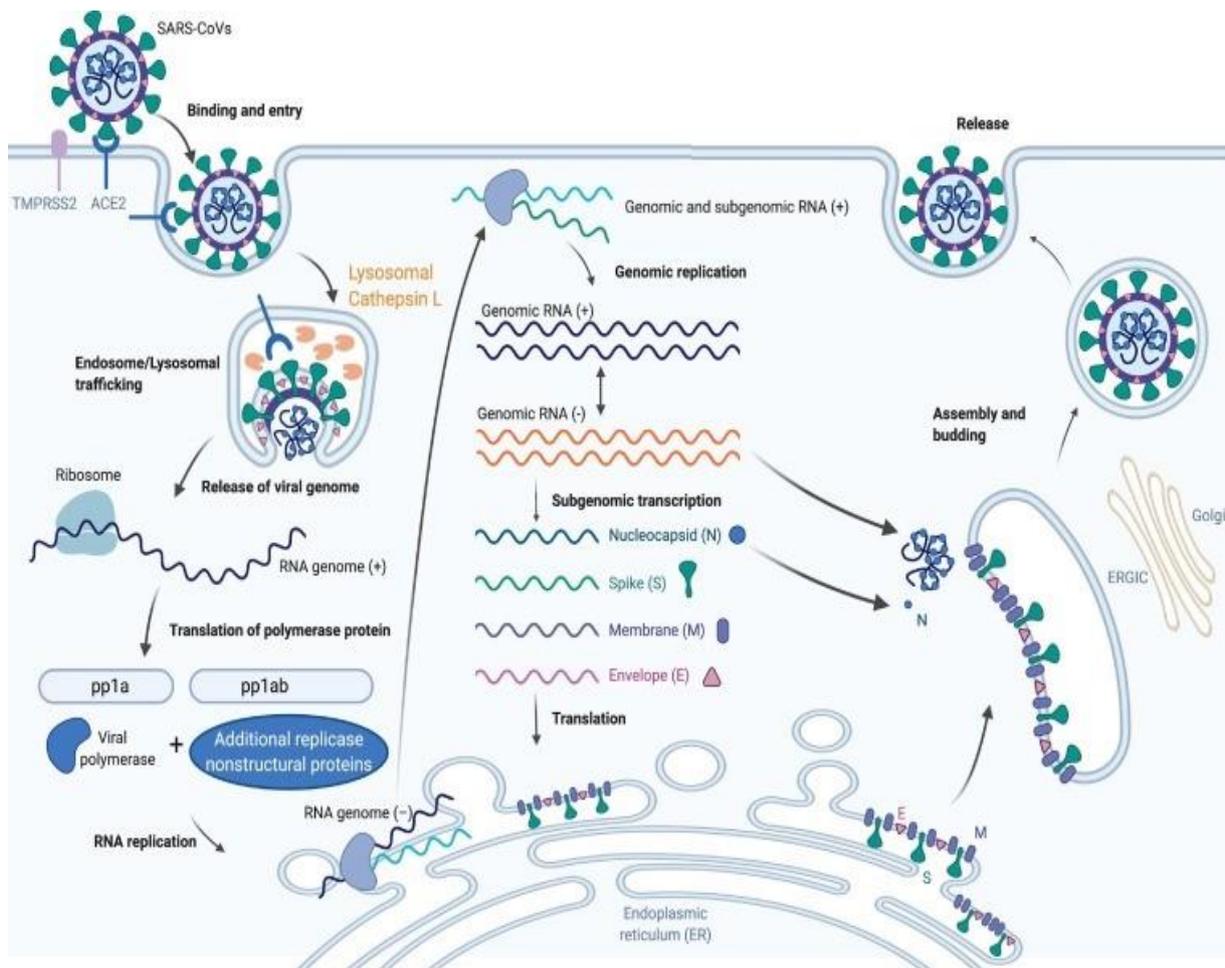


Figure 7 : Cycle de réplication du virus SARS-CoV-2 chez l'homme.[54]

Chapitre I : virologie du SARS-CoV-2 et les autres coronavirus humains

8.1 Entrée dans la cellule hôte

Le SRAS-CoV-2 peut détourner la cellule de deux manières, soit via des endosomes, soit via la fusion de la membrane plasmique. Dans les deux sens la protéine S du SRAS-CoV-2 médie l'attachement à la membrane d'une cellule hôte et engage l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 (ACE2) comme récepteur d'entrée.

La protéine S (constituée de deux sous-unités fonctionnelles : la sous-unité S1 qui permet la liaison du virus au récepteur de la cellule hôte par son domaine de liaison au récepteur (RBD), et la sous-unité S2 qui contient des régions de répétition de l'heptade HR1, HR2 et le peptide de fusion, qui assure la médiation de la fusion des membranes virales et cellulaires lors de réarrangements conformationnels étendus. Ce processus connu sous le nom d'« amorçage » se déclenche par une protéase appelée TMPRSS2 qui clive la protéine S.[54, 55]

8.2 Réplication virale

8.2.1 Traduction primaire du génome

Après la fusion, les éléments intracellulaires du virus sont relargués dans le cytoplasme. L'ARN viral, de polarité positive, est traité comme un ARN messager par la cellule hôte : il est directement traduit par la machinerie cellulaire en précurseurs polyprotéiques.

La traduction de l'ORF1a et l'ORF1b à partir de l'ARN génomique produit deux polyprotéines PP1a et le PP1ab respectivement. 16 protéines non structurales sont générées à partir de PP1a et PP1ab par un clivage protéolytique. La RdRp et 15 autres protéines non structurales s'associent pour former le complexe de transcription/réplication (CTR).[56]

8.2.2 La transcription de l'ARN viral

Dans un premier temps, le CTR réplique le génome viral en une molécule d'ARN complémentaire de sens négatif appelée antigénome. L'antigénome est un intermédiaire de réplication qui sert de matrice pour la réplication d'un nouveau genome (ARN+).

La réplication est discontinue et stoppe au niveau des séquences de régulation de la transcription (TRS), Ainsi, l'antigénome est un jeu d'ARN-sous-génomiques (sg) de longueurs différentes, qui vont servir de matrice à la synthèse d'ARNm sg (+).[5]

8.3 Expression des protéines structurales et accessoires

Les ARNm (sg) sont traduits en protéines nsp et structurales. Les protéines N se fixent à l'ARN+ viral pour former la nucléocapside, qui est assemblée aux protéines structurales M, S, HE et E au niveau du réticulum endoplasmique (RE), où elles subissent leur maturation. Une

Chapitre I : virologie du SARS-CoV-2 et les autres coronavirus humains

fois assemblés, les virions sont dirigés vers l'appareil de Golgi où ils subissent une nouvelle maturation par glycosylation.[5]

8.4 Libération de nouveaux virions

Les vésicules contenant les virus mûres bourgeonnent de l'appareil de Golgi puis fusionnent avec la membrane cellulaire avant que les virions ne soient libérés. [5, 55]



Chapitre II : La COVID -19

Chapitre II : La COVID -19

1 Définition de la COVID-19

Etymologie : COVID-19 vient de l'acronyme anglais :

Co : corona

Vi ; Virus

D ; Disease (maladie)

19 ; 2019 (année d'apparition)

La COVID-19 est une maladie infectieuse émergente de type Zoonose virale causée par la souche de coronavirus SARS-CoV-2.[57, 58]

2 Epidémiologie

2.1 Durée d'incubation

C'est une notion importante pour déterminer la durée de l'isolement afin de contrôler la propagation de l'infection. Elle est comparable à celle retrouvée avec d'autres virus dits respiratoires ou la porte d'entrée de l'agent infectieux et le site définitif de réplication virale sont similaires. Elle a été estimée entre 2–7 jours (moyenne de 4 jours) dans l'étude de Guan et al. de 5,2 jours (4–7) dans l'étude de Qun et al.[59, 60]

2.2 Contagiosité

Elle s'évalue par un indicateur appelé R_0 (ou taux de reproduction), correspondant au nombre moyen d'infections secondaires pouvant être générées à partir d'un cas index, dans une population entièrement susceptible d'être infectée, l'OMS avait estimé le R_0 à 2,6 (1,5–3,5). En mars 2020, une méta-analyse montrait que ce R_0 était probablement supérieur, estimé à 3,3. La maladie semble être contagieuse durant la phase d'incubation évaluée à 02 jours avant l'apparition des symptômes. La charge virale minimale infectante est estimée à 100 particules selon des études portées sur des modèles animal et humain. Des études suggèrent que la contagiosité est probablement plus importante lors des premiers jours de symptômes et qu'elle pourrait persister plus de trois semaines. Cependant, un résultat positif de qRT-PCR ne signifiant pas nécessairement que le virus est vivant et infectieux en particulier pour les charges virales les plus faibles, cette évaluation nécessite des cultures virales. [61-64]

2.3 Transmission

La transmission interhumaine du SRAS-CoV-2 est principalement intrafamiliale et est favorisée par les concentrations d'individus.[65]

Chapitre II : La COVID -19

Ce virus peut rester viable pendant 3 heures dans les aérosols et 72 heures sur les surfaces inertes, suggérant une contamination de type aéroporté, manuporté ou par contact étroit, la prédominance de l'un et/ou de l'autre des types de transmission dépend du contexte de la contamination. Par ailleurs, la présence d'ARN viral dans les selles a fait évoquer la possibilité d'une contamination oro-fécale, qui n'a toutefois pas été démontrée à ce jour. Les données sur la contamination par voie oculaire et maternofoetale sont controversées.[9, 66-68]

2.4 Létalité

Le taux de létalité d'une infection représente la probabilité de mourir pour une personne infectée, qu'elle aille ou non à l'hôpital. Le 31 décembre 2020, une modélisation réalisée à partir de 89 millions de cas confirmés à travers le monde dont deux millions de décès estimait un taux de létalité à 2.16% à l'échelle mondiale mais avec de grandes disparités entre les pays (un maximum de 28.7% au Yémen et un minimum de 0.04% à Singapour).[69]

2.5 Facteur de risque d'infection au COVID-19

Selon les catégories suivantes sont plus à risque d'infection, de complication, d'admission aux soins intensifs et de décès :

- Sexe masculin.
- Age supérieur à 70 ans.
- Résidents et travailleurs des maisons de retraite et des EHPAD.
- Les professionnels de santé. [70, 71]

3 Physiopathologie de la COVID-19

La COVID-19 implique des interactions complexes entre le virus, le système immunitaire avec ces différentes composantes et les tissus concernés par l'infection.

3.1 Rappel sur le système Rénine Angiotensine-Aldostérone(RAA)

C'est l'un des systèmes hormonaux régulateurs des fonctions autonomes, cardiovasculaire et pulmonaire .il s'agit d'une cascade de régulation endocrinienne et enzymatique (figure8)

Chapitre II : La COVID -19

Renin-angiotensin-aldosterone system

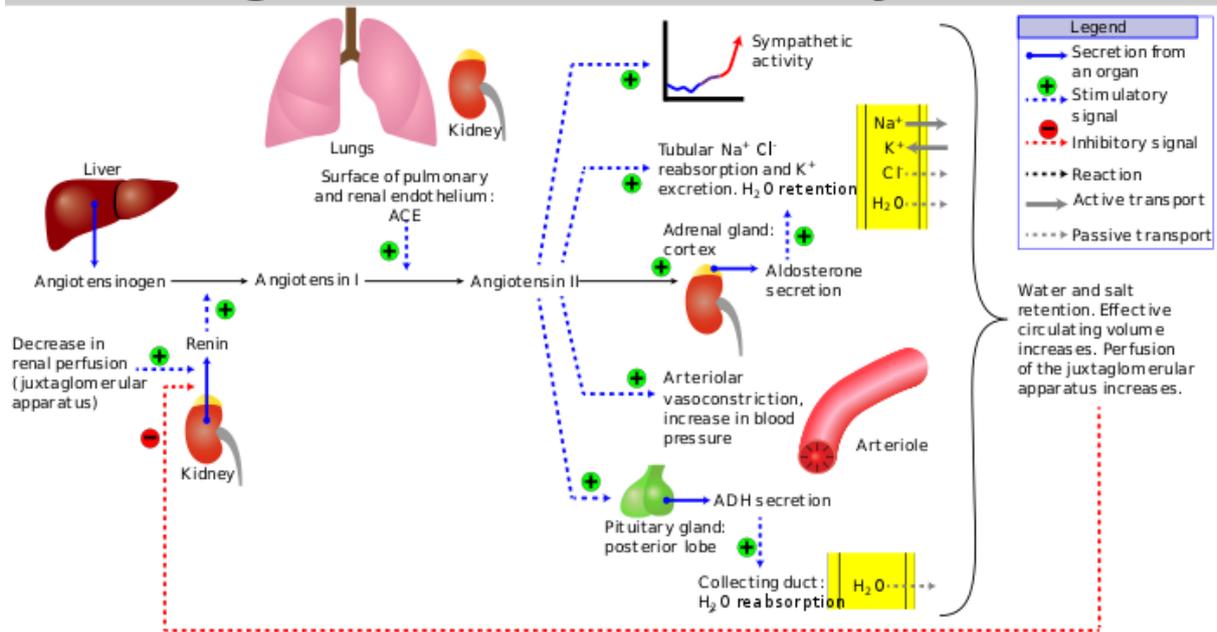


Figure 8 : Pharmacologie du système rénine angiotensine aldostérone.[72]

3.2 Interactions SARS-CoV-2 – Récepteur et implication dans le développement de la maladie

L'ACE2 c'est le principal récepteur cellulaire du SARS-CoV-2. Il régule négativement le SRAA et agit comme un désactivateur de de l'angiotensine II qui est un peptide vasoconstricteur, pro fibrosant et pro-inflammatoire. Le blocage du système rénine angiotensine diminue l'activité pro-inflammatoire de l'Angiotensine II, donc diminution durisque au SDRA, mais ce blocage augmente l'expression de l'ACE2, favorisant la virulence du SARS-CoV-2 et l'évolution vers le SDRA.[73, 74]

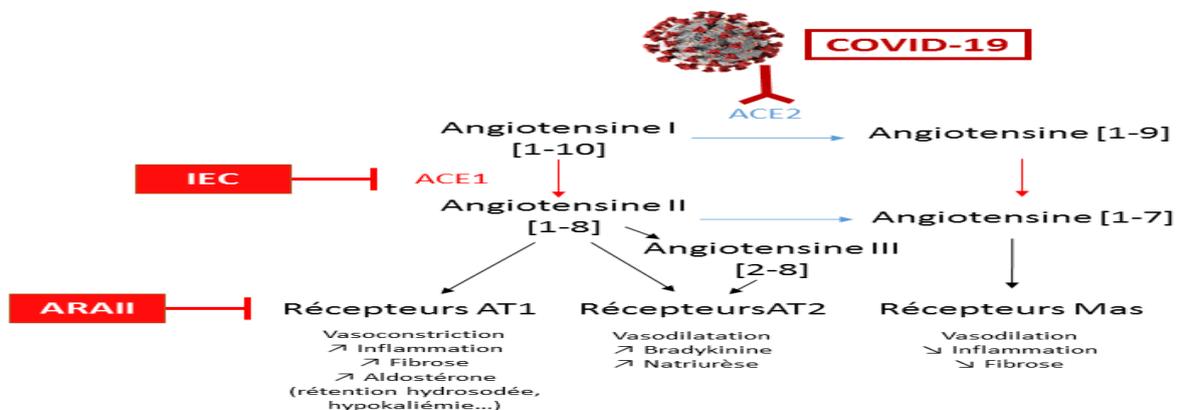


Figure 9 : Vue générale du système rénine-angiotensine-aldostérone en cas d'infection par le COVID-19.[74]

Chapitre II : La COVID -19

L'ACE2 exerce un rôle protecteur de différents tissus des effets délétères de l'angiotensine II. Son internalisation lors de l'infection entraîne un déséquilibre en faveur de l'activité délétère de l'angiotensine II. Dans ce sens, une étude montre que l'injection de la protéine Spike seule est capable d'induire directement des lésions tissulaires liées à l'inhibition de l'activité ACE2.

L'expression tissulaire d'ACE2 se fait sous deux formes : une forme membranaire et une forme soluble obtenu par clivage de l'ACE2 membranaire ; cette dernière pourrait être un facteur protecteur contre la COVID-19 suite à l'observation paradoxale que les sujets âgés, exprimant moins d'ACE2 tissulaire, développaient une forme plus sévère de la maladie qui pouvait être due enfin de compte à une forme soluble moins abondante.[74]

L'activité d'ACE2 circulante semble faible chez les patients en surpoids ou hypertendus alors qu'elle est plus forte chez les enfants et qu'elle est corrélée positivement à l'expression d'œstrogènes anti-inflammatoires. Ceci explique, pour certains auteurs, la relative protection des enfants par rapport aux adultes et des femmes par rapport aux hommes dans la COVID-19.[75, 76]

Il a été suggéré qu'une forte expression d'ACE2 conduisait à une susceptibilité accrue à l'infection. Toutefois, la distribution anatomique d'ACE2 n'est pas strictement corrélée à la symptomatologie provoquée par l'infection par le SARS-CoV-2 ce qui fait évoquer la possibilité d'une invasion cellulaire indépendante d'ACE2.[77]

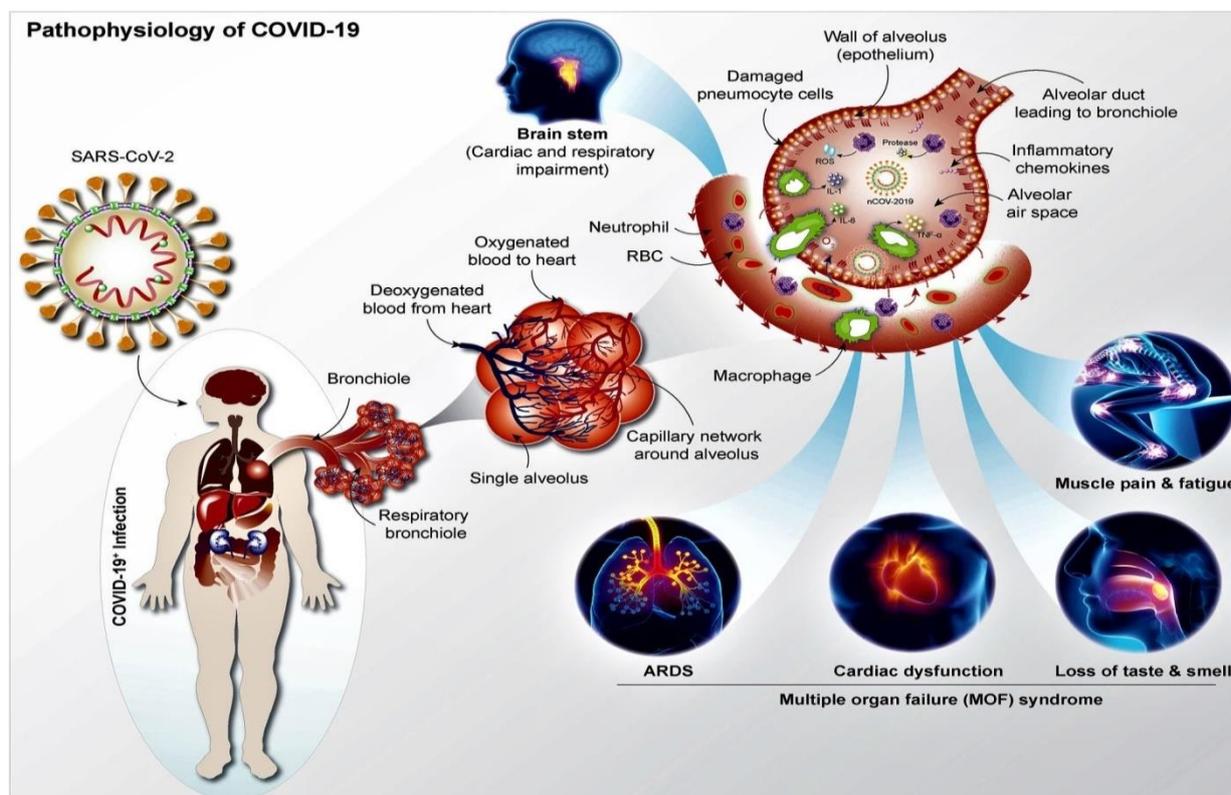


Figure 10 : Physiopathologie lié à l'infection par le SARS CoV-2.[55]

Chapitre II : La COVID -19

3.3 Tropisme cellulaire du SARS-CoV-2

3.3.1 In Vitro

Voire chapitre I partie 7.2 cellule sensible (in vitro)

3.3.2 In Vivo

- ✚ Le SARS-CoV-2, principalement transmis via les gouttelettes respiratoires, peut infecter les pneumocytes qui expriment l'ACE2 et peut provoquer une réaction inflammatoire se traduisant par une détresse respiratoire de gravité variable, pouvant aboutir dans sa forme la plus grave à un SDRA.[78, 79]
- ✚ Il a été démontré que le SARS-CoV-2 était capable d'infecter les entérocytes humains qui exprime abondamment l'ACE2 et la TMPRSS2.[80, 81]
- ✚ L'ACE2 est faiblement exprimé dans le tissu cérébral, le neurotropisme éventuel du SARS-CoV-2 provoque des atteintes cérébrales tardives. Une neuro-inflammation pourrait être responsable des manifestations neuropsychiatriques déjà démontré pour le SARS-CoV1 et MERS-CoV. [82, 83]

3.4 Réponse immunitaire anti SARS-CoV -2 et rôle dans le développement des lésions d'organe

3.4.1 Immunité innée

Les déterminants de la réponse immunitaire immédiate au SARS-CoV-2 ne sont pas encore connus, mais peuvent être extrapolés à partir des modèles d'infection virale. L'infection des cellules épithéliales et immunitaires du tractus respiratoire et entraîne la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1, IL-6), à l'origine de l'hyperperméabilité capillaire de l'attraction de cellules inflammatoires et production d'interférons de type I.

L'inefficacité de la réponse immunitaire initiale entraîne une hyperactivation immunitaire responsable de l'aggravation clinique chez certains patients. [84, 85]

Chapitre II : La COVID -19

3.4.2 Hypersécrétion cytokinique (orage cytokinique)

Des taux élevés de cytokines circulantes ont été rapportés chez les patients atteints de COVID-19 sévère en particulier les chimiokines et les Cytokines pro-inflammatoires (IP10, MCP-1, MIP1a, IL-2, IL-6, IL-7, TNF α , G/GM-CSF). [86]

Dans l'étude de Zhou et al., des taux élevés d'interleukine-6 circulante étaient statistiquement associés à l'apparition d'une forme sévère. [87]

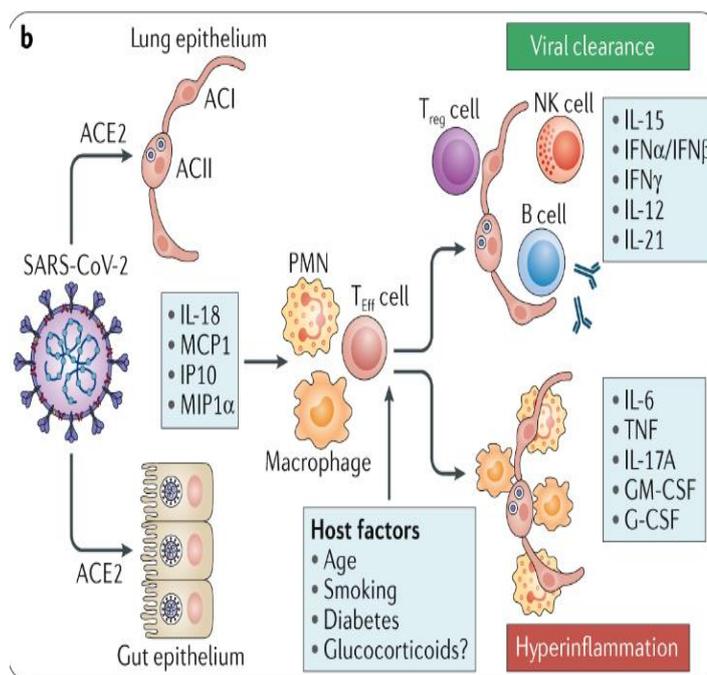


Figure 11 : Les acteurs incriminés dans l'hyperinflammation suite à l'infection par le virus SARS-CoV-2.

3.4.3 Signature interféron

Deux types de réponses IFN ont été décrits, ayant une base génétique probable :

- Soit l'infection déclenche une sécrétion d'IFN-1 élevée, participant à entretenir l'inflammation et augmentant l'expression d'ACE2 sans réussir à contrôler l'infection mais s'associant à une diminution partielle de la réplication virale. [88]
- Soit une réponse IFN-1 faible, favorisant la réplication virale elle-même directement responsable de l'inflammation.

D'autre part, la signalisation IFN- λ pourrait avoir un rôle protecteur via l'induction de STAT2, en contrôlant la sécrétion cytokinique et favorisant la réparation tissulaire. [89]

Il a été démontré chez le patient ayant un échec de la réponse innée médiée par les Interférons, comme les individus ayant des auto-anticorps anti IFN de type I, un plus haut risque de formes mortelles d'origine immunopathologique (orage cytokinique). [90]

Chapitre II : La COVID -19

3.4.4 Immunité adaptative au SARS-CoV-2

Elle a trois composantes essentielles : les cellules T (CD4+ et CD8+) et les anticorps. La synchronisation entre ces différents éléments ainsi que l'immunité innée semble primordiale pour une réponse immunitaire efficace contre l'infection SARS-CoV-2.[91]

3.4.4.1 La réponse TCD4+

Les CD4+ spécifique du virus sont retrouvés dès les premiers jours de l'apparition des symptômes (2-4 jours). Chez les patients convalescents, il plusieurs populations de CD4+ selon l'antigène reconnu.

L'installation de la réponse médiée par les CD4+ est associé avec des formes bénignes et a un contrôle immunitaire de l'infection.[92] Les lymphocytes TCD4+ ont la capacité de se différencier en plusieurs types cellulaires en réponse à l'infection SARS-COV-2 et exprime une large gamme de fonction entre Helper et effecteur incluent :

- Les T Helper Folliculaires : stimulant la maturation et la production des anticorps par les Lymphocytes.
- Les T Helper I : a activité antivirale directe (IFN- γ), recrutement d'effecteurs de l'immunité innée, stimulation la maturation des lymphocytes TCD8+ et initiation de la

réparation tissulaire à travers IL-22.[92]

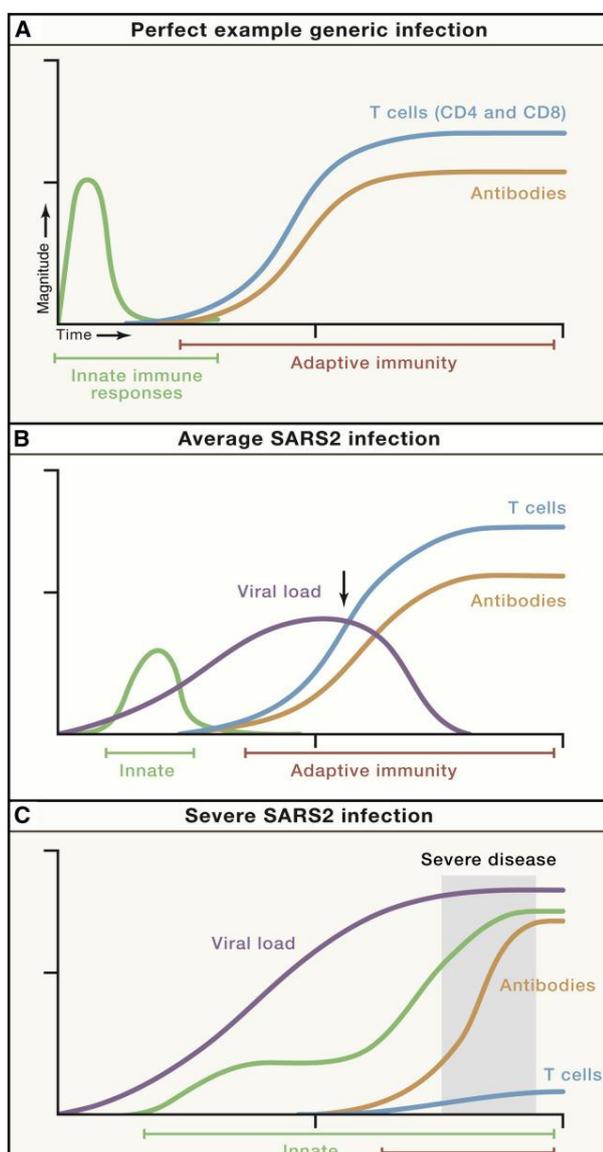


Figure 12 : L'évolution de la réponse immunitaire selon la sévérité de la COVID 19. (89)

Chapitre II : La COVID -19

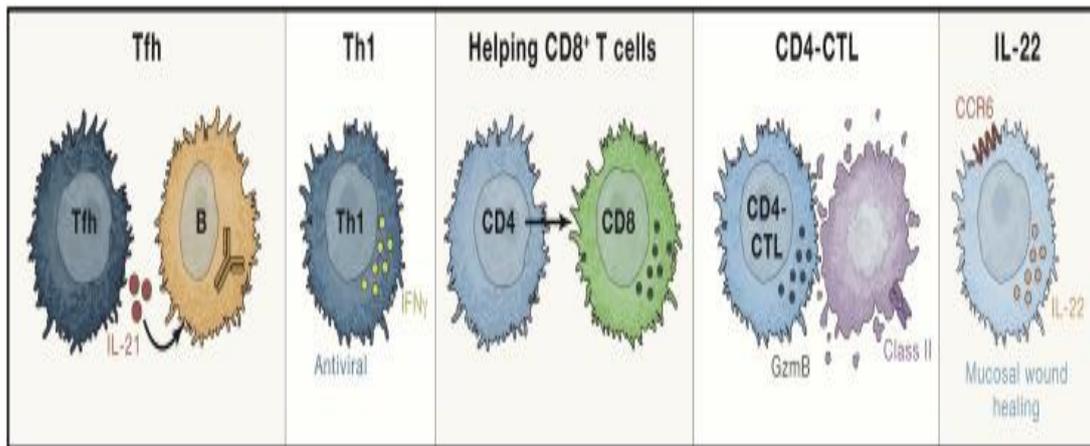


Figure 13 : Rôle de la réponse TCD8+/TCD4+ dans l'infection à SARS-CoV-2.[90]

3.4.4.2 La réponse TCD8+

Ont pour rôle l'élimination des cellules infectées, leur présence est associée à un bon pronostic. Ces cellules apparaissent très rapidement durant l'infection aiguë (aussi tôt que 01 jour après apparition des symptômes), bien que leur présence ne soit pas aussi fréquente que celles des TCD4+.

Leurs spécificités de reconnaissance est aussi large que celle des TCD4+ avec les protéines Spike, M et N comme antigènes cibles majeurs.[92]

3.4.4.3 Réponse à lymphocytes B et anticorps

Plusieurs protéines virales du SARS-CoV-2 peuvent induire une réponse humorale dirigée principalement contre les protéines N et S avec le RBD de cette dernière comme principale cible des anticorps neutralisants.[93]

La séroconversion survient en moyenne à 10 jours, atteignant 100 % à 15 jours. Les différents isotypes IgG/M/A semblent apparaître en même temps.

Les anticorps semblent agir par plusieurs mécanismes à savoir via la neutralisation directe de l'infectiosité du virus en bloquant l'interaction RBD-ACE2 mais aussi à travers la facilitation médiée par le fragment Fc des Ig (Cytotoxicité, opsonisation ...)

Ces anticorps principalement les IgG semblent avoir une durée de vie de plus de 05 mois en même temps que les Lymphocytes B mémoires à IgG. [94]

Chapitre II : La COVID -19

Cependant, l'efficacité de la réponse humorale semble très limitée par rapport aux effecteurs cellulaires et n'est pas corrélée au titre d'anticorps suggérant le rôle primordial qu'a la collaboration entre les différents acteurs de l'immunité innée et adaptative. [92, 95]

3.4.4.4 Rôle de l'immunité adaptative dans l'immunopathologie de la COVID-19

Bien que les effecteurs de l'immunité innée semblent être les plus impliquée dans les lésions immuno-induites durant la COVID-19 aigue, plusieurs arguments sont en faveur du rôle aussi important des effecteurs de l'immunité adaptative :

- **L'immunopathologie des cellules T**

Plusieurs hypothèses évoquées mais non prouvés :

- Biais Th1/Th2.
- Les Cellules T tissulaires non circulantes ; qui induisent des lésions in situ.
- Les CD8+ activés de spécificité antigénique non déterminé. [92]

- **L'immunopathologie médiée par les anticorps :**

Parmi les hypothèses évoquées :

- Les anticorps facilitants (antibodymediatedenhancement) : évoqué mais non prouvé pour le SARS-COV-2.
- Les complexes immuns activant l'inflammation
- La présence d'auto-anticorps à activité anto-phospholipides pro thrombotiques ; mais leurs implications directes dans la coagulopathie observée lors la COVID-19 sèvre reste débattue. [90]

3.5 Interaction Virus-Immunité et développement de la coagulopathie liée à la COVID-19

Il est apparu très tôt durant l'épidémie que les troubles de la coagulation sont parmi les manifestations les plus fréquentes et une des principales causes de mortalité par COVID-19. Elles touchent aussi bien la micro que la macro-circulation avec parfois des répercussions catastrophiques sur l'évolution du patient : embolies pulmonaires, CIVD, AVC... [96, 97]

Les mécanismes physiopathologiques sont résumés dans la figure14.

Chapitre II : La COVID -19

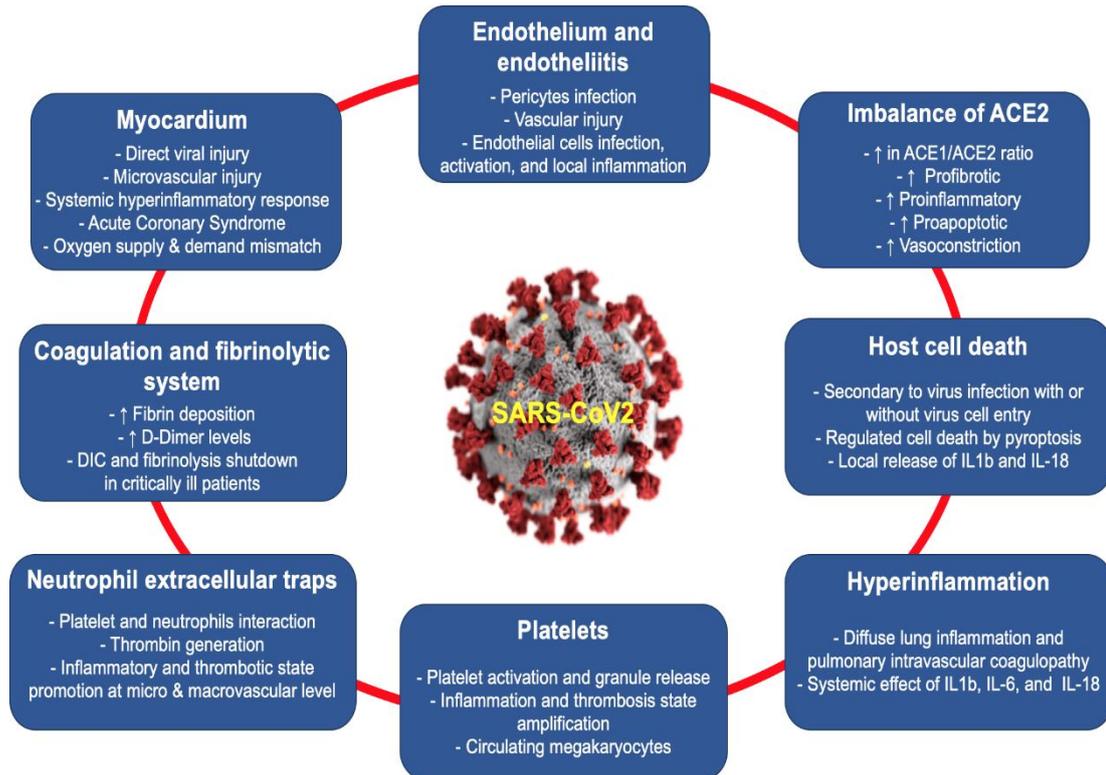


Figure 14 : Effets de la maladie à coronavirus 2019 sur le système cardiovasculaire et de coagulation[98]

3.6 L'immunité croisée

Plusieurs auteurs ont signalé l'absence de réactivité croisée des anticorps anti-SARS-CoV-2 avec les coronavirus banals (229E, NL63 et OC43), et/ou plusieurs autres virus respiratoires (adénovirus, bocavirus, entérovirus, Métapneumovirus humain, Influenza A et B, rhinovirus, virus respiratoire syncytial, virus para-influenza-1 et -3). Par contre, une réactivité croisée existe possiblement avec le SARS-CoV-1 pour les anticorps dirigés contre les protéines S1, RBD et N, et avec le MERS-CoV uniquement pour les anticorps dirigés contre la protéine N. [99, 100]

3.7 La réinfection

Le nombre de cas rapportés de réinfection reste anecdotique. L'analyse de ces cas est cependant cruciale pour comprendre l'impact réel de l'immunité adaptative sur le contrôle de l'infection et de la maladie. [101]

L'excrétion virale pouvant être prolongée, il est important de s'assurer au cours d'une suspicion de réinfection que les souches virales ont pu être séquencées et qu'elles sont différentes. La plupart des réinfections sont survenues chez des sujets jeunes en l'absence de

Chapitre II : La COVID -19

problèmes d'immunosuppression. Dans un des cas, le virus retrouvé lors du second épisode portait une mutation associée à une résistance à la neutralisation *in vitro*. [64, 102, 103]

Au cours d'une infection virale, une réinfection par un même agent infectieux peut relever de différents mécanismes :

- Une perte de la protection immunitaire.
- La sélection d'un variant génétique rendant la réponse inefficace, événement régulier au cours de l'évolution des virus grippaux par exemple.

Une équipe de Hong-Kong a rapporté une réinfection chez un patient de 33 ans. Dans ce cas clinique, on note les points suivants :

- Une première infection modérément symptomatique et une réinfection qui l'est encore moins.
- L'absence d'anticorps au début du deuxième épisode.
- Des souches virales différentes lors des deux épisodes. [104]

4 Caractéristiques cliniques, biologiques et radiologiques du COVID-19

4.1 Définition de cas COVID-19

Selon l'organisation mondiale de la santé : [105]

- **Cas suspect** : une personne qui remplit des critères cliniques et épidémiologiques ou un patient présentant une IRSA en présence d'antécédent de fièvre 38°C et toux apparue au cours des 10 jours et nécessite une hospitalisation.
- **Cas probable**
 - Un patient qui remplit les critères cliniques et qui a été en contact avec un cas confirmé ou probable.
 - Un cas suspect pour lequel une imagerie thoracique révèle des indicateurs de covid-19.
 - Une personne atteinte d'anosmie ou d'ageusie en l'absence de toute autre cause identifiée.
 - Un décès sans autre explication d'un adulte qui a présenté une détresse respiratoire avant le décès et qui a été en contact avec un cas probable ou confirmé.
- **Cas confirmé** : une personne présentant une infection par le virus de la covid-19 confirmé en laboratoire quels que soit les signes et les symptômes cliniques.

Chapitre II : La COVID -19

4.2 Formes cliniques de la COVID-19

La COVID-19 est une maladie respiratoire au premier plan, le poumon est l'organe de prédilection. Il s'est cependant rapidement révélé qu'il s'agit d'une maladie systémique impliquant des composantes virologiques immunologiques et lésionnelles.

Hormis des signes généraux comme la fièvre et l'asthénie, les signes respiratoires sont au premier plan et sont de sévérité variable.

D'autres manifestations, moins fréquents, sont observés principalement neurologiques et digestifs.[106]

Les principales formes cliniques observées sont :

4.2.1 Incubation et formes asymptomatiques

La durée d'incubation moyenne est estimée à 06 jours avec des extrémités allant de 0 à 24 jours. Durant cette phase la contagion est possible.

Plusieurs enquêtes épidémiologiques suggèrent que des individus auraient été infectés par des personnes asymptomatiques ou pré-symptomatiques dont la prévalence est très variable selon les études (de 5% à 80%) ou une moyenne de 40%

La charge virale d'un patient asymptomatique serait similaire à celle des individus présentant des symptômes.

Selon les données obtenues du Diamond Princess, 54% des individus asymptomatiques présentaient des lésions pulmonaires au Ct Scan dont 11% de lésions sévères posant la question de la définition précise de « cas asymptomatique ».

Cette prévalence des formes asymptomatiques qui peut être forte, suggère que le diagnostic clinique engendrerait un nombre important de faux négatifs ;Le dépistage systématique de certains groupes de personnes a été recommandé par plusieurs organisations expertes. [107-109]

4.2.2 Les formes symptomatiques

La maladie se présente sous plusieurs catégories de sévérité :

4.2.2.1 La COVID-19 bénigne

Elle est habituellement caractérisée par des symptômes d'infections virales des voies respiratoires supérieures, qui sont bien tolérés au titre de la Fièvre modérée, toux séché,

Chapitre II : La COVID -19

congestion nasale, gorge douloureuse, céphalées et douleurs musculaires. Des symptômes moins fréquents comme la diarrhée, la rhinorrhée, l'anosmie/agueusie peuvent être observés chez certains individus. A ce stade, l'imagerie ne révèle quasiment pas d'atteinte pulmonaire. Cependant ce type de formes, non pris en charge, peut rapidement se détériorer en forme COVID-19 sévère.[110]

4.2.2.2 La COVID-19 modérée

En plus des symptômes cités plus haut, les individus présentent un souffle court et dyspnée.[110]

4.2.2.3 La COVID-19 sévère et SDRA

Ces patients se présentent avec un tableau de Pneumonie sévère, SDRA ou état de choc septique et coagulopathie.

Le SDRA est défini par :

- Une dyspnée avec tachypnée (fréquence respiratoire > 30/minute).
- Détresse respiratoire avec effondrement de la $SpO_2 \leq 93\%$, $PaO_2/FiO_2 < 300$.
- Infiltration pulmonaire supérieure à 50% en 24h à 48h.

Ultimement, les patients en état critique développent des signes d'insuffisance respiratoire, de lésions cardiaques et rénales ainsi qu'un état de choc septique avec défaillance multiviscérale. A ce stade la mortalité est supérieure à 49%. [111, 112]

Cette clinique s'accompagne par des modifications biologiques et radiologiques décrites dans le tableau ci-dessous :

Chapitre II : La COVID -19

Tableau 3: Principales signes biologiques et radiologiques de COVID 19

Signes Biologiques[113, 114]	Signes radiologiques[115-118]
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Élévation des polynucléaires neutrophiles et lymphopénie, étendue aux lymphocytes CD4 et CD8 (dont le ratio CD4/CD8 semble préservé). ➤ Élévation de la CRP jusqu'à 150 mg/L, hypo-albuminémie (médianes 32–32,3 g/L), hyperferritinémie élévation et une hyperbilirubinémie. ➤ Diminution du TP et une augmentation des D-dimères, stigmates d'une coagulopathie associés aux formes graves et prédictives de la mortalité. ➤ Élévation des PNN, hyperbilirubinémie totale, hypo-albuminémie, élévation de l'urée et des LDH, baisse du TP et une lymphopénie. ➤ Élévation de l'interleukine-6 circulante associée au décès par SDRA mais pas à la survenue d'un SDRA. ➤ Les marqueurs de souffrance d'organe, qu'il s'agisse d'une élévation des ASAT/ALAT, de la créatininémie ou de la troponine, prédictifs de la mortalité. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Pneumopathie souvent bilatérale avec anomalies à distribution postérieure et sous-pleurale, épaississement des parois bronchiques. ➤ La réalisation du scanner par rapport aux premiers symptômes, montre une prédominance d'images en verre dépoli au stade initial évoluant vers une association de verre dépoli, d'opacité réticulaires et de foyers de condensation. ➤ Le principal signe scanographique de gravité est l'étendue des anomalies parenchymateuses une corrélation entre l'extension des lésions et la sévérité clinique. ➤ La Société d'imagerie thoracique (SIT) a une classification visuelle en 5 stades, basée sur le pourcentage de poumon lésé : atteinte absente ou minime (< 10 %), modérée (10–25 %), étendue (25–50 %), sévère (50–75 %) ou critique (> 75).

4.3 Facteur de risque de complication

- L'âge supérieur à 50 ans apparaissait comme fortement associé à la survenue d'un SDRA et l'âge supérieur à 65 était associé à la mortalité.[113]
- Personne porteuse d'une comorbidité dont les principales étaient le diabète, une pathologie cardiaque, une HTA, une pathologie pulmonaire ou une obésité morbide
- Les variations génétiques individuelle peuvent contribuer à expliquer différentes réponses immunitaires dont la variation de la clinique de la forme asymptomatique jusqu'à la forme sévère : au moins 10 % des patients présentant une forme clinique critique de Covid-19 ont des anomalies immunologiques comme les anticorps anti IFN de classe 1 et des mutations spécifiques dès l'immunité innée antivirale. [119, 120]

Chapitre II : La COVID -19

- Les femmes enceintes représentent une population particulièrement exposée aux pneumopathies infectieuses, du fait des modifications physiologiques, propres à la grossesse plusieurs études semblent montrer que les femmes enceintes au troisième trimestre de grossesse ont un risque de développer une forme grave proche de celui observé dans la population générale. [121]
- Chez les patients immunodéprimés, Par analogie à d'autres virus responsables d'infections potentiellement sévères, le SARS-CoV-2 a été considéré comme pouvant être responsable d'infections sévères ou prolongée dans cette population. Les patients suivis pour un cancer semblent plus à risque de développer une forme sévère de COVID-19 que les patients non atteints de cancer et la chimiothérapie récente majore ce risque. Des études plus larges permettront de confirmer si les patients immunodéprimés font partie des populations à risque. [122-124]
- Chez les patients de moins de 15 ans.L'infection par le SARS-CoV-2 semble moins fréquemment symptomatique même rare et moins grave que chez l'adulte.la forme pédiatrique du covid-19 est généralement gastro-intestinal isolé ou associé à une pneumonie bénigne. [125, 126]

Les symptômes, signes ou paramètres cliniques anormaux persistants deux semaines ou plus après le début du COVID-19 et qui ne reviennent pas à une base saine peuvent potentiellement être considérés comme des effets à long terme de la maladie.

Bien qu'une telle altération soit principalement signalée chez les survivants d'une maladie grave et critique, les effets durables se produisent également chez les personnes atteintes d'une infection légère qui n'ont pas nécessité d'hospitalisation.[85]

5 Traitement et thérapeutique

Comme il n'existe actuellement aucun traitement spécifique de la COVID-19, la prise en charge clinique met l'accent sur l'importance des soins de soutien et de la prévention des complications et de la transmission nosocomiale. Actuellement, il n'y a pas d'a preuve que tout médicament antiviral existant peut traiter efficacement la COVID-19. La thérapeutique antivirale vise deux objectifs :

- Action directe virus, soit en inhibant l'enzyme virale cruciale responsable de la réplication du génome, soit en bloquant l'entrée virale dans les cellules hôte.

Chapitre II : La COVID -19

- Modulation de la réponse immunitaire, en stimulant la réponse innée ou en inhibant les processus inflammatoires. [127]

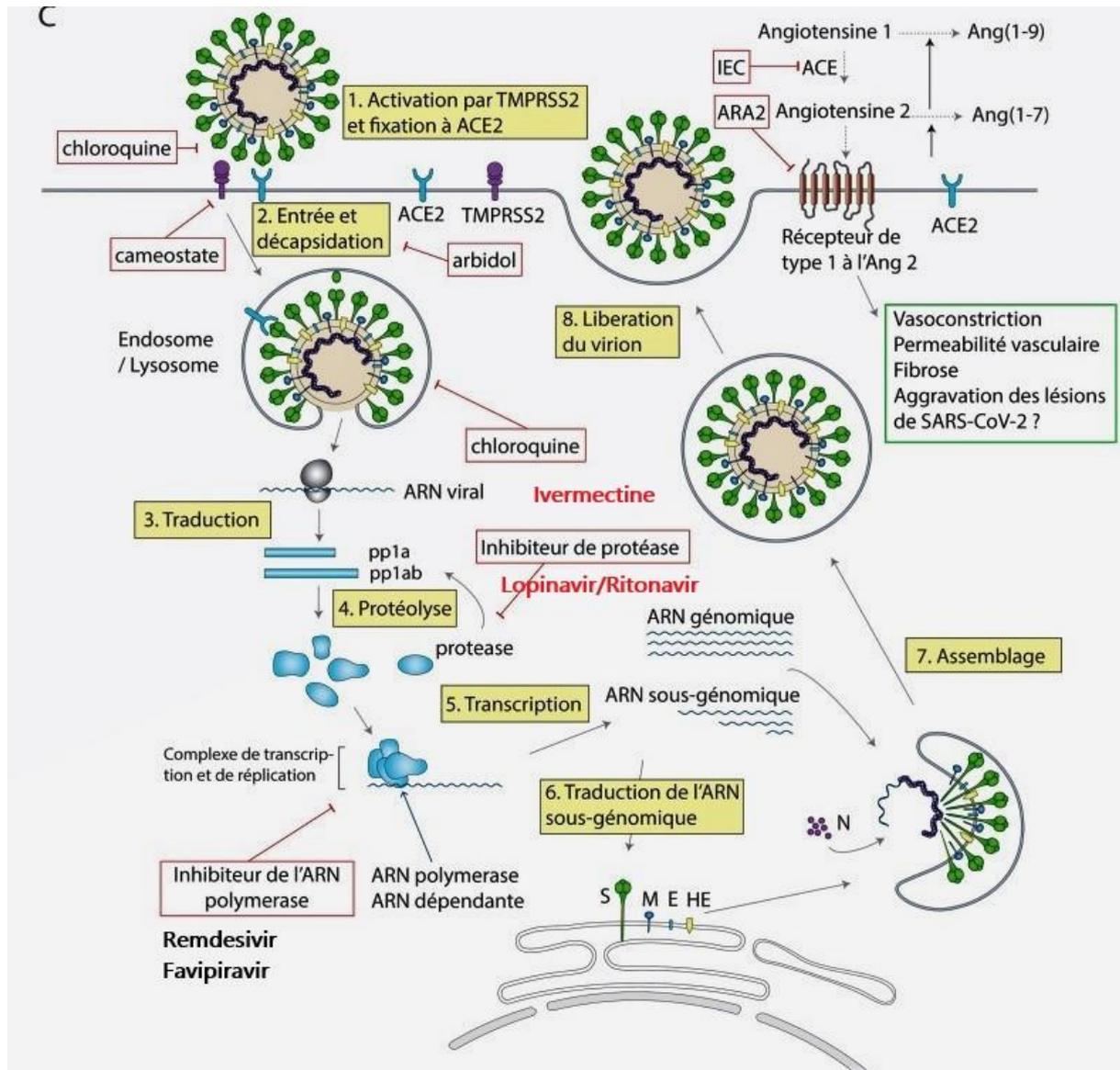


Figure 15 : Structure et réplique du SARS-CoV-2 et cible thérapeutique antivirale.[127]

La plupart de ces médicaments ont été initialement conçus pour d'autres agents Pathogènes et ont été rapidement réutilisés pour les essais COVID-19 en cours. Dans le même temps, plusieurs essais ont été lancés pour tester les vaccins et anticorps spécifiques ciblant spécifiquement le SRAS-CoV-2.[127]

Chapitre II : La COVID -19

5.1 Inhibition de l'entrée du SARS-CoV-2 dans la cellule

La première stratégie vise à empêcher le virus de pénétrer dans la cellule en jouant sur les mécanismes nécessaires à la fixation du virus à son récepteur, son endocytose ou la fusion membranaire.[127]

5.1.1 Chloroquine et hydroxychloroquine

Les mécanismes d'action de la chloroquine et de l'hydroxychloroquine seraient multiples, notamment une alcalisation lysosomiale induisant une inhibition de la fusion du virus à la surface cellulaire, un blocage de la réplication, une modification de glycosylation des protéines (notamment de l'ACE2).

La chloroquine est un médicament à marge thérapeutique étroite, l'hydroxychloroquine est moins toxique, mais, aux concentrations administrées, ces deux molécules ont une pénétration et accumulation cellulaire accrue notamment dans les tissus les plus concernés par la réplication virale comme le Poumon.

La première étude clinique, marseillaise, suggérait une négativation plus rapide de la charge virale, en association avec l'azithromycine. Ce traitement nécessite en revanche une surveillance cardiaque.[127, 128] (**Annexe 1**)

5.1.2 L'azithromycine

Connue pour ses effets immunomodulateurs, semblant être liés à l'induction d'IFN et son action sur la réplication virale. Dans le cadre de la Covid-19, il n'a pas été observé à ce jour de différence sur la mortalité avec ou sans hydroxychloroquine sur des données rétrospectives. Les seules données prospectives actuellement disponibles sont celles des études, qui suggéaient, dans un premier essai, une diminution de la charge virale en association à l'hydroxychloroquine

Les effets indésirables cardiaques des macrolides, notamment le risque d'allongement du segment QT, sont bien connus, de même que leur effet inhibiteur du cytochrome 3A4.[129, 130]

5.1.3 Enzyme 2 recombinante de conversion de l'angiotensine humaine (APN01)

La rhACE2 pouvait inhiber la réplication du SRAS-CoV-2 dans les organoïdes cellulaires et embryonnaires dérivés de cellules souches d'un facteur 1 000 à 5 000 fois. « rhACE2 » peut diminuer le taux sérique d'angiotensine II en éloignant le substrat de l'enzyme apparentée,

Chapitre II : La COVID -19

l'ECA. Ce qui empêche une nouvelle activation du récepteur ACE2 et ainsi préserver l'intégrité vasculaire pulmonaire et prévenir le SDRA. [131]

5.1.4 Umifenovir (Chlorhydrate d'arbidol /Arbidol)

Actuellement en monothérapie, agissant par inhibition de la fusion de la membrane virale avec l'endosome après une endocytose.[132]

5.2 Inhibition de la synthèse de l'ARN viral

Ils sont utilisés avec succès pour le traitement de nombreux virus, dans le cas du SARS-CoV-2, plusieurs molécules se repositionnent comme des candidats prometteurs.[127]

5.2.1 Remdesivir

Le remdesivir est un analogue nucléosidique de l'adénosine, son incorporation dans l'ARN viral naissant inhibe d'avantage l'ARN polymérase ARN-dépendante, Cela entraîne une terminaison prématurée de la chaîne d'ARN viral et par conséquent arrête la réplication du génome viral.

Cette molécule présente de nombreux effets adverses : principaux effets indésirables relevés avec le remdesivir c'est qu'il provoque des :

- Taux élevé de mutation.
- Hypotensions parfois sévères,
- Des atteintes rénales (insuffisance rénale chez 10% des individus sous cette molécule)
- Atteintes hépatiques.
- Administration en perfusion continue prolongée (10 jours à exposer à un risque élevé de septicémies sur cathéter. [81, 133]

Cette molécule a été jugée inutile dans la COVID-19 par l'OMS. [134]

5.2.2 Favipiravir

Pro-drogue structurellement proche à la guanine endogène, est actif in vitro contre le SARS-CoV-2 par inhibition de l'ARN polymérase ARN-dépendante ce qui provoque une diminution le taux des replicons.

Elle a été approuvée par la NMPAC comme le premier médicament anti-COVID-19 en Chine, son essai clinique avait démontré une efficacité avec un côté minimal d'effet indésirable.

[135, 136]

Chapitre II : La COVID -19

Il est contre indiqué pendant la grossesse en raison de la mort embryonnaire précoce et de la tératogénicité dans les études animales. [137]

5.3 Inhibition la protéase virale

Une autre stratégie est de cibler les protéases virales indispensables à la réplication. Si des études structurales permettront le développement de molécules spécifiques, des traitements développés contre la protéase du VIH ont montré une certaine efficacité in vitro contre le SARS-CoV-1 et le SARS-CoV-2.[127]

5.3.1 Ivermectine

L'ivermectine est un agent antiparasitaire, activités antivirales contre le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) approuvé. Il cible le transport nucléaire des protéines virales, une étude in vivo a prouvé la capacité de l'ivermectine à réduire l'ARN viral jusqu'à 5 000 fois après 48 h d'infection par le SRAS-CoV-2, l'efficacité de l'ivermectine sur le traitement du COVID-19 implique des essais pour déterminer la posologie adéquate. [138]

5.3.2 Lopinavir / Ritonavir

Le lopinavir et le ritonavir, inhibiteurs de la protéase du VIH, sont utilisés en association comme médicaments thérapeutiques anti-VIH. Bien qu'ils possèdent une activité in vitro contre le SARS-CoV-mais malheureusement n'a pas fait de preuve de son efficacité contre le COVID-19 ni sur le temps de la résolution clinique ni la clairance virale ni la mortalité ont été diminuées.[81]

5.4 Les agents immunomodulateurs

5.4.1 Les anti-interleukines

Siltuximab, tocilizumab et sarilumab sont dirigés contre le récepteur de l'interleukine (IL) 6, tandis que l'Anakinra cible le récepteur de l'IL-1(inhibiteur compétitif d'IL1 α et IL1 β).

Les patients sévères atteints de Covid-19 semblent développer une réponse immunitaire et inflammatoire excessive et dérégulée, dans laquelle l'IL-6 jouerait un rôle essentiel. Il a été montré que sa concentration était corrélée à la sévérité de la maladie. Inhiber les cytokines inflammatoires pourrait donc permettre d'atténuer cette réaction. Une vigilance concernant l'hépatotoxicité est requise, même si ce traitement est généralement bien toléré. Le prix élevé de ce médicament représente une limite supplémentaire.[139]

Chapitre II : La COVID -19

5.4.2 Le plasma convalescent COVID-19

IL a été suggéré qu'il pourrait permettre une immunité passive par la transfusion d'anticorps dirigés contre le Sars-CoV-2. La disponibilité du plasma convalescent COVID-19 pour traiter un grand nombre de patients infecté par le virus SARS-CoV-2 n'est pas garantie car il présente des limitations et on décrit :

- Profil particulier de ces donneurs : sujets guéris de COVID-19 depuis 14j et bonne santé éligible au don de plasmaphérèse selon les critères de sélection des donneurs de sang en vigueur.
- Disponibilité des différents groupes sanguins chez ces donneurs pour répondre au différent profil receveurs et garantit la compatibilité ABO des plasmas transférés.

La posologie recommandée est basée sur celle utilisée dans le protocole d'essai clinique (transféré de 2 unités de plasma convalescent en injection intraveineuse à j8+/- 2j puis 1 à 2 unités 24h après avec un débit faible de 200 ml/h). Les risques liés à l'utilisation du plasma convalescent COVID-19 sont identiques à ceux du plasma thérapeutique (des réactions d'hypersensibilité, des syndromes pseudo-grippaux et des œdèmes pulmonaires)[140-142]

5.4.3 Les immunoglobulines polyvalentes

En plus de leur effet neutralisant, elles ont aussi des propriétés immunorégulatrices via leur action sur les récepteurs aux immunoglobulines sur les surfaces cellulaires. Les perfusions d'Ig humaines ont de nombreuses actions immunomodulatrices, parmi lesquelles la diminution de sécrétion de cytokines inflammatoires (dont l'IL-1 et l'IL-6) par les monocytes.[143]

NB: les traitements à base d'anticorps qu'ils soient monovalents ou polyvalents ont été impliqués dans la sélection de mutations spécifiques de la protéine Spike qui, avec le Remdesivir a incriminé comme favorisant l'émergence de nouveaux variants.[103]

5.4.4 Les IFN

Une seule étude prospective randomisée réalisée chez des patients présentant des formes légères à modérées de Covid-19 ; elle a étudié l'administration sous-cutanée d'IFN- β -1b associés à la ribavirine et au lopinavir-ritonavir *versus* ribavirine et lopinavir-ritonavir. Le délai de séroconversion semblait réduit dans le groupe IFN (7 *versus* 12 jours). Le résultat sur les critères secondaires allait dans le sens d'une réduction du délai d'amélioration clinique (4 *versus* 8 jours) et une diminution de la durée d'hospitalisation. [144]

Chapitre II : La COVID -19

5.4.5 Les corticostéroïdes /AINS

Les corticoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires qui pourraient être utiles lors de l'inflammation systémique dérégulée. Cependant, des craintes existent quant à une aggravation de l'infection car leur utilisation a été associée à une clairance retardée, une durée d'hospitalisation prolongée et augmentation de l'utilisation de la ventilation mécanique mais Wang et Al a démontré chez les patient atteints de pneumonie sévère de covid-19 à des faibles doses (1 à 2 mg/kg/j pendant 5 à 7 j) est associée à une amélioration plus rapide des symptômes cliniques et scanographique des images pulmonaire. Il faut mentionner que les corticoïdes inhalés réduisent l'expression de l'ACE2 et limite la production des interférons. [145, 146]

5.5 Vaccin

Les vaccins peuvent être classés en plusieurs catégories en fonction de leur mode de fabrication (**Annexe 2**). Chacune des catégories comporte des avantages et des inconvénients potentiels. Différentes approches sont explorées afin de mettre au point un vaccin capable d'induire une immunité protectrice et durable contre le Sars-CoV-2 : acides nucléiques (issus de l'acide désoxyribonucléique [ADN] ou de l'ARN), vecteurs viraux (réplicatifs ou non réplicatifs), pseudo-particules virales, vaccins sous-unitaires, vaccins vivants atténués et virus inactivés. [147]

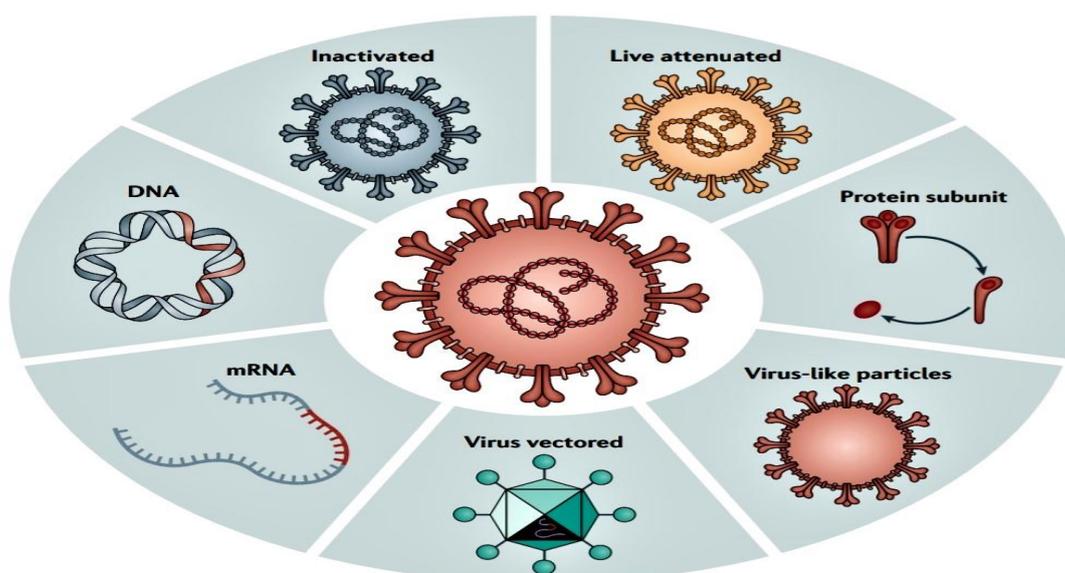


Figure 16 : Les sept stratégies explorées en tant que vaccins contre la maladie à coronavirus 2019. [148]

Chapitre II : La COVID -19

Tous les candidats vaccins ont pour but de générer des anticorps sériques qui ciblent la protéine spéculaire et neutralisent l'attachement du virus aux cellules de l'hôte, en plus de stimuler une immunité cellulaire se traduisant par l'activation de cellules de type CD4 et CD8 qui procurent, respectivement, une mémoire immunitaire et une capacité de détruire les cellules de l'hôte infectées par un virus.[147, 149]

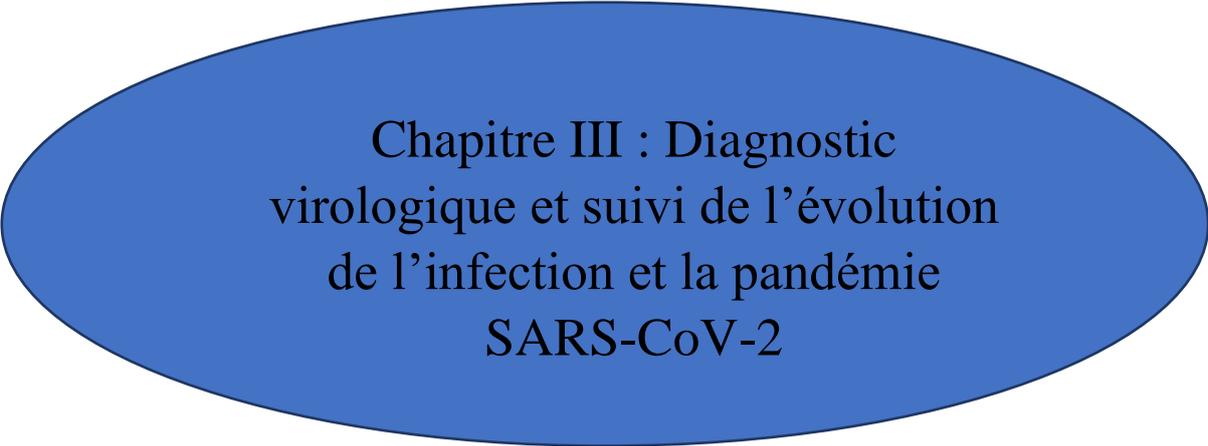
De nombreux gouvernements se sont engagés pour faciliter l'homologation des vaccins pour un usage chez l'humain, mettre en place les infrastructures industrielles pour une production rapide à grande échelle et établir des contrats avec certaines sociétés pharmaceutiques pour commander des doses avant la fin des études cliniques et des autorisations de mise en marché.[147, 149](Annexe 3)

6 Prévention [150]

L'OMSa déclaré que l'éducation, la prévention, l'isolement et le contrôle de la maladie et le traitement des personne infectés sont les étapes essentielles de luttés contre les maladies contagieuse essentiellement la COVID-19.

Il est possible de minimiser la propagation de l'infection en suivant les recommandations suivantes :

- La mise en quarantaine à domicile et éviter tout contact même avec les personnes en bonne santé (possibilité de patient asymptomatique).
- Eviter les voyage surtout dans les zones pandémiques ou dans les régions ou l'épidémie n'est pas contrôlé (ex : problème des systèmes de santé).
- Respecté les règles des distanciations sociales et de désinfection (exemple : laver les mains au minimum 20 s avec de l'eau et du savon ou un désinfectant pour les mains contenant au moins 60% d'alcool).
- En raison de la longue période d'incubation et de la forme asymptomatique des patients, l'utilisation d'un masque de protection (en particulier N95) ou d'un respirateur (FFP1, 2et3) est indispensable avec stérilisation des respirateurs et réutilisation que pendant une durée limitée et leur élimination doit se faire d'une façon correcte.



Chapitre III : Diagnostic
virologique et suivi de l'évolution
de l'infection et la pandémie
SARS-CoV-2

Chapitre III : Diagnostic virologique et suivi de l'évolution de l'infection et la pandémie SARS-CoV-2

1 Etapes pré-analytiques

Selon la Société Française de Microbiologie : [151]

1.1 Prélèvement

✚ Tenue recommandée pour le préleveur

- Port d'un masque de protection FFP2 (APR).
- Port d'une surblouse à usage unique à manches longues.
- Port systématique de lunettes de protection.
- Port d'une protection complète de la chevelure (charlotte...).
- Port de gants à usage unique.

✚ Types de prélèvements

Les prélèvements recommandés pour le diagnostic du COVID-19 sont les suivants :

- Un prélèvement des voies respiratoires hautes :
 - Le nasopharyngé (technique de référence).
 - Prélèvement salivaire (uniquement chez les patients symptomatiques) ...
- Un prélèvement des voies respiratoires basses :
 - Crachats.
 - Liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA).
 - Aspiration trachéo-bronchique...

✚ Les étapes de réalisation d'un prélèvement nasopharyngé

- Maintenir la tête du patient inclinée en arrière.
- Insérer l'écouvillon dans la narine, et le pousser délicatement le plus loin possible, parallèlement au palais.

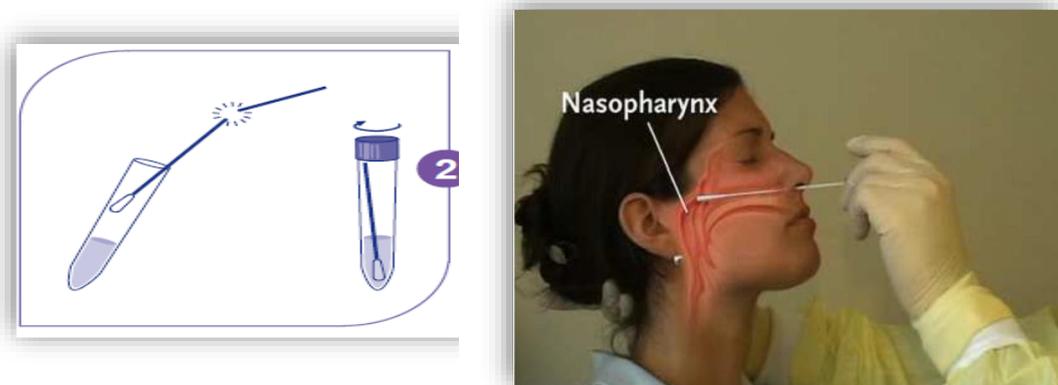


Figure 17 : Réalisation de l'écouvillonnage nasopharyngé dans le cadre de la recherche du virus SARS-CoV-2.

Chapitre III : Diagnostic virologique et suivi de l'évolution de l'infection et la pandémie SARS-CoV-2

- Le laisser en place quelques secondes puis le retirer lentement en lui imprimant un léger mouvement rotatif.
- L'écouvillon est ensuite plongé dans le milieu de transport, casser la tige manuellement pour permettre la fermeture étanche du bouchon.

1.2 Conditionnement et acheminement

- L'extérieur du tube est désinfecté à l'aide des désinfectants virucides habituels.
- Le tube est mis dans sachets de plastique étanche spéciale.
- Mettre les sachets dans un conteneur isotherme.
- Conserver et acheminer entre +2°C et +8°C.



Figure 18 : Glacière isotherme collectrice de produits biologiques.

1.3 Fiche de renseignements

Une fiche portant l'ensemble des informations nécessaires au diagnostic doit obligatoirement accompagner chaque prélèvement au titre de :

- Les identifiants du patient (nom, prénom, Age, sexe, provenance ...).
- Le service demandeur.
- Un résumé clinique.
- Notion de traitement en cours.

Ainsi que toute information aidant au diagnostic et au suivi du patient. Le ministère MSPRH a émis une fiche de renseignements standard à disposition des professionnels de la santé et devant accompagner chaque prélèvements (**Annexe 4**).

Chapitre III : Diagnostic virologique et suivi de l'évolution de l'infection et la pandémie SARS-CoV-2

2 Diagnostic biologique de l'infection au SARS-Cov-2

2.1 Diagnostic indirect : La sérologie

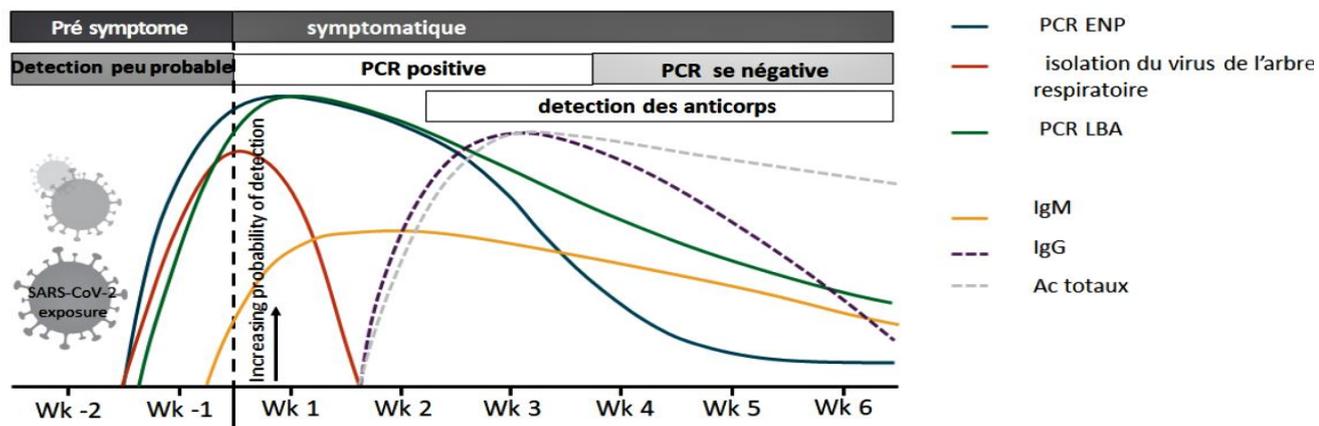


Figure 19 : Cinétique des marqueurs diagnostics.[152]

Les tests sérologiques réalisés sur prélèvement sanguin. L'HAS exige une sensibilité de 90 à 95 % et une spécificité de 98 %. Différents types de tests automatisables sont disponibles dont la plupart ciblent pour les protéines de structures.[153, 154]

Tableau 4 : Les avantages et les inconvénients des tests sérologiques.[99, 155-157]

Avantage	Inconvénient
<ul style="list-style-type: none"> • Dépister d'éventuels cas contacts autour d'un cas confirmé positif. • Effectuer des études épidémiologiques de séroprévalence. • Suivre les profils d'anticorps des participants à un traitement ou à des essais de vaccins. 	<ul style="list-style-type: none"> • Diagnostic rétrospectif : positivité tardive, ne permet pas de détecter l'infection précoce. • La présence des anticorps détectée par les tests disponibles ne permet pas de déterminer leur activité neutralisante. • Ne permettent pas de statuer sur contagieuse. • Une réaction croisée avec d'autres agents pathogènes, notamment d'autres coronavirus humains, ou avec des affections préexistantes (p. ex. grossesse, maladies auto-immunes) et donner alors des résultats faussement positifs.

Chapitre III : Diagnostic virologique et suivi de l'évolution de l'infection et la pandémie SARS-CoV-2

2.2 Diagnostic spécifique direct

2.2.1 Culture cellulaire virale

Elle n'est pas recommandée comme procédure diagnostique de routine, elle se fait en laboratoire NSB3.

Cependant, il peut être utile de faire des isollements de virus : caractérisation des types des souches virales, recherche de mutations, évaluation de la sensibilité aux traitements, évaluation de la concordance entre la PCR et la contagiosité.[49]

Les lignées cellulaires, l'ECP et les temps de cultures sont détaillées dans le **chapitre I (partie 7.2 : Cellule sensible)**.

2.2.2 Détection d'antigènes intracellulaire

Ils se présentent sous forme de tests unitaires rapides (ex : TDR) réalisable par les laboratoires de biologie médicale et potentiellement sous forme de TROD.

La performance d'un test antigénique est déterminée par sa sensibilité et sa spécificité pour la détection d'une infection à SARS-CoV-2 par rapport à un test de référence (ex : qRT-PCR).Le principe repose en général sur l'immunochromatographie avec une lecture qui peut être soit manuelle soit automatisée.

Les tests antigéniques détectent l'une des protéines du virus SARS-CoV-2 à partir d'un prélèvement nasopharyngé ; tout comme la détection du génome viral par amplification génique, cette technique permet de poser un diagnostic d'infection par le SARS-CoV-2 en phase précoce (il est recommandé de ne prendre en considération les résultats de tests antigéniques que durant les sept jours suivant l'apparition des symptômes). Comparativement au test de référence (RT-PCR sur prélèvement nasopharyngé). [158, 159]

Tableau 5 : Les avantages et les inconvénients des tests antigéniques commercialisés.[158, 159]

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none">• Accélère et facilite la réalisation du test et son rendu de résultats afin notamment de réduire les risques de transmission virale.• Facile d'utilisation et d'interprétation (contrairement aux tests sérologiques COVID-19 car présence ou absence de plusieurs isotypes).• Moins coûteux et plus rapide (30 minutes) que les tests PCR.	<ul style="list-style-type: none">• Le risque des faux négatif (charge virale faible ou variant).• Nécessite un contrôle par la RT-PCR pour les patients symptomatiques de plus de 65 ans à risque de forme grave si négatif ou ininterprétable.

Chapitre III : Diagnostic virologique et suivi de l'évolution de l'infection et la pandémie SARS-CoV-2

➤ Indication TDR Covid-19

- Dans le cadre d'enquêtes épidémiologiques ou d'orientation diagnostic
- Pour réagir à des flambées présumées de COVID-19 dans des endroits isolés donc permet la mise en œuvre rapide de mesures de lutte contre l'infection
- Surveiller l'évolution de l'incidence de la maladie essentiellement les travailleurs et les agents de santé
- Utilisés pour la détection et l'isolement précoces des cas positifs dans le cas de transmission communautaire généralisée. [158, 159]

2.3 Diagnostic spécifique direct par biologie moléculaire

Les tests moléculaires permettent la détection directe du génome de l'agent suspecté et ce directement après avoir extrait le matériel génétique de l'échantillon à analyser. L'avantage de pouvoir travailler à partir d'acides nucléiques réside dans leur stabilité lorsqu'ils sont conservés à basse température et dans leur caractère non infectieux évitant tout risque de biosécurité après leurs extractions, voire avant, par utilisation de milieux de prélèvement permettant l'inactivation immédiate des agents (fixateurs RNA later/Trizol ou papiers traités).[160]

2.3.1 Préparation des échantillons pour le diagnostic moléculaire (isolation de l'ARN viral)

Cinq étapes de base de l'extraction des acides nucléiques:[161]

- Rupture de la structure cellulaire pour créer un lysat.
- Séparation des acides nucléiques solubles des débris cellulaires et autres matières insolubles.
- Liaison des acides nucléiques à une matrice de purification.
- Lavage des protéines et autres contaminants de la matrice.
- Éluion des acides nucléiques.

2.3.1.1 Création du lysat

Consiste à libérer les acides nucléiques en solution. Le but de la lyse est de perturber rapidement et complètement la structure des cellules d'un échantillon pour libérer les acides nucléiques dans le milieu de lyse. Il existe quatre techniques pour la lyse des matériaux : les méthodes physiques, enzymatiques, chimiques et les combinaisons des trois.[161]

Chapitre III : Diagnostic virologique et suivi de l'évolution de l'infection et la pandémie SARS-CoV-2

2.3.1.1.1 Méthodes physiques

Elles impliquent généralement un certain type de broyage, chauffage, sonication ou d'écrasement d'échantillons pour perturber les parois cellulaires ou les tissus durs.[161]

2.3.1.1.2 Méthodes chimiques

Peuvent être utilisées seules avec des matériaux faciles à lyser, tels que des cellules de culture tissulaire ou en combinaison avec d'autres méthodes. La destruction cellulaire est assurée à l'aide de différents traitements chimiques : comme les détergents (par exemple, SDS) et les chaotropes (par exemple, les sels de guanidine et les solutions alcalines).[161]

2.3.1.1.3 Méthodes enzymatiques

Les enzymes utilisées aident à perturber les tissus et les parois cellulaires dures. En fonction du matériau de départ, les traitements enzymatiques typiques peuvent inclure : le lysozyme, la zymolase et la laticase, la protéinase K...[161]

Liaison à la matrice de purification

Il existe plusieurs techniques dont :[161]

- ✚ Les nano-particules magnétiques
- ✚ Chimie basée sur les solutions.
- ✚ Chimie liant la silice.
- ✚ Chimie liant la cellulose.
- ✚ Chimie d'échange d'ions.

2.3.1.2 Lavage

A l'aide de tampons de lavage qui contiennent généralement des alcools (éthanol, isopropanol) et sont utilisés pour éliminer les protéines, et toute autres substances susceptibles d'interférer avec l'amplification. [161](annexe 5)

2.3.1.3 Elution

Les acides nucléiques sont solubles dans une solution à faible force ionique telle qu'un tampon TE (Tris-EDTA) ou de l'eau sans nucléase.[161]

Chapitre III : Diagnostic virologique et suivi de l'évolution de l'infection et la pandémie SARS-CoV-2

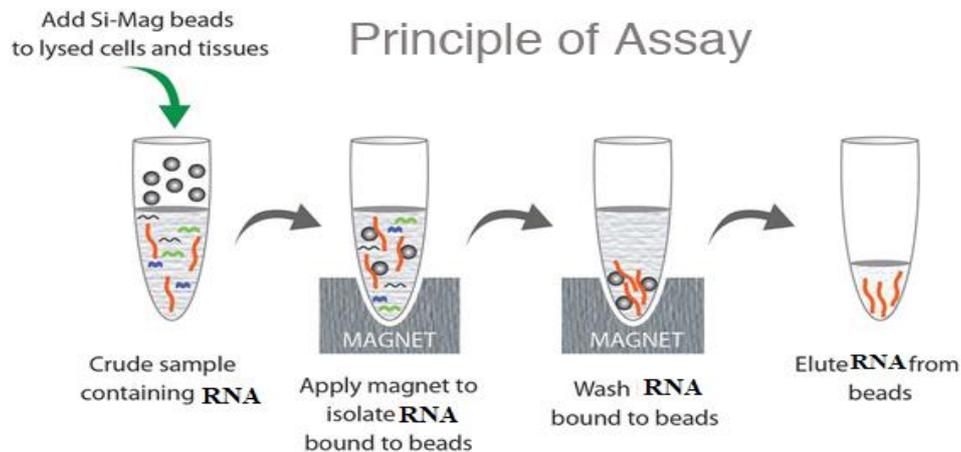


Figure 20 : Principe de l'extraction par les billes magnétique.[162]

2.3.2 Polymérase chaîne réaction

La procédure pour effectuer la réaction en chaîne par polymérase (PCR) était introduite pour la première fois par le Dr. KaryMullis en 1983, cette technique s'adapte aussi bien à l'amplification de séquence d'ADN que d'ARN (RT-PCR).

Le principe de l'amplification *in vitro* repose sur la répétition d'un cycle constitué de trois étapes :

- L'étape de dénaturation est réalisée à une température avoisinant les 95 °C et permet de séparer les deux brins de la molécule d'ADN et d'obtenir des molécules d'ADN simple brin.
- L'étape d'hybridation ou *annealing* des amorces oligonucléotidiques est réalisée à une température comprise entre 40 °C et 65 °C, cette température est calculée en fonction de la séquence de ces amorces afin de permettre une fixation spécifique et optimale des amorces sur la séquence d'ADN cible.
- L'étape d'élongation par l'ADN polymérase à partir des amorces hybridées est réalisée à la température de 72 °C grâce à une ADN polymérase thermostable comme la Taq polymerase.
- Détection des produits de PCR peut se faire de plusieurs manières : en point final par électrophorèse-révélation, ou en temps réel (PCR quantitative) grâce à des sondes fluorescentes ou à des agents intercalants fluorescents.[163]

Chapitre III : Diagnostic virologique et suivi de l'évolution de l'infection et la pandémie SARS-CoV-2

L'amplification de fragments d'ADN *in vitro* : la PCR

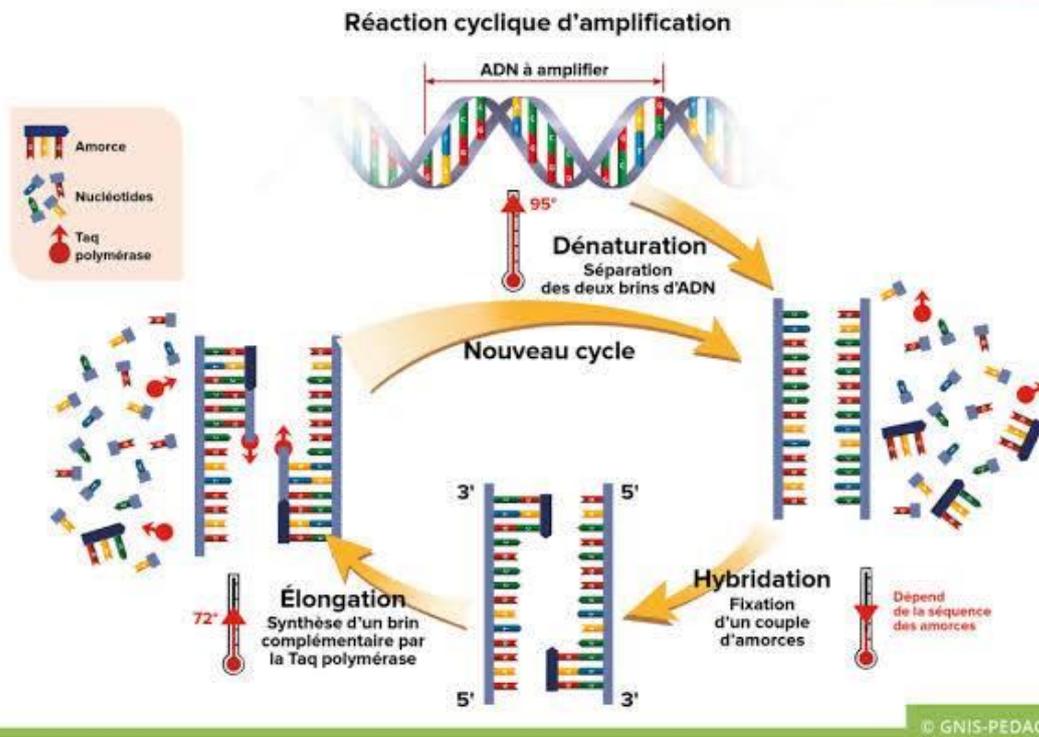


Figure 21 : Les étapes de la PCR.[164]

NB : Dans le cas de la détection de l'ARN, l'instabilité de cette molécule impose sa transformation préliminaire en ADN complémentaire (cDNA) qui sera par la suite amplifié.

La RT-PCR (*Reverse Transcription - PCR*) se compose de deux principales étapes :

1. Se déroule à partir d'une amorce universelle dT grâce à l'utilisation d'une transcriptase inverse (qui synthétise le brin d'ADN complémentaire à l'ARN matrice).
2. La seconde étape consiste en l'amplification de ce brin d'ADNc afin d'obtenir des quantités analysables.[163]

2.3.2.1 Application de la PCR dans le diagnostic de l'infection SARS-CoV-2 : LA PCR en temps réel (qRT-PCR)

Le SARS-CoV-2 est un virus à ARN, sa détection implique le recours à une étape de rétro-transcription puis d'une amplification de l'ADNc.

Dans ce cadre, elle constitue la technique de référence de diagnostic de l'infection aigue.

Chapitre III : Diagnostic virologique et suivi de l'évolution de l'infection et la pandémie SARS-CoV-2

La majorité des techniques disponibles actuellement sont basées sur la technologie de détection par sondes fluorescentes. Et détectent plusieurs gènes viraux : ce sont des PCR multiplexe.[163, 165]

Cette PCR est dite « en temps réel » : l'amplification et la détection se font en parallèle/

Cette technologie repose sur la détection et la quantification d'un émetteur fluorescent pendant le processus d'amplification. L'augmentation du signal d'émission fluorescente est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits durant la réaction. Il existe aujourd'hui deux principes généraux pour la détection quantitative des amplicons : les agents intercalants fluorescents et les sondes fluorescentes. [166, 167]

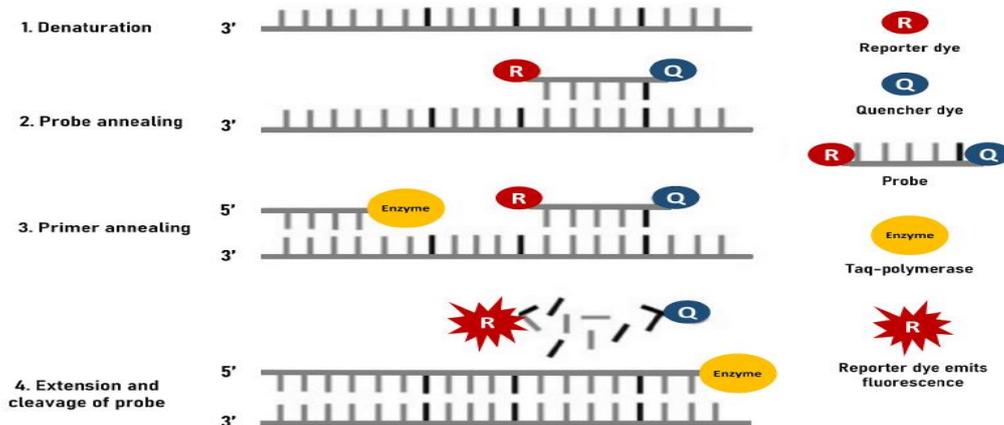


Figure 22 : Principe de détection par Taq Man. [168]

La réaction de qRT-PCR se décompose en quatre phases :

- Une phase dite « HOLD » durant laquelle il n'y a aucune détection et correspond à la phase de rétrotranscription
- Une phase initiale de détection pendant laquelle la quantité de produits amplifiés est inférieure au bruit de fond.
- Une phase exponentielle où la quantité de produits amplifiés dépasse le bruit de fond, puis est doublée à chaque cycle, avec donc une augmentation

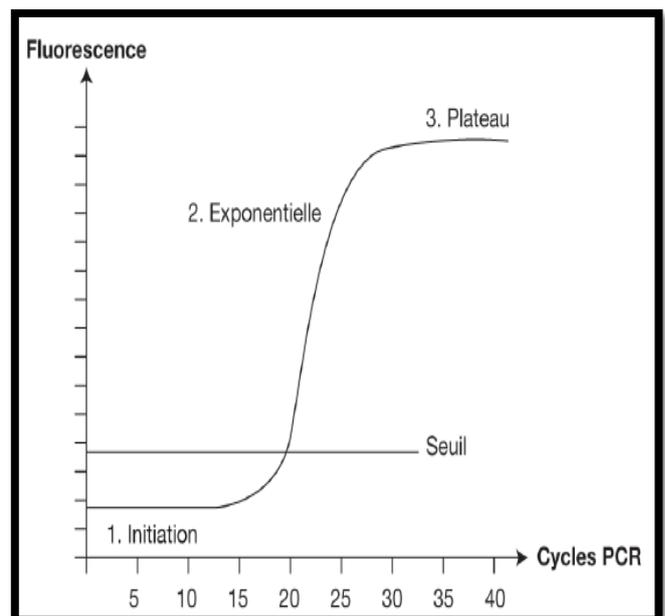


Figure 23 : Les trois phases de la PCR.

Chapitre III : Diagnostic virologique et suivi de l'évolution de l'infection et la pandémie SARS-CoV-2

exponentielle de la quantité d'ADN produite.

- Une phase de plateau ou la limitation en certains composés comme les unités de Taq polymérase ne permettent plus l'amplification exponentielle des produits PCR.

La quantification par qRT-PCR repose sur la détermination de la fluorescence émise par la réaction en cours, cette dernière est considérée comme significative lorsqu'elle est supérieure à un seuil, dit seuil de significativité ou (Threshold) ; le cycle auquel la fluorescence émise par la réaction en cours dépasse le Threshold est dit « Cycle seuil » ou « Threshold cycle ».

[165]

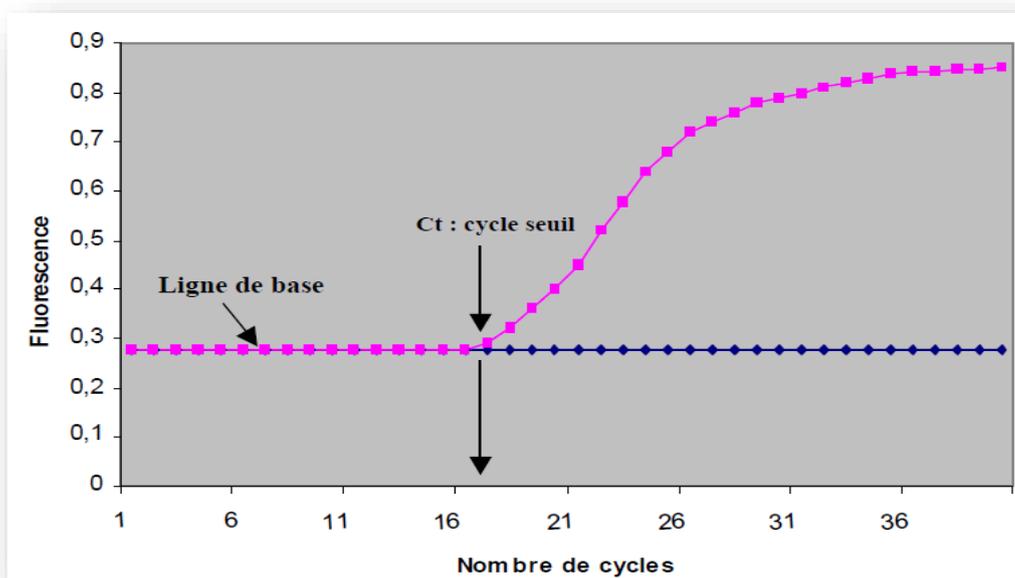


Figure 24 : Modèle graphique de la PCR en temps réel où l'intensité de la fluorescence est exprimée en fonction du nombre de cycles. [167]

Le Treshohld peut être :

- Déterminé automatiquement par le logiciel du thermocycleur et est arbitrairement fixé à 10x la fluorescence de base (Bruit de fond ou Baseline correspond à la fluorescence naturelle du milieu d'amplification incluant celui du mélange rationnel, des tubes réactionnels)
- Déterminé par le manipulateur sur la courbe d'amplification au début de la phase Log-Linéaire.[165]

NB : cycle seuil (Ct), est le reflet direct de la charge virale mais est inversement proportionnel à celle-ci, il traduit la quantité initiale de génomes viraux présents dans l'extrait : plus la

Chapitre III : Diagnostic virologique et suivi de l'évolution de l'infection et la pandémie SARS-CoV-2

quantité initiale est élevée plus le nombre de cycle nécessaire pour atteindre le Threshold est faible.[165]

2.3.2.2 Le multiplexage

Le multiplexage par PCR est l'amplification et la détection spécifique de deux ou plusieurs séquences génétiques dans la même réaction. Pour réussir, le multiplexage par PCR doit être capable de produire suffisamment de produit amplifié pour la détection de toutes les séquences prévues. Le multiplexage par PCR en temps réel peut être utilisé pour produire des résultats quantitatifs ou qualitatifs.[165]

2.3.2.3 Les gènes cible chez le SARS-CoV-2

Pour la détection spécifique du SRAS-CoV-2, les chercheurs ont utilisée des panels de diagnostic constitués d'amorces spécifiques au SRAS-CoV-2 dans des réactions de RT-PCR qui peuvent fournir des résultats en 2 - 3 heures. La plupart des tests RT-PCR disponibles utilisent des amorces oligonucléotidiques et des sondes sélectionnées à partir de régions de divers gènes viraux du SRAS-CoV-2, y compris la nucléocapside (N), l'enveloppe (E), le gène RdRp, la protéine de spicule (S) et le gène ORF1ab...[166]

2.3.2.4 Contrôle qualité

Contrôle externe

Le témoin négatif est testé exactement comme les autres échantillons. Ce témoin permet de détecter une contamination éventuelle des différents réactifs entrant dans la composition de la PCR. Le plus souvent, il est représenté par de l'eau stérile.[169]

Le témoin positif est traité dans des tubes séparés des prélèvements cliniques mais est testé simultanément. Il utilise les mêmes amorces et la même sonde que le virus recherché. Il permet de contrôler la bonne composition du mélange réactionnel. C'est une source potentielle de contamination des échantillons induisant le risque de rendre des résultats faussement positifs. La plupart du temps les témoins positifs utilisés sont représentés par des échantillons biologiques positifs, des cultures positives ou des plasmides spécifiques du virus recherché.[169]

Chapitre III : Diagnostic virologique et suivi de l'évolution de l'infection et la pandémie SARS-CoV-2

Contrôle interne

A ce jour, plusieurs types de contrôles internes ont été imaginés, ciblant différentes étapes de la réaction de PCR ou de RT-PCR : la lyse du virus, l'extraction des acides nucléiques, la rétro-transcription et l'amplification.

Les contrôles internes sont ajoutés à chaque prélèvement biologique. Ils permettent de contrôler le déroulement de la réaction à l'intérieur de chaque tube.[170]

Le contrôle interne permet de déceler d'éventuelle inhibition de la PCR ou un défaut d'extraction.

Un gène de contrôle interne doit avoir une expression stable dans tous les échantillons test. En pratique, une variation nulle est très rare et les gènes témoins sont autorisés à de petites différences dans les valeurs de Ct allant jusqu'à 0,5 Ct. Les différences dans le haut de cette fourchette introduiront des imprécisions. [171]

2.3.3 Autres techniques appliquées au diagnostic de la COVID-19

2.3.3.1 Techniques d'amplification isotherme

2.3.3.1.1 RT-LAMP

La technique LAMP est une réaction d'amplification en une seule étape qui amplifie une séquence d'ADN cible avec une sensibilité et une spécificité élevée dans des conditions de température fixe.[172]

Elle utilise une ADN polymérase avec une activité de déplacement de brins, ainsi que deux amorces internes et externes qui reconnaissent six régions distinctes au sein d'un ADN cible. Le test LAMP a une spécificité élevée, car la réaction d'amplification ne se produit que lorsque les six régions d'un ADN cible sont correctement reconnues par les amorces.[172]

L'ajout d'une transcriptase inverse permet d'amplifier l'ADN à partir de séquences d'ARN cible (RT-LAMP). La RT-LAMP est utilisée dans le diagnostic des maladies infectieuses causées par des virus à ARN telles que le COVID-19 causée par le SARS-CoV-2.[173, 174]

Cette méthode est particulièrement avantageuse par rapport à la RT-PCR car elle est peu coûteuse, rapide et ne nécessite pas de thermocycleur (la température constante peut être obtenue à l'aide d'un simple bain d'eau chaude). Tandis que le principal inconvénient de cette

Chapitre III : Diagnostic virologique et suivi de l'évolution de l'infection et la pandémie SARS-CoV-2

dernière est la difficulté relative à la génération des amorces spécifiques et compatibles avec la séquence d'ADNc cible.[172, 175]

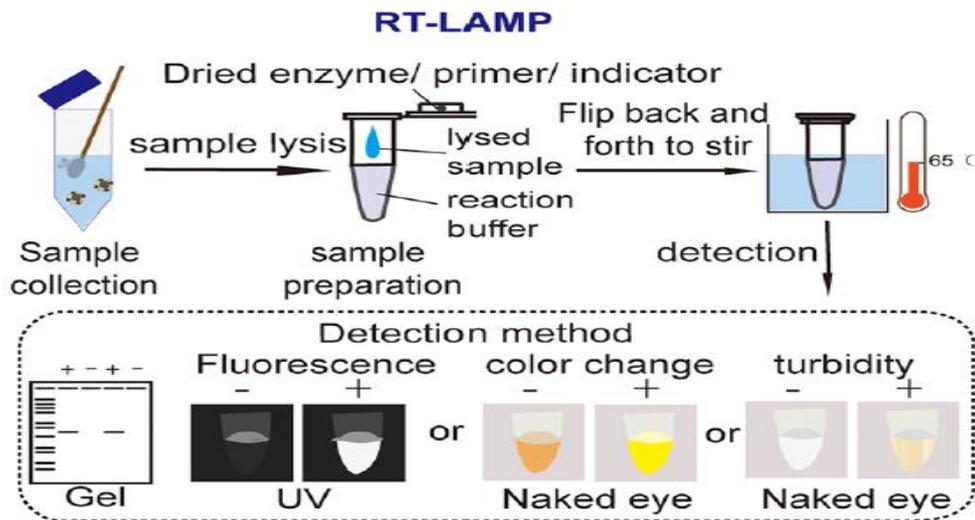


Figure 25: RT-LAMP. [176]

2.3.3.1.2 Puces à ADN

Le principe général d'une puce à ADN repose sur une hybridation par complémentarité des bases (A-T et G-C) entre l'ADN d'un échantillon biologique et un ensemble de sondes immobilisées et organisées sur un support solide. [177]

Les fragments nucléiques déposés sur le support solide sont appelés « sondes » tandis que les acides nucléiques marqués présents dans l'échantillon sont les « cibles ». La réaction d'hybridation moléculaire est spécifique et permet de détecter et d'identifier la ou les séquence(s) présentes dans l'échantillon. [178]

2.3.4 Séquençage.

Le séquençage consiste à déterminer l'enchaînement linéaire des nucléotides d'un fragment d'ADN ou la totalité du génome. Dans le cas du SARS-CoV-2, il étudie la dynamique, la poussée épidémique, notamment les changements de l'étendue d'une épidémie au fil du temps et sa propagation spatio-temporelle, dans le but de compléter, renforcer et étayer les stratégies visant à réduire la charge de morbidité de la COVID-19.(Annexe 6)

En outre, les séquences génomiques peuvent être utilisées pour décider quels tests diagnostiques, médicaments et vaccins peuvent être des candidats appropriés pour une exploration plus poussée.[179]

Chapitre III : Diagnostic virologique et suivi de l'évolution de l'infection et la pandémie SARS-CoV-2

2.3.4.1 Classique.

2.3.4.1.1 Methode de sanger

C'est une méthode par synthèse enzymatique, elle permet de déterminer l'ordre des quatre nucléotides dans un brin d'ADN. repose sur l'allongement par l'ADN polymérase d'un brin à partir d'une amorce, en utilisant un autre brin d'ADN comme matrice. Cet allongement est réalisé en présence des quatre désoxyribonucléotides triphosphate (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), monomères utilisés par la polymérase (dégradation enzymatique, et d'un analogue didésoxyribonucléotide qui joue le rôle de terminateur de chaîne.[180]

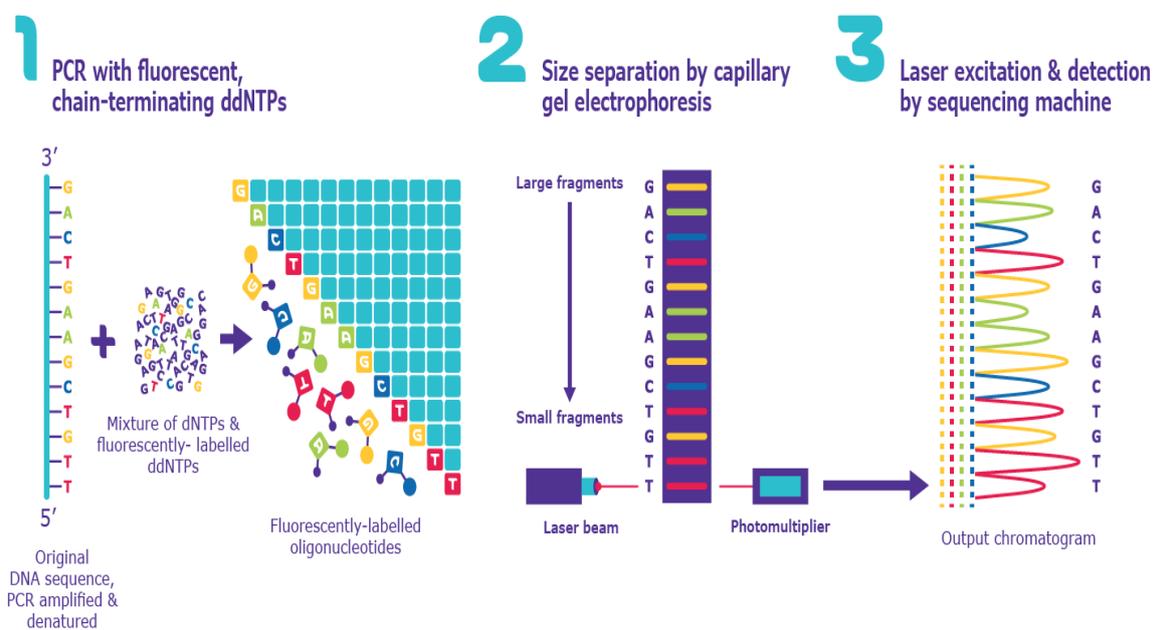


Figure 26 : Étapes de séquençage de l'ADN par méthode de SANGER.[181]

2.3.4.2 NGS (Next Generation Sequencing)

2.3.4.2.1 Séquençage de 2^{ème} génération

Trois technologies : le pyroséquençage (454/Roche), le séquençage avec des terminateurs réversibles (Illumina/Solexa) et le séquençage par ligation (SOLiD™). Elles utilisent la détection de signaux chimiques ou lumineux lors de l'incorporation de bases nucléotidiques pendant la synthèse du brin complémentaire pour déterminer la séquence. [182]

Elles se décomposent cependant toutes en 4 grandes étapes principales :

Chapitre III : Diagnostic virologique et suivi de l'évolution de l'infection et la pandémie SARS-CoV-2

- La préparation des bibliothèques qui contient une étape d'amplification par PCR.
- Préparation des cycles de réaction de séquençage.
- La prise d'image après chacun de ces cycles pour déterminer le nucléotide correspondant.
- L'analyse des données. [181]

2.3.4.2.1.1 Pyroséquençage 454 de Roche

Il s'agit d'une méthode permettant d'analyser la synthèse d'ADN cible en temps réel.

On parle de séquençage par synthèse d'ADN. Cette méthode performante totalement automatisée permet de séquencer de courts fragments d'ADN en moyenne 106 Pb. [183, 184]

2.3.4.2.1.2 Solexa/illumina

C'est un séquençage par synthèse, elle repose sur une amplification en pont des fragments à séquencer (bridge PCR : en phase solide) sur une surface de verre appelée flow cell (FC) similaire à une lame de microscope divisée en huit lignes (une ligne par échantillon).

L'amplification s'effectue sur un support solide. Cette méthode permet l'acquisition en parallèle de plus de 3 milliards de séquences de 150 paires de bases. Chaque position étant lue l'une après l'autre, les erreurs principales de cette technologie sont des erreurs de substitution d'une base par une autre. [185, 186]

2.3.4.2.1.3 Solid d'Applied Biosystems

Grâce à cette méthode, il est possible de lire en parallèle jusqu'à un milliard et demi de séquences de 75 bases de long. Cette méthode utilise un procédé de séquençage par ligation complexe qui est très robuste, mais lent et cher en raison de nombreuses contraintes techniques. Le système incorporé de correction d'erreurs associé à l'utilisation de la ligase rend cette technologie très fiable. [187]

2.3.4.2.1.4 Autres techniques de seconde génération

- **Ion Torrent** : Sa technologie repose sur la libération naturelle d'un ion H⁺ après incorporation d'un nucléotide par une polymérase. Ce phénomène entraîne une modification du pH pouvant être détectée par une puce de silicium semi-conductrice composée de plusieurs millions de transistors. [188]
- **Polonator G007** : Cette technologie est basée sur une amplification en émulsion et sur un séquençage via une synthèse par ligation qui fonctionne de la même manière que sur le SOLiD mais seule une base est interrogée à l'aide d'oligonucléotides dégénérés. [189]

Chapitre III : Diagnostic virologique et suivi de l'évolution de l'infection et la pandémie SARS-CoV-2

- **Complete Genomics** : C'est une technologie permettant de séquencer de faibles quantités d'ADN à faible coût en réactifs sur une lame de silicium. La librairie est préparée par RCA (Rolling Circle Amplification) qui permet de créer des nanoballs d'ADN. Le séquençage s'effectue ensuite par ligation.[190]

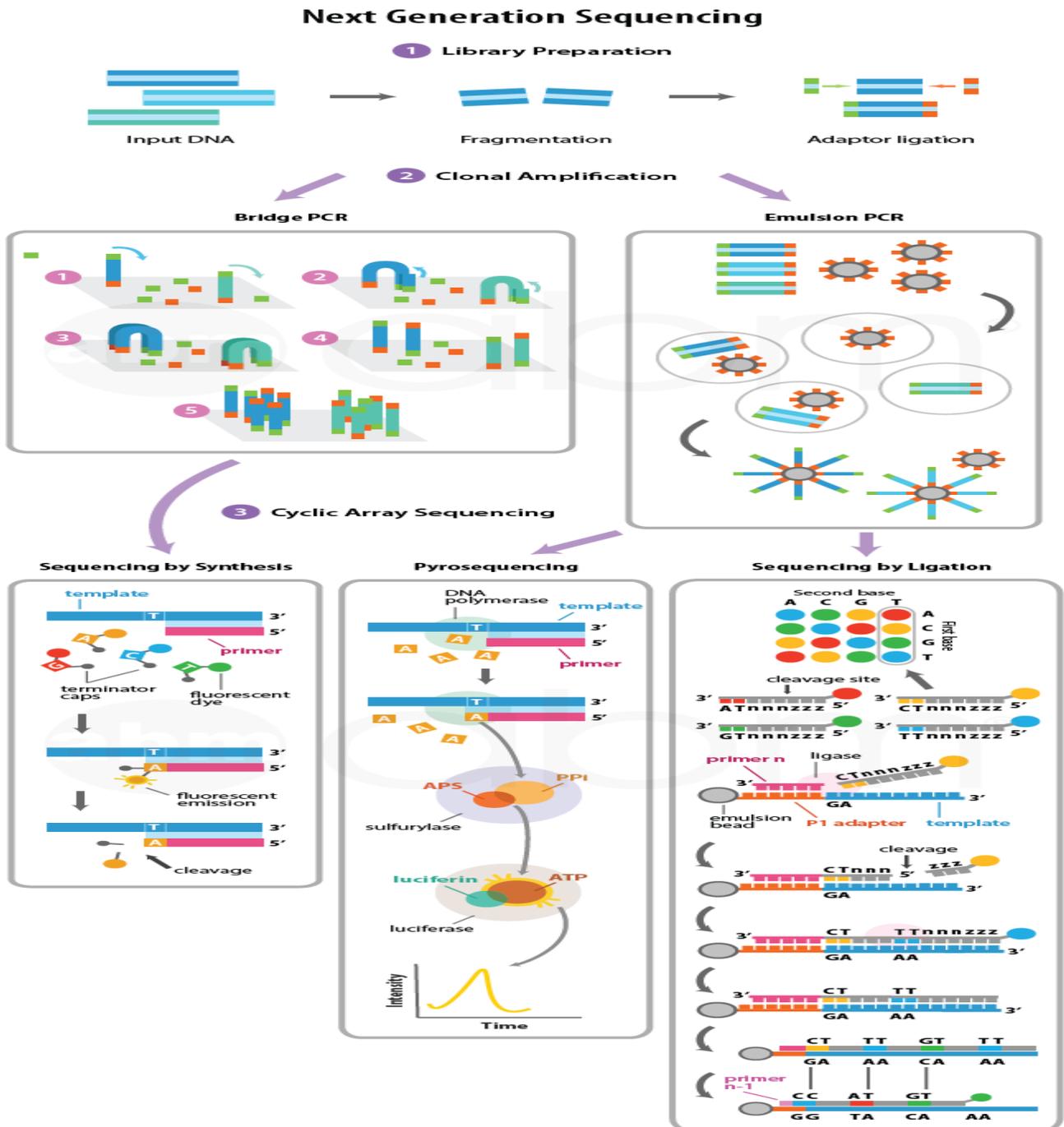


Figure 27: Illustration des similitudes et des différences entre les différentes plateformes de NGS.[181]

Chapitre III : Diagnostic virologique et suivi de l'évolution de l'infection et la pandémie SARS-CoV-2

2.3.4.2.2 Séquençage de troisième génération

Ces nouvelles méthodes utilisent pour la plupart la détection d'un signal chimioluminescent à chaque incorporation de nucléotide afin de séquencer directement les fragments d'ADN un par un ce qui rend l'amplification de l'ADN inutile. Ces innovations diminueraient la durée et simplifieraient considérablement les étapes de préparation des banques d'ADN. De plus, l'élimination de ces étapes permettrait aussi de diminuer les sources de biais possibles pouvant être introduits par les phases de PCR (erreurs de polymérisation ou recombinaisons par PCR). La différence majeure entre la deuxième et la troisième génération de séquenceurs réside dans leur capacité à séquencer directement des molécules d'ADN de façon individuelle sans étape de pré-amplification. On peut donc également séquencer de l'ARN sans devoir le convertir au préalable en ADNc. [181, 191]

2.3.4.2.2.1 Technologies des nanopores

Elle permet de déterminer une séquence ADN à la résolution du nucléotide sans aucune amplification, par lecture directe. La longueur de lecture est aussi plus grande que celle des autres technologies.

Une molécule unique d'ADN traverse un pore formé par une protéine ancrée dans une bicouche lipidique par application d'un potentiel (voir Figure 28). Une exonucléase clive chaque nucléotide à l'entrée du nanopore et celui-ci est alors détecté de façon électronique via une cyclodextrine. [192]

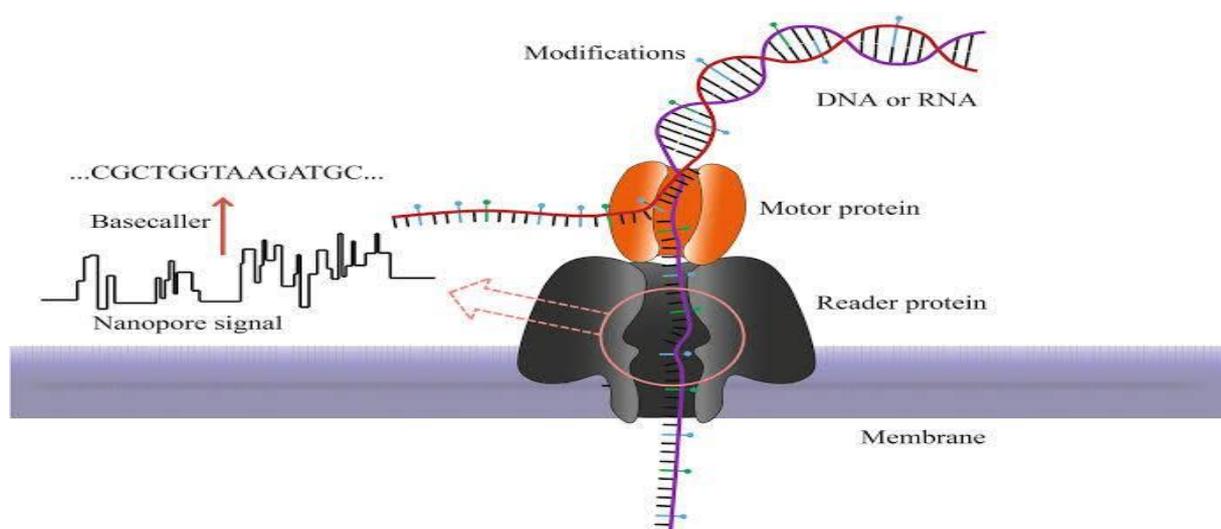


Figure 28 : La technologie de nanopore.[193]

Chapitre III : Diagnostic virologique et suivi de l'évolution de l'infection et la pandémie SARS-CoV-2

2.3.4.2.2 Plateforme de Pacific Biosciences

C'est un instrument capable de séquencer une molécule unique en temps réel par lecture directe.[194]

Cette méthode permet l'incorporation continue de nucléotides marqués pendant la synthèse du brin d'ADN. L'ADN polymérase est attachée à la surface d'un détecteur ZMW (Zero Mode Waveguide) qui assimile l'ordre des nucléotides phosphatés quand ceux-ci sont inclus dans le brin généré. Cette technologie permet d'atteindre des longueurs de séquence de 10000 Pb mais la polymérase peut parfois se dégrader avant d'atteindre cette taille à cause des lectures au laser.

La plateforme PacBio possède le taux d'erreur le plus élevé de toutes les plateformes NGS (environ 15%) mais ceci est contrebalancé par le fait qu'un même fragment d'ADN est séquencé plusieurs fois.[195, 196]

2.3.4.2.3 Starlight

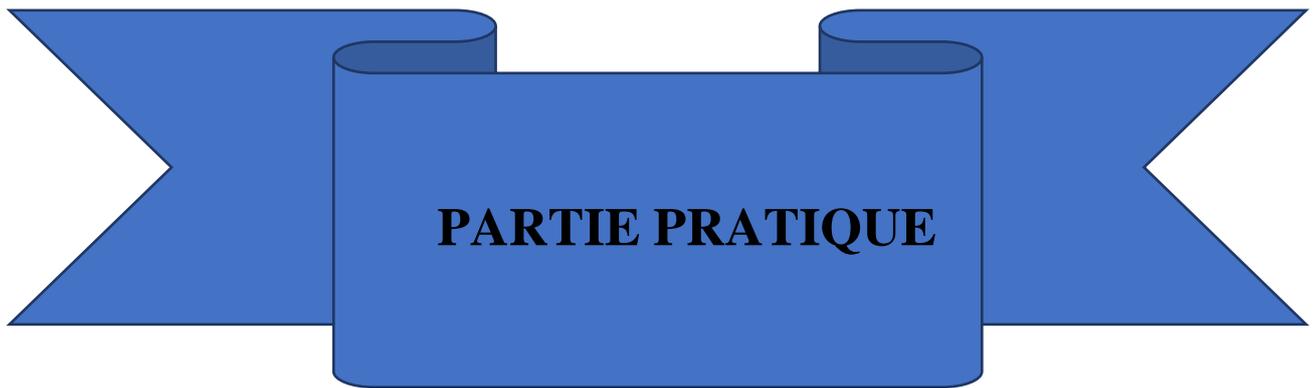
Life Technologies développe un séquenceur de molécule unique appelé Starlight qui utilise des points quantiques qui sont des particules nanométriques à base de semi-conducteur dont les propriétés de fluorescence peuvent être contrôlées par leur taille. Excitées par un laser, ces particules transfèrent leur énergie aux nucléotides marqués par fluorescence lorsque ceux-ci sont incorporés par la polymérase.

De plus, il est possible de remplacer la polymérase lorsqu'elle s'essouffle. On peut ainsi théoriquement séquencer la longueur désirée de fragment.[197]

Chapitre III : Diagnostic virologique et suivi de l'évolution de l'infection et la pandémie SARS-CoV-2

2.3.4.3 Avantage et inconvénient des NGS par rapport aux méthodes de séquençage «classique » [198]

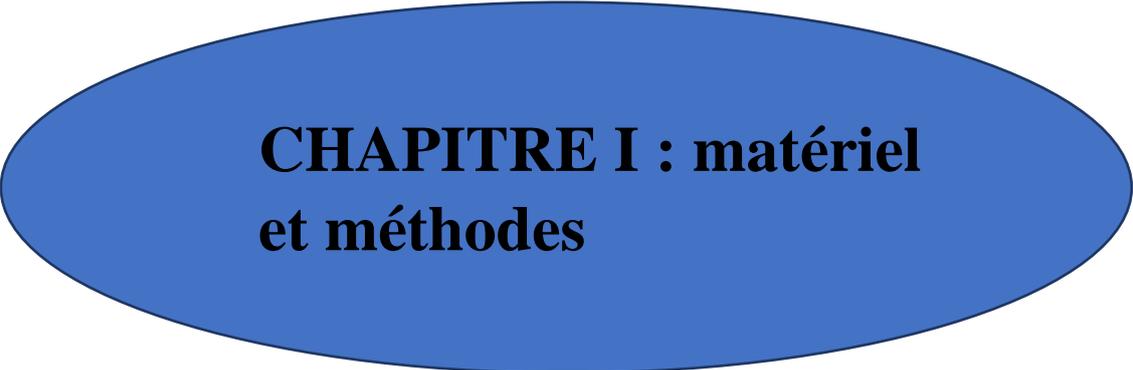
Avantage	Inconvénient
<ul style="list-style-type: none">• Très grande sensibilité analytique.• Séquençage de l'exome/génome complet avec une large gamme d'altérations génomiques.• Détectées (délétions, translocations, nombre de copies).• Adapté aux différents types de prélèvements (tissu tumoral fixe au formol, ADN libre circulant, cellules tumorales circulantes).• Découverte de nouvelles variantes génétiques et une meilleure compréhension de l'oncogenèse et de la progression tumorale.• Délai d'analyse et de réponse diminué.	<ul style="list-style-type: none">• Nécessité d'un consentement spécifique incluant l'analyse mutationnelle somatique et germinale.• Variabilité de performance des différentes plateformes de NGS.• Coût par test élevé.• Coût des équipements modérément élevé.• Expertise informatique pour l'interprétation et le traitement des données.• Nécessité d'un fort investissement institutionnel en termes de capacité de stockage des données.• Pertinence des nouveaux polymorphismes découverts.• Veille éthique quant à l'utilisation des données constitutionnelles (mutation germinale).



PARTIE PRATIQUE

Rappel des objectifs

1. Rapporter l'expérience du laboratoire de diagnostic COVID-19 dans la réponse à l'épidémie dans la wilaya de Tizi Ouzou.
 - ✓ Décrire le parcours du laboratoire et l'expérience acquise sur le plan technique, logistique et de la maîtrise du risque biologique.
2. Bilan d'activité du laboratoire.
 - ✓ Bilan global de la période 01/04/2020 au 31/12/2020.
 - ✓ Bilan détaillé de la période 24/08/2020 au 31/12/202



**CHAPITRE I : matériel
et méthodes**

CHAPITRE I : matériel et méthodes

1 Type d'étude

- ✓ Etude rétrospective de la période du 09/04/2020 au 23/08/2020.
- ✓ Etude prospective de la période du 24/08/2020 au 31/12/2020.

2 Population d'étude

2.1 Critères d'inclusion

- ✓ Tous les prélèvements provenant des structures hospitalières de la Wilaya de Tizi-Ouzou et des Wilaya limitrophes en vue de la recherche du SARS-CoV-2 devant un tableau de COVID-19.
- ✓ Tous les prélèvements faits au niveau du laboratoire SARS-CoV-2.

2.2 Critères de non inclusion

- ✓ Les prélèvements non conformes : principalement les prélèvements non étiquetés et ceux présentant une fuite du milieu de transport.

2.3 Critères d'exclusion

- ✓ Les prélèvements de dépistage à large échelle chez les sponsors du laboratoire et le dépistage hebdomadaire des Joueurs de la JSK.
- ✓ Les prélèvements ne donnant aucune amplification dans le contrôle interne après deux extractions successives.

3 Ethique

Cette étude a été réalisée dans le total respect des règles de l'éthique et de la déontologie médicale et de la recherche scientifique, avec un respect total de l'anonymat des patients.

CHAPITRE I : matériel et méthodes

4 Conception du laboratoire

La plateforme biomoléculaire a été domiciliée au niveau du laboratoire de recherche de l'UMMTO prévu comme NSB-2 d'une superficie utile de 565 m².

Il comporte plusieurs locaux qui ont été organisés pour sécuriser les personnes et les échantillons en mode « Marche en Avant » à savoir :

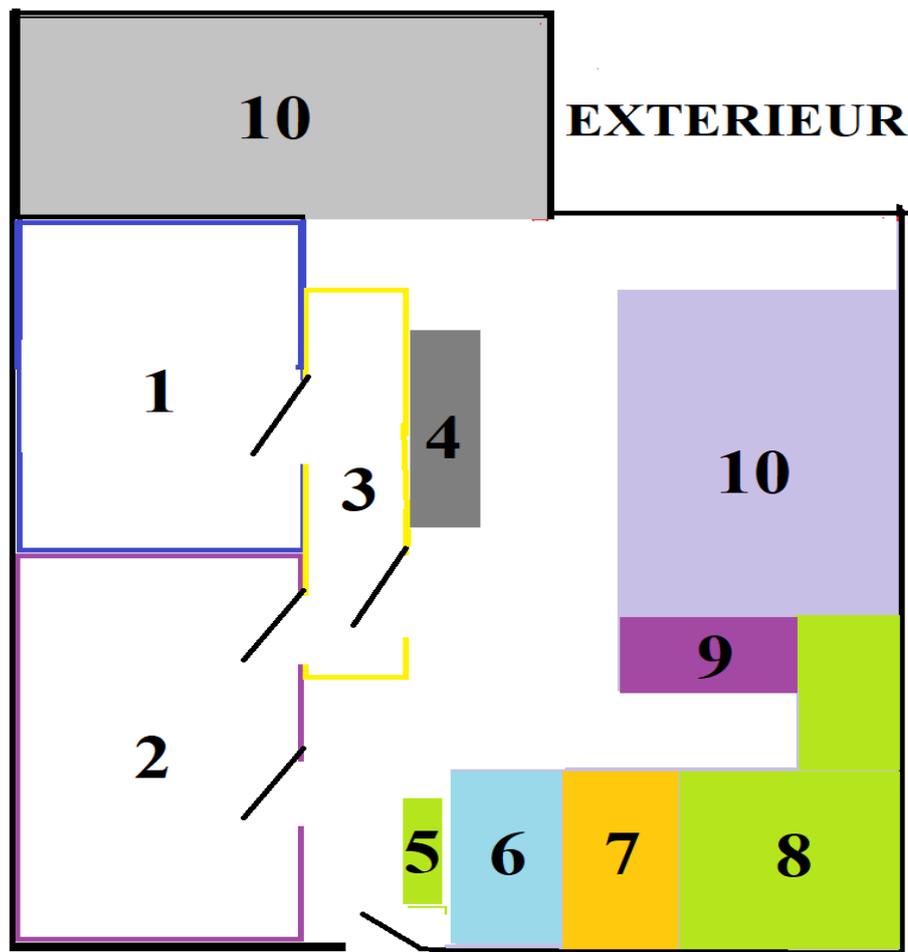


Figure 29: Conception du laboratoire SARS-CoV-2 UMMTO.

- 1) Salle d'extraction.
- 2) Salle de préparation du Master Mix.
- 3) Salle d'amplification.
- 4) Couloir des autoclaves et de conservation des échantillons.
- 5) Table de réception des prélèvements.
- 6) Laverie.
- 7) Sanitaires.
- 8) Bureaux.
- 9) Salle de stockage.
- 10) Débarras.

CHAPITRE I : matériel et méthodes

5 Matériel et méthodes

5.1 Matériel

5.1.1 Appareillage

5.1.1.1 Appareils de sécurité microbiologique

- Poste de sécurité microbiologique (PSM) TelstarClass II, 0.4 m/s | Bio II A series (1).
- Telstar Mini-V/PCR Hotte à Flux Laminaire (3).
- Cabine Telstar à Flux Laminaire Horizontal MH-100 (2).



Figure 30: Appareils de sécurité microbiologique.

5.1.1.2 Appareils d'agitation et de centrifugation des échantillons

Agitation :

- IKA MS 3 Digital Vortex Mixer (1).
- Neutiation iSwix VT Vortex Mixer (2).

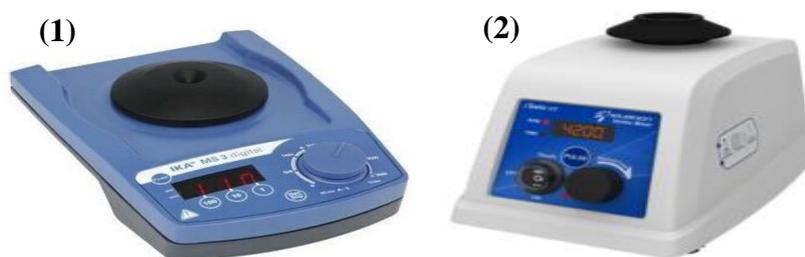


Figure 31 : Appareils d'agitation.

Centrifugation :

- Hettich Zentrifugen EBA20 (1).
- Refrigerated Centrifuge Sigma 3-16 PK (2).

CHAPITRE I : matériel et méthodes



Figure 32 : Appareils de centrifugation.

5.1.1.3 Automates d'extraction

- biocomma[®] Nucleic Acid Extraction System M32 (3).
- QIAcube automated spin column purification (1), (2).

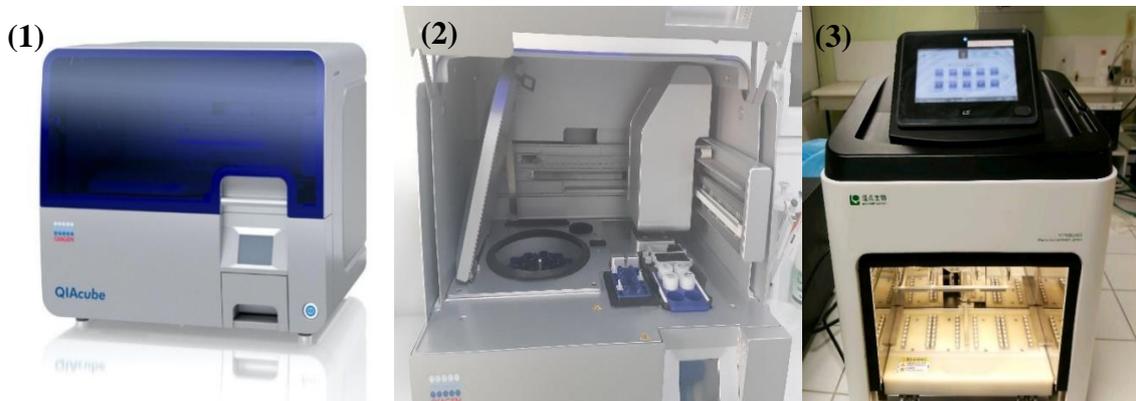


Figure 33: Automates d'extraction.

5.1.1.4 Automates d'amplification

- Mic Real-Time PCR System (4), (5).
- Applied Biosystems ABI 7500 Real-Time PCR System (1), (2).
- ROTOR GENE Q. (QIAGEN[®]) (3).



Figure 34: Automates d'amplification (thermocycleurs).

CHAPITRE I : matériel et méthodes

5.1.1.5 Appareils informatiques et logiciels

- PC portable Dell.
- PC bureau HP.
- Mic qPCR analysis software.
- Applied Biosystems 7500 Fast and 7500 Real-Time PCR Systems software.
- Rotor-Gene AssayManager.
- Onduleur APC Smart-UPS SRV 3000VA LCD 230V (1).
- Onduleur UPS VGD-3000 - 3000 VA – Powercom (2).
- Imprimante Canon.
- Microsoft Office Excel.

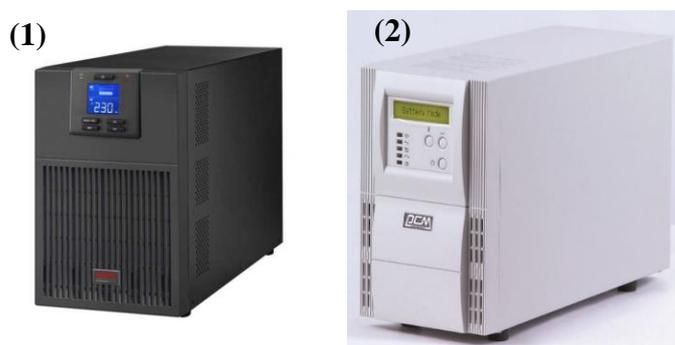


Figure 35 : Onduleurs.

5.1.1.6 Appareils de conservations des réactifs et des échantillons

- Réfrigérateur ENIEM[®] (2°C – 8°C) (3).
- Congélateur ENIEM[®] (-20°C) (1).
- Congélateurs verticaux à très basse température Thermo Scientific[™] Forma[™] série 900 (- 86°C) (2).



Figure 36 : Appareils de conservation des échantillons et des réactifs.

5.1.1.7 Appareils utilisés pour le nettoyage et la stérilisation

- Machine à laver ENIEM (3).
- Distillateur (4).
- Stérilisateur médical Han Sung HTA-50V (2).
- Autoclave 23 litres BEINGde class B (1).

CHAPITRE I : matériel et méthodes



Figure 37 : Appareils de nettoyage et de stérilisation.

5.1.2 Le consommable

5.1.2.1 Equipements de protection individuelle (EPI)

- Tenue du bloc et sabots.
- Blouses de laboratoire (1).
- Surblouses (2).
- Charlottes de protection (2).
- Surchaussures (2).
- Lunettes de protection de laboratoire (2).
- Visières médicales de protection (5).
- Masques de protection 3 plis (bavettes).
- Masques de protection FFP2/NK95 : divers types selon la disponibilité (2).
- Gants :
 - ✚ En Latex/ Nitrile non poudrés : réservés uniquement au processus analytique (3).
 - ✚ Classiques poudrés : utilisés pour les opérations d'hygiène et d'entretien ainsi que pour le déballage des échantillons et leurs préparation (nettoyage/étiquetage/vortexage) (4).



Figure 38: Équipements de protection individuelle.

CHAPITRE I : matériel et méthodes

5.1.2.2 Matériel de prélèvement et transport d'échantillons

Deux catégories appartenant à plusieurs marques ont été utilisés/ traités selon leurs disponibilités :

- **Les milieux de transport de virus vivants (VTM)** : permet de conserver des virus vivants infectieux, mais une inactivation thermique peut être faite à 60° pendant 30 à 60 minutes.
- **Les milieux de préservation de virus inactivés** : le virus est inactivé par voie chimique (sels de Guanidium par exemple) mais le génome est stabilisé. Ce type de milieux permet de lancer l'analyse sans inactivation thermique préalable.

Transport:

- Sacs isothermes.
- Glacières isothermes.

5.1.2.3 Produits d'hygiène et d'antiseptie pour les personnes



Figure 39: Produits d'hygiène et d'antiseptie pour les personnes.

- Savon liquide classique et Savon antiseptique : l'un ou l'autre ont été utilisés indifféremment selon la disponibilité, les deux étant actifs sur le virus.
- Gel hydroalcoolique : plusieurs points de dispensation ont été mis dans les locaux du laboratoire.
- Solution hydroalcoolique 70° : préparée par divers éléments de la faculté de médecine de Tizi-Ouzou puis au niveau du laboratoire SARS-CoV-2 lui-même selon les recommandations de l'OMS pour couvrir ses propres besoins.[199]

Cette dernière a été très largement utilisée dans toutes les opérations d'antiseptie/désinfection durant les premiers mois d'activité, elle a été par la suite réservée à la désinfection des mains gantées avant de les faire sortir du PSM d'extraction en raison de sa facilité d'utilisation.

5.1.2.4 Produits de désinfection de l'environnement de travail

CHAPITRE I : matériel et méthodes



Figure 40 : produits de désinfection de l'environnement du travail.

- Désinfectants à base de tensio-actifs prêt à l'emploi : utilisés pour les besoins de désinfection des surfaces et objets à l'intérieur du PSM/flux laminaire principalement et du reste au matériel de laboratoire au besoin.
- Désinfectant en lingettes imprégnés prêtes à l'emploi et à usage unique
- Désinfectant concentré : utilisé comme le prêt à l'emploi après dilution, aussi pour la pré-désinfection du matériel recyclable et pour le lavage du linge.
- Eau de Javel 12° : utilisé principalement pour la préparation de l'eau de Javel 0.5%, aussi pour son pouvoir oxydant sur l'ADN en cas de suspicion de contamination des objets et surfaces non métalliques par les amplicons. [199]
- Eau de Javel 0.5% préparée au niveau du laboratoire selon les recommandations du CDC[200]utilisée en vaporisation pour la désinfection de l'air ambiant en fin de journée de travail en particulier lors des périodes de forte activité et ce en complément de l'aération et de l'ensoleillement en durant la journée.
- Papier essuie tout et surblouses usagées découpées pour l'essuyage des surfaces.

5.1.2.5 Matériel utilisé dans la collecte des déchets

- Sacs autoclavables de différentes tailles (5).
- Bidons DASRI de différentes tailles (3), (4).
- Sachets DASRI (1).
- Sachets DAOM (2).

CHAPITRE I : matériel et méthodes



Figure 41: Matériels de recueil de déchets.

Comme le laboratoire n'utilise pas de matériel PCT, l'ensemble des déchets sont stérilisés par autoclavage avant leurs éliminations dans des sachets DASRI qui sont ensuite collectés périodiquement par le service concerné du CHUTO.

5.1.2.6 Matériel, réactifs et consommable utilisés pour l'étape d'extraction

Kits d'extraction :

Extraction sur colonne de silice :

- QIAamp® viral RNA mini kit (QIAGEN) (3).
- NukEx pure RNA/DNA (GERBION) (2).
- DA0591-RNA/DNA purification kit (spin column) (DaAnGene) (1).



Figure 42: Kits d'extraction manuelle par colonne.

Extraction par les billes magnétiques :

- commaXP® virus DNA/RNA extraction kit (magnetic beads) (4).
- biocomma® Nucleic Acid Purification kit (virus DNA/RNA Purification kit) (prepacked magnetic beads) (3).
- NukEx Mag RNA/DNA (GERBION) (2).
- MagMax™ pathogen RNA/DNA kit (Applied Biosystem) (1).
- Genolution® extraction plate (96Well) VN143.

CHAPITRE I : matériel et méthodes



Figure 43: Kits d'extraction par billes magnétiques.

Produits utilisés dans la régénération des réactifs :

- Ethanol absolu 96%.
- Iso-propanol 99%.
- Eau ultra-pure (DNase/RNase free).



Figure 44 : Produits utilisés pour la régénération des réactifs.

Matériel de préparation des colonnes et des plaques magnétiques :

- Embouts à filtre (1).
- Embouts sans filtre stériles (1).
- Microtubes de 1.5 μ l (2).
- Tubes coniques (2).
- Tubes en verre à fond rond (2).
- Racks microtubes (60/96) (2).

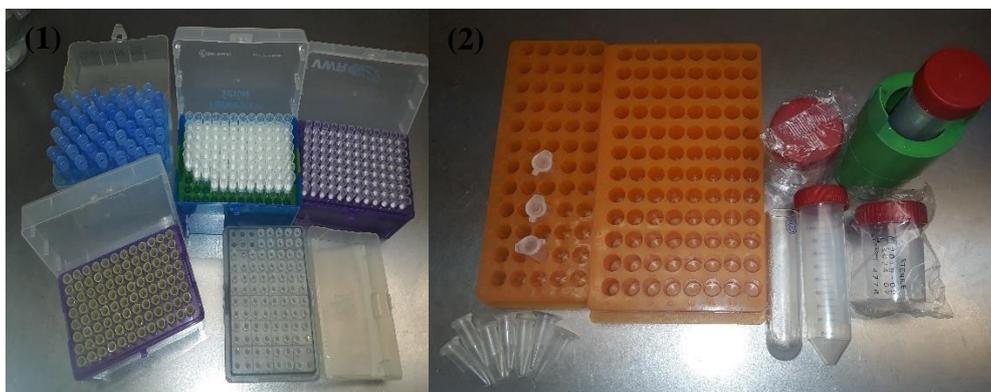


Figure 45 : Matériel utilisé pour la préparation des colonnes et des plaques.

CHAPITRE I : matériel et méthodes

5.1.2.7 Matériel, réactifs et consommable utilisés pour l'étape d'amplification

Kits de PCR :

- SuperScript® III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System with ROX.
- BioGerm 2019-nCoV PCR.
- Novel Coronavirus (2019-nCoV) Nucleic Acid Diagnostic kit (PCR-Fluorescence Probing) (Sansure Biotech).
- Virella SARS-CoV-2 seqc real time RT-PCR Kit 2.0 (GERBION).
- Real-Time Fluorescent RT-PCR Kit for Detection SARS-CoV-2 (BGI).
- EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex (RT-PCR en temps réel).
- DA0930-Kit de détection pour l'ARN du nouveau coronavirus 2019 (2019-nCoV) (PCR-Fluorescence Probing). (DaAnGene).



Figure 46 : Kits de RT-PCR pour SARS-CoV-2.

Matériel :

- MicroAmp® Optical 8-Tube Strip (0.2 ml).
- MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode.
- Mic Tubes and Caps.

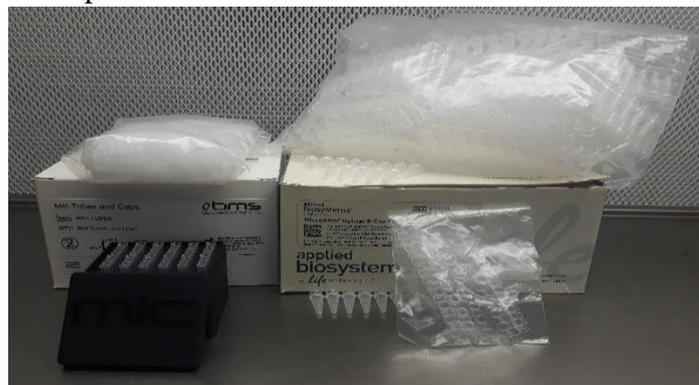


Figure 47 : Consommable des thermocycleurs.

5.1.3 Petit matériel de laboratoire

5.1.3.1 Verrerie

De divers volumes, sont utilisés principalement :

- Les éprouvettes.
- Les pipettes jaugées avec pipteur.
- Les béchers.

CHAPITRE I : matériel et méthodes

La verrerie a pour principal usagela mesure des volumes des réactifs comme l'éthanol et l'isopropanol. Dans certains cas (extraction par colonnes) elles sont utilisées comme bac à déchets liquides (bêchers).

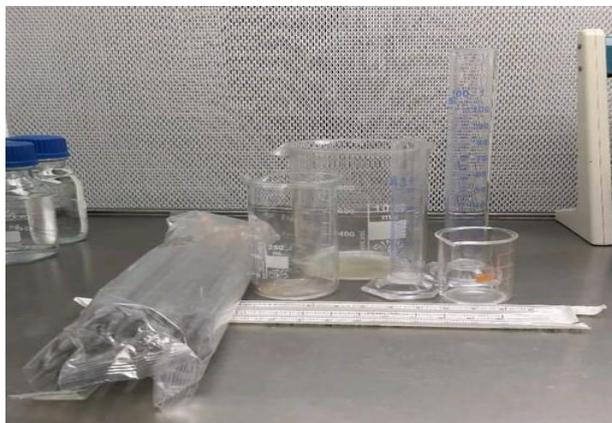


Figure 48 : Verrerie.

5.1.3.2 Micropipettes

Plusieurs volumes de micropipettes simples (monocanal) et multicanaux adaptés à la cadence et aux différents volumes de manipulation (0.5 à 1000 microlitres).

Utilisation d'un portoir de micropipettes pour faciliter leurs utilisations.



Figure 49 :Micropipettes.

6 Méthodes

6.1 La sécurité au laboratoire SARS-CoV-2

C'est l'enjeu majeur de l'activité du laboratoire. Un Protocol strict de sécurité a été mis en place pour assurer :

- ✓ La sécurité du personnel du laboratoire SARS-CoV-2.
- ✓ La sécurité de l'environnement à la reprise de l'activité universitaire.
- ✓ La garantie de résultats fiables.
- ✓ Ce Protocol consiste en l'application d'un certain nombre de règles d'hygiène, de normes vestimentaires, de l'élaboration de circuit des circulations des personnes. et des déchets.
- ✓ Ce Protocol c'est inspiré des recommandations de l'OMS et des recommandations de la société française de microbiologie. [151, 201]
- ✓ **NB** : l'ensemble de ses protocoles de sécurité ont été rédigés et affichés.

6.1.1 Normes d'hygiène

- ✓ Le nettoyage pluriquotidien de l'appareillage critique en plus du traitement par UV avant et après utilisation.
- ✓ Aération et ensoleillement quotidien de tous les locaux.
- ✓ Désinfection quotidienne des bureaux et du matériel utilisé par plusieurs personnes comme les claviers, ordinateurs, poignées ...
- ✓ Désinfection soigneuse du matériel utilisé dans le PSM et de tout ce qui sort de ce dernier.
- ✓ Désinfection des glacières avant et après ouverture.
- ✓ Désinfection des tubes de prélèvements.
- ✓ Utilisation en grande quantité et à plusieurs points des gels et des solutions hydroalcooliques.
- ✓ Vaporisation de l'air à la fin du travail avec de l'eau de Javel 0.5% en particulier lors des périodes de grande cadence.
- ✓ Nettoyage hebdomadaire des locaux.

6.1.2 Normes vestimentaires et de circulation du personnel

- ✓ Afin de minimiser le risque associé à l'erreur humaine et de faciliter la formation, nous avons opté pour un travail avec groupe Maximal de 06 personnes se relayant un jour sur trois (équipe de 02 personnes).
- ✓ Le personnel est tenu de porter une tenue adaptée à la salle de travail dans l'esprit de la marche en avant.
- ✓ Un vestiaire permet de se changer et de mettre une tenue de bloc puis d'une blouse à manches longues en plus d'une bavette. Ceci permet la circulation dans les bureaux et à l'extérieur en cas de besoin.
- ✓ Dans la salle d'extraction, le personnel utilise en plus, une surblouse et au besoin une charlotte et des surchaussures et sont muni d'un masque FFP2 et de gants.

CHAPITRE I : matériel et méthodes

- ✓ Les mains gantées sont systématiquement désinfectées à chaque sortie du PSM.
- ✓ La surblouse/gants doit être enlevée en passant de la salle d'extraction à la salle de préparation du mix.
- ✓ A la fin de la journée, les blouses/surblouses sont stockés dans la laverie en vue de leurs recyclages.

Malgré cela, plusieurs événements ont risqué de contamination du personnel se sont produits, nous les avons gérés de la sorte :

Tableau 6 : Les différents événements produits au niveau du laboratoire.

Nature de l'évènement	Cause	Conduite
Ouverture de la glacière dans le hall.	Intégration d'un nouvel élément à l'équipe.	-fermeture de la glacière. -désinfection des gants par gel hydroalcoolique. -vaporisation de la glacière et de l'air environnant par la Javel 0.5%.
Fuite du contenu du tube de prélèvement.	Kit de transport de mauvaise qualité.	-vaporisation du sac avec un désinfectant. -élimination du tube. -désinfection des gants par solution hydroalcoolique. -changement de gants.
Coupure d'électricité lors du travail dans le PSM.	Panne de l'onduleur du PSM.	-le manipulateur garde ses mains dans le PSM et se désinfecte les gants et les avant bras avec de la solution hydroalcoolique. -le manipulateur sort ses mains et ferme le PSM. -vaporisation de l'air environnant de solution hydroalcoolique. -élimination des gants et changement de surblouse.
Contamination massive par les amplicons.	Tubes optiques de mauvaise qualité qui éclatent à la fin du cycle de PCR.	-Arrêt de l'activité du laboratoire. -Nébulisation de mélange chimique actif sur l'ADN dans tous les locaux du laboratoire y compris dans les PSM allumés en mode flux laminaire. -Contrôle de qualité par utilisation de Master Mix en contact avec l'air ambiant de tous les locaux et du PSM.

6.1.3 Traitement des déchets

Les déchets sont traités différemment selon le poste desquels ils sont issus :

- a) Déchets du poste d'extraction :

Représentant le risque infectieux pour le personnel et l'environnement et pour lesquels un sac autoclavable et mis dans un bidon DASRI de 07 Litres.

CHAPITRE I : matériel et méthodes

A sont remplissage aux deux tiers ce dernier est fermé hermétiquement puis aspergés de solution désinfectante Après quoi, il est directement acheminé vers l'autoclave pour un cycle de stérilisation de 121° pendant 15 minutes.

A sa sortie, le sac est mis dans un grand sacchet DASRI.

b) Déchets du poste de préparation du Master-Mix :

Comme ils ne représentent théoriquement aucun danger infectieux ou de contamination aux amplicons, ces déchets sont directement éliminés dans un sacchet DASRI.

c) Déchets de l'amplification :

Malgré le risque faible lié à la nature même de la qPCR, les tubes optiques en post amplification sont les plus redoutables, en cas d'ouverture, ils peuvent engendrer une contamination de l'environnement par de grandes quantités d'amplicons à l'origine de PCR faussement et fortement positive.

Cette contamination est très rebelle, elle résiste à l'exposition aux UV ; aux désinfectants classiques et à la stérilisation. Ceci peut finir par la fermeture temporaire du laboratoire jusqu'à décontamination totale des locaux et tout ce qu'ils contiennent comme appareillage, matériel et consommable par des produits très agressifs.

A la fin du cycle de PCR, les tubes optiques sont délicatement enlevés pour éviter leurs ouvertures, mis dans un double gant usagé, ce dernier et hermétiquement fermé puis éliminé dans un sac DASRI.

CHAPITRE I : matériel et méthodes

6.1.4 Circuit des prélèvements et de l'information

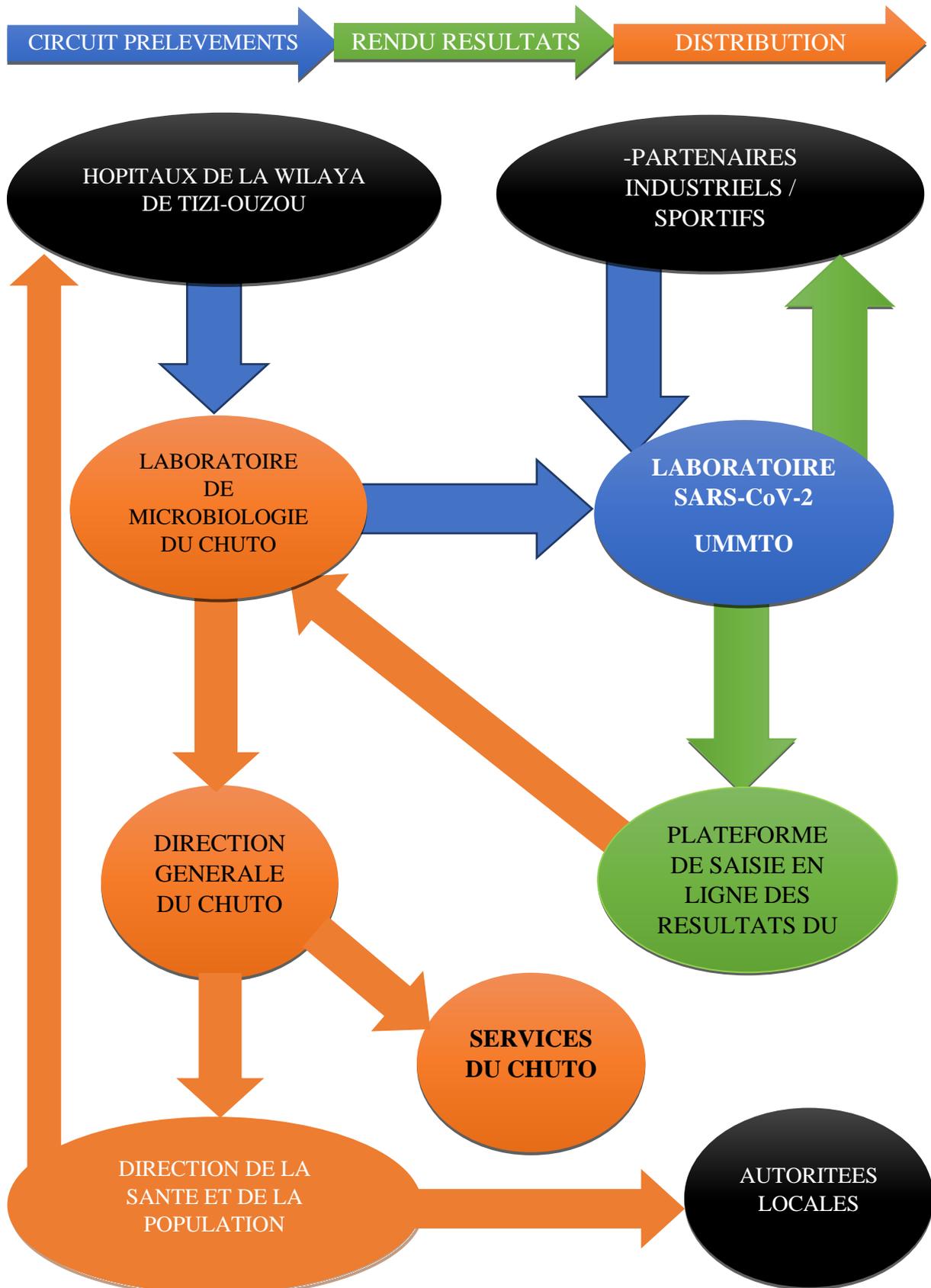


Figure 50 : Circuit des prélèvements et de l'information.

CHAPITRE I : matériel et méthodes

6.1.4.1 Circuit des prélèvements

Le laboratoire reçoit des prélèvements provenant de l'ensemble des secteurs sanitaires de la Wilaya de Tizi-Ouzou et parfois d'autres Wilaya limitrophes (Alger, Boumerdes, Bejaia) dont la réception est centralisée au niveau du service de Microbiologie du CHUTO.

Ce dernier affecte un numéro d'enregistrement qui lui est propre à chaque prélèvement ainsi que l'enregistrement des demandes d'analyses sur la plateforme de suivi de la COVID-19 du MSPRH.

Le laboratoire assure aussi la réception et/ou le prélèvement directe à la demande des partenaires industriels et du personnes de l'UMMTO.

6.1.4.2 Circuit de l'information

A évolué en deux temps :

- **Entre le 01 Avril 2020 et le 23 Août 2020** : la totalité des résultats étaient saisis et libérés par le laboratoire SARS-CoV-2 de l'UMMTO ; la livraison se faisait directement dans une enveloppe scellée adressée à la direction générale du CHUTO (1^{er} relais) qui à son tour les distribue aux différents services du CHUTO et à la DSP (2^{ème} relais). Cette dernière assure la communication avec les hôpitaux de la périphérie et les autorités locales.
- **Depuis le 24 Août 2020** : les résultats sont saisis sur la plateforme de suivi de la COVID-19 du MSPRH, mais 03 relais sont mis en place pour le transfert de l'information : le laboratoire de microbiologie du CHUTO, la direction générale du CHUTO et la DSP.

Ce circuit présente un inconvénient majeur de temps, en effet les résultats parviennent au minimum après 48h du prélèvement au médecin traitant.

Le facteur temps est déterminant dans le succès de la prise en charge et de la limitation de la contagion dans un contexte de maladie épidémique aigue, une amélioration du circuit par accès direct du demandeur est nécessaire.

CHAPITRE I : matériel et méthodes

6.2 Réception, enregistrement et préparation des prélèvements

6.2.1 Préparation du laboratoire

Elle se fait quotidiennement comme suit :

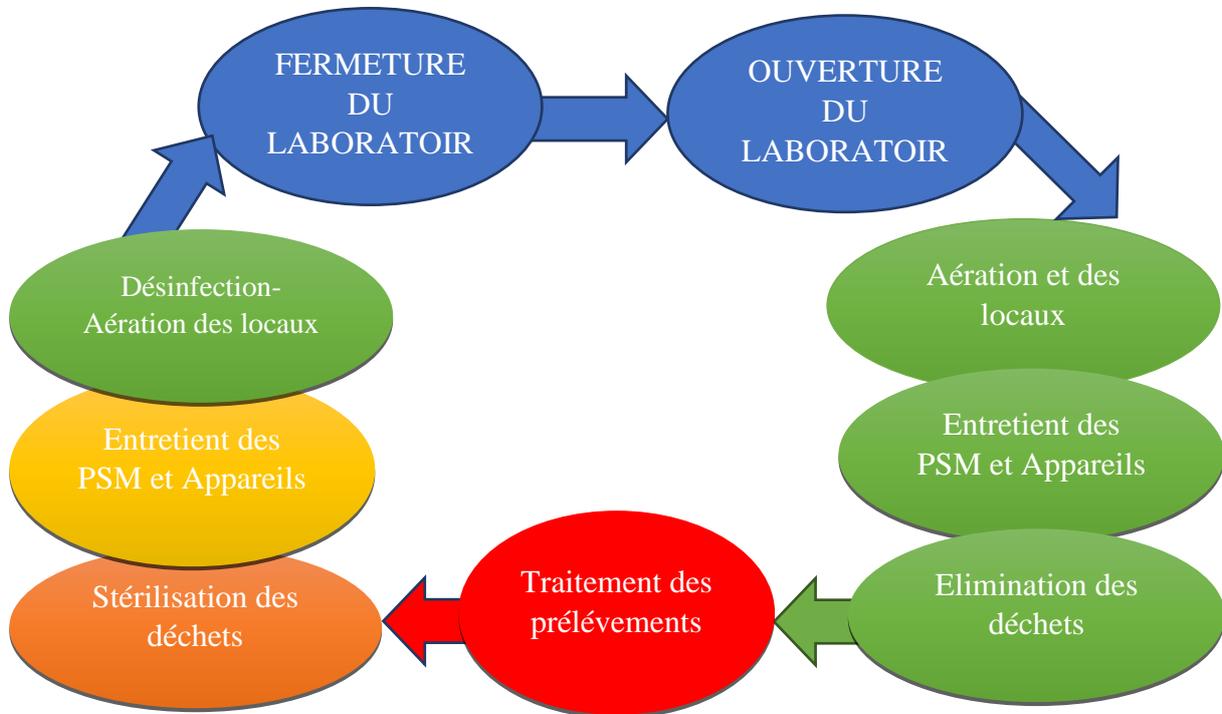


Figure 51 : Cycle de tâches effectuées quotidiennement au laboratoire.

NB : l'entretien des appareils et PSM consiste en l'allumage des UV pendant 15 minutes, suivi du nettoyage soigneux des surfaces, du matériel (extracteur, PSM, hôtes à flux laminaire) et du ravitaillement en matériel et consommable nécessaire pour éviter les va et vient lors des manipulations.

NB 2 : le ventilateur des PSM doit être mis en marche **AVANT** d'ouvrir le PSM et doit être éteint **APRES** fermeture du PSM pour éviter que l'air de l'espace de travail du PSM ne sorte de ce dernier.

6.2.2 Réalisation du prélèvement nasopharyngé

Le prélèvement nasopharyngé (PN) peut être extrêmement traumatisant, engendrant malaise, saignements, irritation de la cavité nasale et maux de tête prolongés selon les témoignages recueillis de personnes l'ayant déjà subi.

Plusieurs centaines de prélèvements ont été réalisés au profit des partenaires industriels, sponsors, donateurs et personnel de l'UMMTO ce qui nous a permis la formulation d'un

CHAPITRE I : matériel et méthodes

ensemble de recommandations afin d'améliorer la tolérance du PN en particulier chez les personnes devant le subir plusieurs fois comme le personnel du laboratoire SARS-CoV-2

Nous recommandons de :

- ✓ Le préleveur doit être revêtu de sa tenue de prélèvement : blouse, surblouse, masque FFP2, gants, lunettes de protection ou visière car le geste provoque souvent d'importants éternuement / toux en plus des larmoiements.
- ✓ Le tube doit être identifié avant la procédure, faire sortir l'écouvillon par la pointe de la tige **sans jamais toucher** ni le milieu de la tige ni la tête de l'écouvillon.
- ✓ Subir le PN, ceci donne un bon aperçu des ressentis, des textures et du rythme de progression.
- ✓ La règle globale pour le préleveur est d'être doux et attentif lors du geste.
- ✓ **L'écouvillon** : selon la marque peut être fin ou épais, à tige rigide ou élastique, à tête fine ou épaisse, lisse ou rugueuse. Dans tous les cas le préleveur doit être très patient, en particulier avec les écouvillons à tête fine et rugueuse qui sont encore plus irritants.
- ✓ Le risque que l'écouvillon casse n'est pas négligeable, il ne faut jamais forcer la progression quand cette dernière butte.
- ✓ Nous avons observé qu'il y avait autant d'anatomies de la cavité nasale que d'individus prélevés, la déviation de la cloison nasale est très fréquente : il faut à ce titre demander à l'individu s'il présente cette anomalie et s'il a l'habitude de Seigner.
- ✓ La procédure et les effets indésirables doivent être expliqués au patient tout en le rassurant.
- ✓ Les premiers centimètres sont critiques à la tolérance du geste, Après inclinaison de la tête, surélever la pointe du nez pour révéler les narines externes tout en invitant le patient à prendre un souffle profond et se décrisper le visage au cours du geste (fermeture des narines).
- ✓ En raison de la fréquence de la déviation de la cloison nasale, en cas de résistance à l'entrée, il ne faut surtout pas forcer mais aller vers l'autre narine.
- ✓ Une fois la tête entrée l'écouvillon doit être maintenu en parallèle au palais, jusqu'à atteindre le cornet inférieur (qui se traduit par une résistance latérale) dans ce cas l'écouvillon glissera dans le sens du cornet.
- ✓ Rester attentif aux grimaces du patient et lui demander de signaler toute sensation de douleur intense.
- ✓ Une fois arrivé au fond (le patient peut tousser, avoir un réflex nauséux ou déglutir), faire tourner très délicatement l'écouvillon pour gratter les cellules.
- ✓ Retirer délicatement l'écouvillon et le mettre l'intérieur du milieu de transport puis le casser selon la hauteur du tube soit à la base (en s'aidant du bouchon) soit au milieu (en s'aidant de la paroi du tube) **sans toucher la tige.**

CHAPITRE I : matériel et méthodes

6.2.3 Traitement des prélèvements

Les prélèvements sont adressés par le CHU en un arrivage (entre 11h à 13h) dans des glacières isothermes classiques. Ces dernières sont mal adaptées au travail dans les PSM à cause de leurs grands volumes.

Ces dernières sont déposées à l'entrée du laboratoire (figure 52) où elles sont vaporisées d'eau de Javel 0.5% et laissées 10 minutes pour être ensuite acheminées vers le PSM.



Figure 52 : Dépôt des prélèvements sur la table d'entrée.

Après déballage, les glacières sont vaporisées de l'intérieur et de l'extérieur par une solution désinfectante avant d'être sorties du PSM et redéposées à l'entrée.

Les prélèvements sont ensuite :

- ✓ Ordonnés : avant de les faire sortir du sac de transport ;
- ✓ Examinés : pour rechercher une éventuelle fuite, le cas échéant le prélèvement est directement éliminé et l'analyse ne doit pas être réalisée¹ ;
- ✓ Vérifiés : pour la concordance entre l'identification portée sur le sac de transport, le tube et celle portée sur la plateforme du MSPRH ;
- ✓ Nettoyés les tubes pour éliminer tout risque de contamination ;
- ✓ Numérotés et Identifiés : un numéro du laboratoire SARS est affecté en plus d'un numéro simplifié « du jour » qui servira pendant la manipulation. Les identifiants en plus sont aussi mentionnés sur le tube au cas où ils n'y figurent pas ;
- ✓ Homogénéisés : par vortexage pendant quelques secondes, suivi d'une décantation de quelques minutes.

1 : En cas de fuite de l'échantillon, une désinfection est réalisée afin d'éliminer le risque de contagions. L'élimination du tube vient pour éviter le risque de contamination par les acides nucléiques qui ne sont pas éliminés par la désinfection.

CHAPITRE I : matériel et méthodes

6.3 Diagnostic de l'infection au SARS-CoV-2 par PCR

6.3.1 Les contrôles de qualité

Nous réalisons des contrôles de qualité à plusieurs échelles :

6.3.1.1 Les contrôles de qualité internes au laboratoire

6.3.1.1.1 Contrôles de qualité de la procédure

Ils sont réalisés et validés quotidiennement voire même pluri-quotidiennement si plusieurs séries extraction-amplifications sont effectués le même jour. Ces derniers sont essentiels pour valider la technique, la manipulation et le contrôle de l'environnement.

Nous utilisons 05 points de contrôle :

- ✓ **Une réaction d'extraction sans échantillon** : la colonne ou le puit de billes magnétiques est laissé sans aucun échantillon (uniquement le mélange de lyse, les lavages et l'élution) permet de contrôler la qualité des réactifs d'extraction, la qualité du consommable ainsi que celle de la manipulation.
- ✓ **Le contrôle interne standard (ISC)** : inclus dans certains kits, il s'agit d'un gène cellulaire universel (comme le gène de la Ribonucléase P), il doit constamment être positif dans chacune des réactions. Il permet de contrôler la qualité et le rendement de l'extraction.
- ✓ **L'ARN de contrôle (CQ-ARN)** : fourni uniquement avec certains kits de qRT-PCR, il est soit ajouté à l'extraction (joue le rôle d'un deuxième contrôle interne standard), soit directement au Master Mix jouant le rôle d'un contrôle positif.
- ✓ **Le contrôle négatif (CQ-NEG)** : permet le contrôle du Master Mix, fourni avec le kit de qRT-PCR, doit être obligatoirement négatif pour les cibles virales (peut être positif pour les contrôles internes dans certains kits).
- ✓ **Le contrôle positif (CQ-POS)** : permet le contrôle du Master Mix, doit être obligatoirement positif pour toutes les cibles détectées dans la réaction (contrôles internes et gènes viraux cibles).

Le tableau ci-après résume les différents cas de figure pouvant être observés avec le contrôle de qualité :

Tableau 7 : Interprétation des différents résultats des contrôles.

CQ / PCR	Extraction à vide	ISC	CQ-ARN*	CQ-NEG	CQ-POS
Bonne manipulation	-	+	+	-	+
Echec de l'extraction	-	-	-	-	+
Mauvais rendement	-	+ faible	- ou + faible	-	+
Mauvaise	+	+	+	-	+

CHAPITRE I : matériel et méthodes

manipulation					
Inhibition de la PCR ou altération du Master Mix	-	-	-	-	-
Contamination par les amplicons ou contamination du Master Mix***	+ fort	+	+	+fort	+

*ajouté à l'extraction.

** il sera positif s'il est ajouté directement au Master Mix.

*** lancer un nouveau Master Mix à vide, s'il est positif, il s'agit d'une contamination probable aux amplicons.

6.3.1.1.2 Vérification des Machines

Effectué périodiquement pour chaque instrument ou au besoin en cas de perturbation des résultats :

Exemple : La Calibration de l'AB7500 : effectuée tous les 06 mois pour s'assurer de la fiabilité de la lecture, un contrôle du bruit de fond est recommandé mensuellement.

6.3.1.2 Contrôle de qualité externe

Nous avons participé à l'évaluation organisé par le Laboratoire of the Gouvernement Chemist (LGC Ltd) en Novembre 2020.

Nous avons reçu deux standards titrés à 10 000 copies/ ml et 1000 copies/ mL respectivement. Notre réaction a détecté le premier a un Ct de 26 mais pas le deuxième. Il est fort probable que ceci soit au mauvais état de livraison des standards.

6.3.2 L'extraction des acides nucléiques

6.3.2.1 Techniques manuelles

En colonnes, nous avons utilisé plusieurs kits d'extraction basés sur la séparation en colonne de Silice (**voir chapitre 3**), le principe est le même et les étapes sont généralement les mêmes à quelques nuances près (chauffage, nombre de lavage, spécificité d'extraction pour l'ARN ou extraction universelle d'acides nucléiques...) (**voir annexes 7**).

CHAPITRE I : matériel et méthodes

6.3.2.2 Techniques automatisées

Suite à l'augmentation de la demande, nous avons introduit un **automate d'extraction basé sur les colonnes à système fermé (Qiagen QIAcube)**, ce dernier effectue 12 extractions toutes les 02 heures et nécessite une préparation des échantillons et un ensemble de consommable supplémentaire (tubes d'échantillon, embouts à filtre adaptés, bouteilles de réactif, poubelles) et nettoyage minutieux avant et après chaque cycle d'extraction.

Depuis Juin 2020, nous utilisons un autre automate basé sur les billes magnétiques (Biocomma M32). Ce dernier est à système ouvert, à noter que l'extraction par billes magnétiques offre les mêmes rendements que celles des colonnes.

Les avantages et les inconvénients de chaque technique sont résumés dans le tableau ci-après :

Tableau 8 : Avantages et inconvénients des différentes techniques d'extraction.

Technique d'extraction	Avantages	Inconvénients
Extraction manuelle par colonnes de silice.	<ul style="list-style-type: none">-Possibilité d'extraction unitaire.-adaptés aux faibles cadences et aux urgences si en nombre faible.	<ul style="list-style-type: none">-Cadence dépendante du nombre de centrifugeuses et de personnes.-Non adaptée aux grandes cadences.-Risque de contamination croisée entre échantillons et même des réactifs non négligeables en raison du grand nombre de manipulations.-Plus coûteuse par extraction, contrôle de qualité compris.-Ne permet pas de dépôt de l'extrait par pipette multicanaux
Extraction Automatique sur QIAcube.	<ul style="list-style-type: none">-Adapté aux faibles cadences sans urgences.	<ul style="list-style-type: none">-Plus lente que l'extraction manuelle-Système fermé : non programmable, non recyclable, nombre important de consommable.-Préparation et entretien long exposant à des erreurs.-Automate et consommable coûteux à rentabilité limitée.-Ne permet pas de dépôt de l'extrait par pipette multicanaux
Extraction automatique par billes magnétiques sur Biocomma M32.	<ul style="list-style-type: none">-Système ouvert, peu de consommable, possibilité de programmation de l'appareil.-possibilité de recyclage de l'ensemble du consommable.-extraction très rapide pouvant aller à 32 extractions toutes les 24 minutes.-Entretien facile.	<ul style="list-style-type: none">-Rupture du ravitaillement en consommable (plaques et tiges d'extraction).-Automate coûteux mais à rentabilité importante.

CHAPITRE I : matériel et méthodes

	<ul style="list-style-type: none">-Possibilité d'achat de réactif prêt à l'emploi.-adapté aux cadences moyennes.-Prix par test moins cher que les colonnes contrôlent de qualité compris.	
--	---	--

De plus, deux des très grands avantages du système Biocomma M32 est qu'il permet :

- La préparation des plaques et le dépôt des échantillons à extraire pendant qu'un cycle soit en cours, limitant le temps perdu en inter-cycle d'extraction.
- Une préparation des plaques réactionnelles et un dépôt de l'extrait dans le Master Mix par pipette multicanaux, réduisant considérablement le temps de dépôt, le risque d'erreurs, d'oubli et de contaminations croisés.

Au total, l'extraction par technologie billes-magnétiques a permis de lever considérablement la pression sur le personnel du laboratoire en particulier lors du 2^{ème} pic épidémique, sa vitesse n'est en réalité limitée que par le nombre de thermocycleurs.

A titre d'exemple, dans notre cas, pour 144 tests, l'extraction sur Biocomma M32 nécessite 05 cycles d'extraction soit 02 heures (préparation et entretien compris), à titre de comparaison, le QIAcube nécessiterait 12 cycles, autrement dit 24 heures en plus de 30 minutes au minimum entre chaque cycle, pour préparation et l'entretien de l'appareil qui prend jusqu'à 30 minutes par cycle. (Un total approximatif de 30 heures).

La technique manuelle quant à elle nous prend habituellement 02 heures pour 44 extractions toute étape comprise (correspondant à la capacité de centrifugation). Mais au-delà de 44 extractions, ce temps devient plus long en raison de la fatigue du personnel.

Nous avons pu résoudre le problème des tests unitaires sur Biocomma M32 grâce au recyclage.

Dans les deux cas, en cas de forte cadence, le risque d'erreur et de contamination est plus important.

Il semble donc que la technique automatisée à système ouvert soit l'idéal pour faire face à une épidémie nécessitant un grand nombre de tests.

6.3.3 L'étape d'amplification.

6.3.3.1 Préparation du Master Mix

L'opération s'effectue dans une salle physiquement séparée de celles d'extraction et d'amplification, sous Hôte à flux laminaires ou équivalent.

CHAPITRE I : matériel et méthodes

La préparation du master mix nécessite :

- A. Des tubes optiques.
- B. Des microtubes 1.5 ml.
- C. Des cônes et pointes sans filtre qualité PCR ou simples stérilisés.
- D. **Un Kit de qRT-PCR** : Depuis Avril 2020 nous avons utilisé de nombreux kit de qRT-PCR dont *SANSURE BIOTECH Novel Coronavirus (2019-nCoV) Nucleic acid diagnostic kit* depuis Mai 2020 à ce jour.

Ces kits sont tous basés sur la technologie **Multiplex et en temps réel**, ils contiennent habituellement deux solutions A et B qui combinées donnent le Master Mix, un contrôle positif et un autre négatif.

Hormis le Protocole Charité (PCR simplex en temps réel), la préparation du Master Mix tout kits confondus est simple et ce fait à partir de deux composantes :

- **Une Solution A** : contenant tout le mélange réactionnel nécessaire à la PCR hormis les enzymes (Tampon réactionnel, amorces et sondes)
- **Une solution B** : contenant les enzymes.

Pour chaque kit, les volumes réactionnels sont affichés dans le poste de préparation pour faciliter les calculs.

La préparation du Master Mix obéit aux directives du fabricant.(**Annexe 8**)

NB : certains kits contiennent des contrôles internes d'extraction qu'il faut ajouter au mélange de lyse.

6.3.3.2 Lacement d'un nouveau cycle PCR

Le cycle est préprogrammé pour chaque kit reçu. Le fabricant précise dans le résumé des caractéristiques du produit :

- Le nombre d'étapes (Maintient de température, cyclisation).
- Les températures et le temps de chaque étape.
- Les fluorophores ou les longueurs d'onde de lecture pour chaque gène recherché.

Pour chaque nouveau Kit de qRT-PCR ces informations sont programmés à vide et un « exemplaire » est sauvegardé tel quel pour être utilisé à chaque nouveau cycle sans devoir le reprogrammé (Template), il suffit alors de « crée un nouveau cycle à partir d'un exemplaire existant ».

CHAPITRE I : matériel et méthodes

6.3.4 Lecture et interprétation des résultats (amplification SANSURE)

Le diagnostic de l'infection SARS-CoV-2 à notre niveau est qualitatif : il apporte une réponse (positif/négatif) ainsi qu'une estimation de la contagiosité de l'individu mise en remarque dans le résultat.

Les valeurs seuils que nous avons utilisés ont évolué au cours du temps, en nous basant dans un premier temps sur les recommandations du fabricant puis en ajustant le Cycle seuil (Ct) selon l'automate en question, le Kit de diagnostic et celui de l'extraction.

Dans un 2^{ème} temps nous avons ajusté nos seuils selon les publications relatives à la contagiosité des individus corrélée à leurs Ct. [202, 203]

A l'heure actuelle et pour cette étude, nous avons choisi les valeurs suivantes (SANSURE BIOTECH) :

Tableau 9 : Interprétation des Ct.

GENE ¹	Ct
ORF1-ab	≤ 35 Cycles
N	≤ 35 Cycles ²
Contrôle interne RNASE-P	≤30 Cycles ³

1 : les positifs ne sont considérés que si la PCR est positive sur les deux gènes, les cas positifs sur un seul gène sont rarissimes (inférieure à 10 cas) et sont à recontrôler.

2 : les positifs de moins de 23 cycles sur le gène N sont rendus avec la remarque « contagiosité élevée », ceux avec une PCR au-delà de 35 cycles sont rendu « PCR positive tardive à la limite de détection, à confronter au contexte clinico-épidémiologique ».

3 : fixé par observation comparative des Ct des gènes viraux et du contrôle interne pour différentes dilutions. Plus cette valeur est élevée plus le rendement de l'extraction est médiocre. Ceci se voit lorsque le prélèvement ne récolte que peu de cellules.

6.3.5 Conservation des prélèvements et des extraits

Depuis le 01 Avril 2020, l'ensemble des prélèvements ont été conservés dans leurs tubes ou dans des cryotubes au congélateur -80°C, ce dernier a permis le stockage de plus de 10.000 tubes.

Cependant, par manque de place, depuis Novembre 2020 les prélèvements sont stockés à -20° après sélection des positifs et élimination des négatifs.

Les extraits quant à eux sont conservés à 4°C jusqu'à validation de la PCR au cas où elle sera refaite le jour même, si celle-ci nécessite d'être refaite le lendemain ce dernier est onglé à -20°, sinon les extraits sont directement éliminés.



**Chapitre II : Résultats et
discussion**

Chapitre II : Résultats et discussion

1 Apport du laboratoire sur le plan technique

1.1 Optimisation de l'extraction

Les modifications suivantes ont été apportés à l'étape d'extraction, ayant permis d'améliorer considérablement l'efficacité de la technique tout en fournissant des résultats reproductibles et sans altération des performances.

Réduction du volume réactionnel	Reduction du temps d'extraction	Interchangeabilité des réactifs
-Applicable pour l'extraction par billes magnétique ; le volume total des différents réactifs a été divisé par 4.	-Appliqué pour l'extraction par billes magnétiques, réduit de 44 minutes à 24 minutes. -Les colonnes peuvent être centrifugés à vitesse max quelques secondes au lieu du temps complet (30 sec à 01 minute) seulement entre lyse et lavages, mais le gain global de temps est négligeable.	-la lyse, les lavages et les billes magnétiques sont interchangeables entre différents kits de même nature mais pas entre billes magnétiques et colonnes de silice. -La protéinase K et l'ARN carrier sont interchangeables entre kits Colonnes de Silice et billes magnétiques

1.2 Optimisation de l'amplification

Evaluation de la reproductibilité des résultats entre Kits qRT-PCR SARS-CoV-2	Optimisation du Volume de Master Mix ¹	Evaluation de la Stabilité du Master Mix ²
-Résultats reproductibles au même Ct entre Sansure Biotech et l'ensemble des autres kits utilisés.	-Sur tubes optiques : possibilité de division des quantités par 02* -Sur plaques optiques possibilité de division du volume par 04**	-Sansure Biotech est Stable 07 semaine à -20°C. -Virella Sars-CoV-2 est stable plusieurs mois à -20°C.

1 : la division des volumes a été réalisé sur le kit SANSURE BIOTECH, en raison du volume important par rapport aux autres kits (30 µl).

2 : un résidu de Master Mix correspondant à une ou plusieurs réactions, peut être valorisé en le congelant à -20°C.

*Applicable pour l'AB7500 et Mic-PCR, une division plus poussée donne un signal irrégulier.

** Applicable uniquement sur AB7500, les Ct sont les même pour toutes les réactions mais l'intensité de fluorescence est réduite.

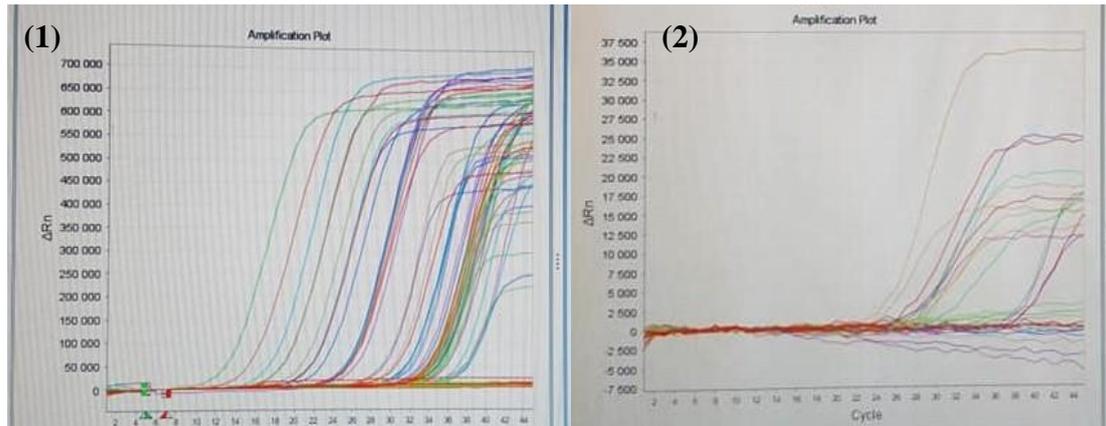


Figure 53: RT-PCR avec $\frac{1}{4}$ du volume du Master Mix. (1 : sur plaques/ 2 : sur tubes).

1.3 Evaluation de la PCR sans extraction

Suite à des publications relatives à l'utilisation de milieux de transports alternatifs et de PCR directement à partir de ces milieux, [204] nous avons tenté de reproduire l'expérience à notre niveau.

Nous avons procédé en 02 temps :

A) Dans un premier temps

Nous avons testé 05 échantillons comme suit :

- Remplacement de l'extrait par 10 μ l de culot de centrifugation d'1.5mL de milieu de transport de virus vivant.
- 100% de concordance avec méthode de référence ; cette même expérience a été étendue 96 autres échantillons avec un taux de concordance de 90%. Le seul milieu de transport utilisé fut le Corning Transport medium.

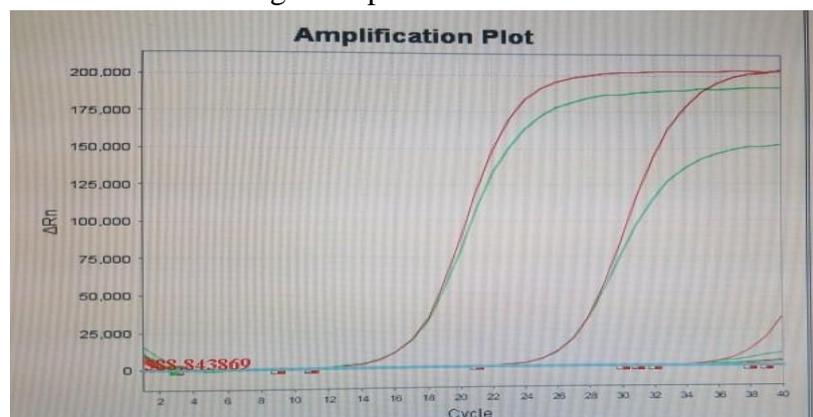


Figure 54 : RT-PCR sans extraction (courbes vertes).

Chapitre II : Résultats et discussion

B) Dans un deuxième temps :

Vu qu'à ce stade nous en recevions de nombreuses formes de milieux de transport, dont certains étaient des milieux pour virus vivant et d'autres des milieux de préservation.

Nous avons voulu prouver la reproductibilité de cette technique sur d'autres milieux de transport et si le rendement était comparable entre un dépôt direct ou après centrifugation.

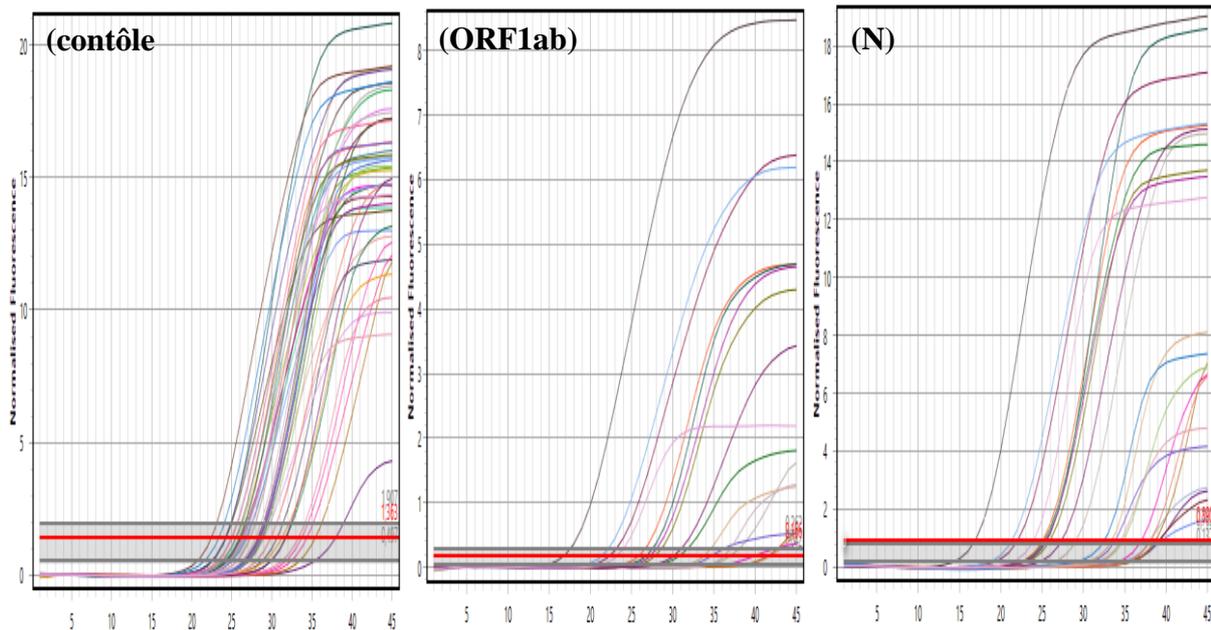


Figure 55: RT-PCR sans extraction avec dépôt direct.

Les résultats de la deuxième expérience sont isomérisés dans le tableau suivant :

Tableau 10: Récapitulatif des résultats de l'expérience sans extraction.

Type	SANS EXTRACTION			SURNAGEANT			CULOT		
	CI	N	ORF1ab	CI	N	ORF1ab	CI	N	ORF1ab
Milieu de transport de virus (VTM)	94.2%	77.8%	71%	54.1%	45%	42.2%	28.18%	76%	73%
Milieu de préservation	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

Au total : les résultats de la PCR par dépôt direct concorde mieux avec ceux de la technique de référence avec un décalage de Ct qui ne dépasse pas les 3 cycles,[204] comparant à celle avec centrifugation (soit pour le surnageant ou le culot).

Chapitre II : Résultats et discussion

Le caractère inhibiteur de la PCR a été prouvé par lancement d'une PCR dont le Master Mix contient le milieu de transport et le contrôle positif.

NB : on a remarqué qu'entre les différents types de VTM il y en a ceux qui donnent des résultats plus reproductibles que d'autres.

- ✓ **Conclusion :** une PCR directement à partir de l'échantillon peut être une alternative intéressante en cas de pénurie de kits d'extraction à condition que le prélèvement se fait sur des milieux de transport de virus vivants.

La technique de référence de cette expérience est une qRT-PCR avec extraction.

Pour les kits de préservation, nous avons observé une inhibition totale de la PCR. Pour confirmer l'hypothèse que ce type de milieu contient des inhibiteurs de PCR, nous avons lancé un cycle PCR avec un volume du milieu de préservation additionné de contrôle positif.

Nous avons eu une PCR inhibée, ce qui confirme l'hypothèse.

2 Expérience du laboratoire sur le plan logistique

2.1 Financement de l'achat de réactifs et du consommable

La plateforme biomoléculaire a été créée en réponse à l'écllosion de l'épidémie en Algérie afin de prendre en charge les besoins diagnostiques de la Wilaya de Tizi-Ouzou.

Cette dernière a été mise en place dans le laboratoire de recherche / Laboratoire d'Immunologie de l'UMMTO contenant d'emblée l'essentiel du plateau technique qui, néanmoins, nécessitait une mise en marche et une certification pour les PSM.

Le projet s'est rapidement heurté aux soucis financiers qui ont duré tout au long de son fonctionnement à ce jour.

Pour assurer sa survie et son indépendance, le laboratoire a fait appel à (aux) :

➤ Dons

De particuliers, de sociétés, laboratoires ou d'institutions publiques et privés, de dons de matériel, d'achats divers directement livrés au laboratoire (kits d'extraction et de détection du SARS-CoV-2 et consommable correspondant, sacs isothermes pour le transport des prélèvements, produits d'hygiène et de nettoyage) ou de paiement de factures proforma.

Chapitre II : Résultats et discussion

➤ Partenariats

Avec des industriels sous forme de contrats gagnant-gagnant, où l'industriel assure une partie du financement du laboratoire, en contrepartie ce dernier assure, en cas de besoin le diagnostic de ces employés et une expertise sur la gestion locale de l'épidémie.

Le partenariat gagnant-gagnant a rapidement prouvé son bénéfice à tous les niveaux et pour tous les protagonistes :

- ✓ Amélioration de la cadence globale du laboratoire qui est passée de 44 prélèvements/jour à 140 prélèvements/05 heures en apportant un extracteur automatique et un deuxième thermocycleur. Ceci a permis notamment de consacrer une partie du plateau technique aux urgences qui voient les résultats être prêts dans les 03 heures suivant la réception.
- ✓ Amélioration de l'environnement de travail et du sentiment de bien-être du staff technique en mettant à disposition une quantité suffisante de matériel de protection, d'hygiène et de nettoyage ainsi que des repas de qualité en particulier pendant les périodes de forte cadence.
- ✓ Assurer pour le partenaire industriel le maintien de l'activité des usines grâce au suivi cibler des cas suspects/contacts, prélèvement du personnel sur-site ou au niveau du laboratoire au besoin et un rendu rapide des résultats.
- ✓ Suivi des cas positifs jusqu'à négativation de leurs PCR ainsi que la dispensation de toute information utile pour le maintien de l'activité industrielle et de la bonne santé de la personne infecté ou non.

➤ Prêts et Troc

Le laboratoire a bénéficié de Prêts d'instruments (Mini-centrifugeuse, kits de calibration pour AB7500 ainsi que de petits matériel de laboratoire comme des micropipettes et des pipettes semi-automatiques qui ont été rendu à la demande du prêteur.

Le troc a permis d'échanger avec divers laboratoires des biens non utilisables par leurs équivalents adaptés au matériel sur place comme les tubes optiques de 0.1 ml adaptés au RotorGene en échange de ceux à 0.2 ml adaptés à l'AB7500.

➤ Le recyclage et la revalorisation

Ont été le pivot de la politique de gestion logistique du laboratoire, en utilisant du matériel connu d'emblée comme récupérable (verre, métal, certains plastics, tissus) puis d'évaluer la recyclabilité d'autres au titre des plaques et tiges du Biocomma M32.

La revalorisation a été appliqué aussi bien au réactif qu'au matériel de protection ex :

Chapitre II : Résultats et discussion

- Utilisation des réactifs d'extraction restant d'un kit pour augmenter le nombre de tests avec un autre kit d'une autre marque après avoir prouvé l'interchangeabilité.
- Utilisation des surblouses qui ne sont plus utilisables comme tissus d'essuyage.

3 Impact financier de l'expérience technique

La politique de gestion basée sur la valorisation a permis au laboratoire maintenir son activité en résistant aux chocs produits par les pics épidémiques et les ruptures d'approvisionnement en réactifs, consommable et matériel d'hygiène et de protection.

A titre d'exemple, pendant le Pic Octobre-Décembre, les économies découlant de l'optimisation des étapes d'extraction et d'amplification sont évaluées par réaction sont comme suit :

Tableau 11 : Impact des améliorations technique sur le plan financier.

Article	Prix unitaire (DZD)	Prix après optimisation (DZD)
01 extraction sur Biocomma M32	1100	275
01 Amplification SANSURE BIOTECH	2500	625
Consommable à usage unique	100	100
Total / réaction	3700	1000
Total /Période d'étude	22.3 Millions de DZD	6Millions de dinars
Economies sur le diagnostic	16.3 Millions de Dinars	

4 Etude statistique

4.1 Contexte global de l'étude

Pour les caractères : âge, comorbidités, symptômes sont étudiés que pour la période du 24/08/2020 au 31/12/2020. (En raison du manque d'informations durant la période du 01/04/2020 au 23/08/2020).

Entre la période du 01/04/2020 et le 31/12/2020, nous avons totalisé 12079 demandes de PCR réparties sur la population comme suit :

Chapitre II : Résultats et discussion

4.1.1 Répartition de la demande en tests PCR selon les caractéristiques démographiques

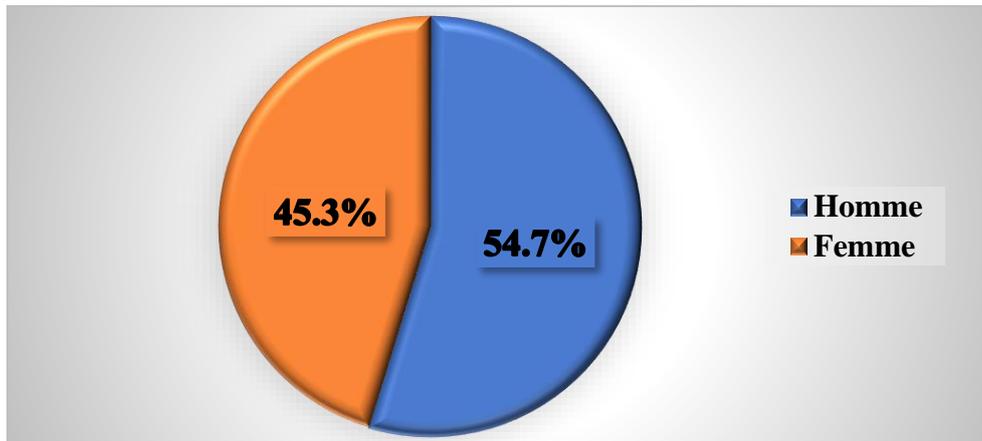


Figure 56: Répartition de la demande en tests PCR selon le sexe (N=12079).

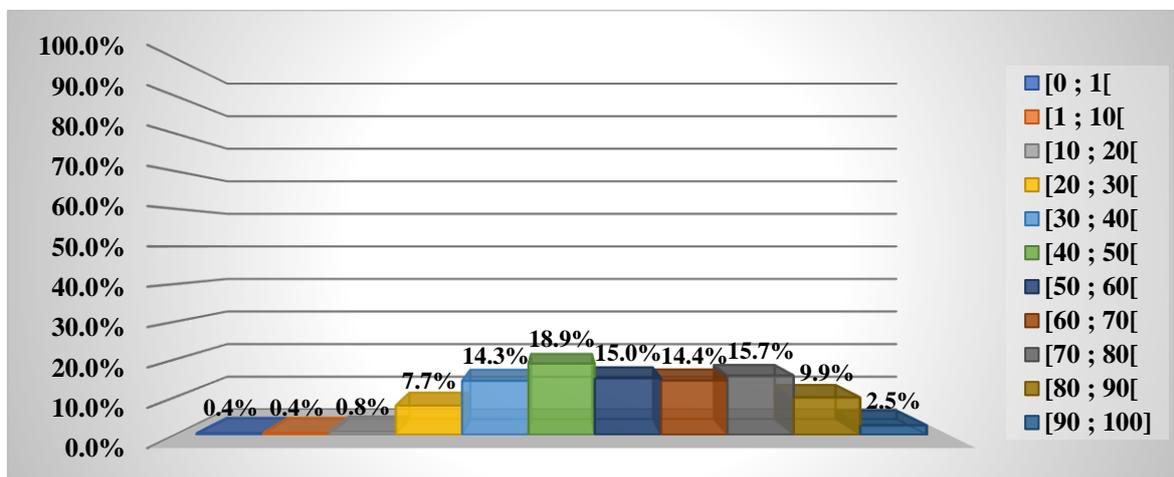


Figure 57 : Répartition de la demande en tests PCR selon l'âge (N=6021).

Les hommes représentaient 54.7% de la demande totale en tests PCR, avec un sexe ratio de 1.18.

Parmi l'ensemble des sujets, on retrouvait 57,5% de sujets de plus de 50 ans, avec un âge moyen de 55.8 ans.

Chapitre II : Résultats et discussion

4.1.1.1 Pyramide des âges/sexe :

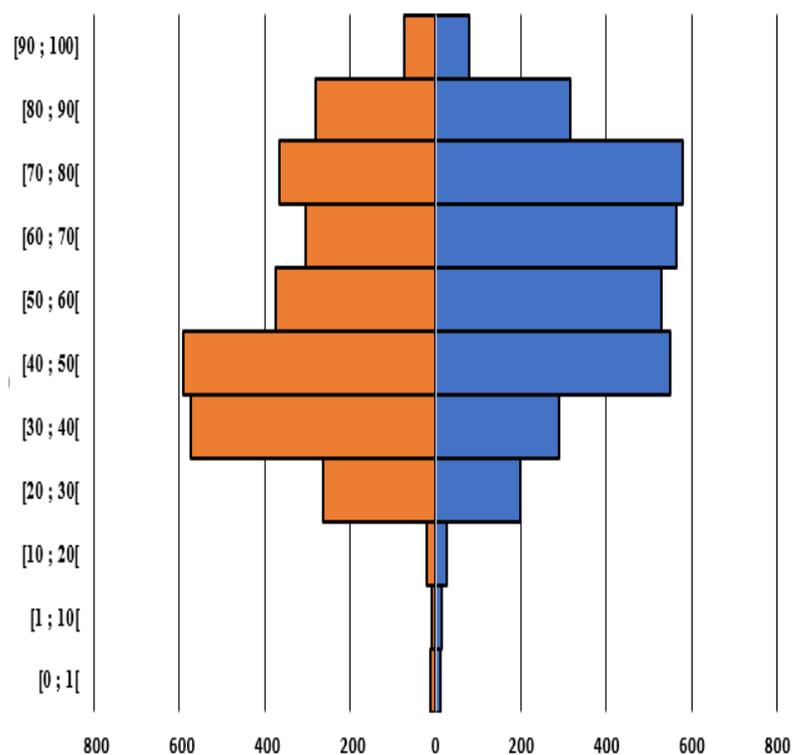


Figure 58 : Répartition des demandes en tests PCR selon l'âge et le sexe (N=6021)

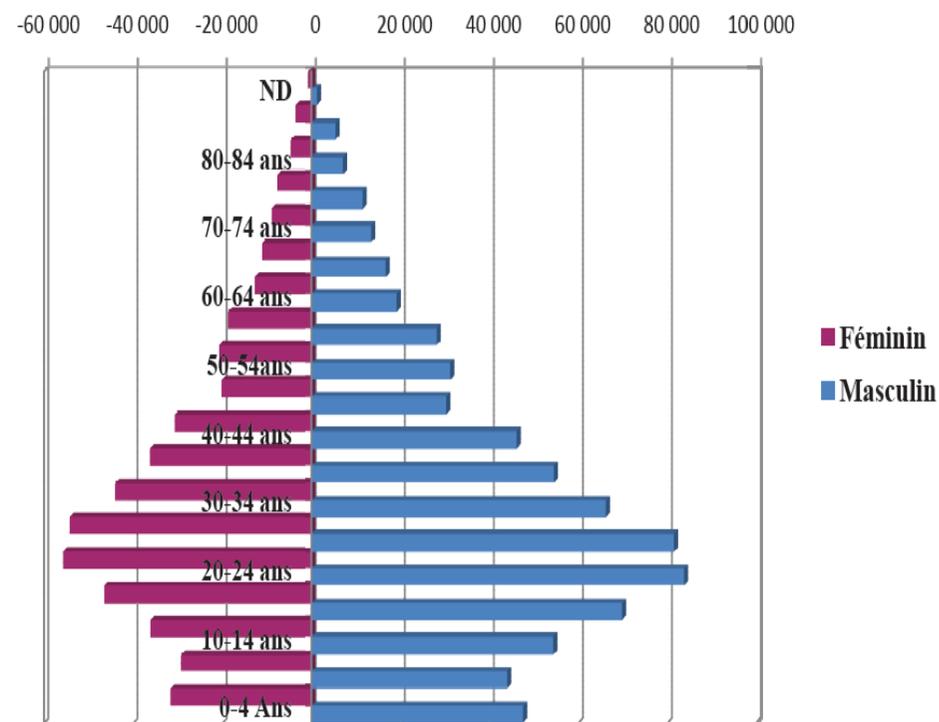


Figure 59 : Pyramide âge/sexe de la population de la WTO en 2018 (N=1 191 753).

Chapitre II : Résultats et discussion

Rapporté à la pyramide des âges nous observons une distribution inversée entre la population concernée par les tests PCR et la population générale.

Chapitre II : Résultats et discussion

4.1.2 La provenance

Le laboratoire traite l'ensemble des prélèvements provenant de la WTO et des régions limitrophes (voir chapitre circuit de prélèvements).

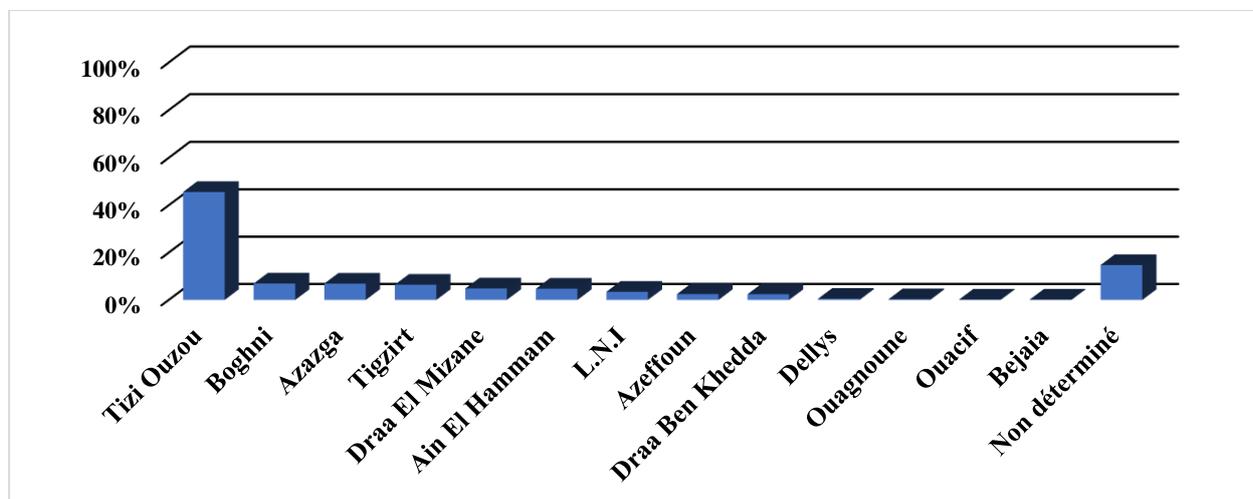


Figure 60: Répartition des demandes en tests PCR selon la région de provenance (N=12079).

Nous remarquons que globalement, la demande est superposable à la population des différentes régions (les régions à population effectuent le plus de demandes en tests PCR), à quelques exceptions près, c'est l'exemple de la daïra de DBK qui enregistre une demande faible (2.5%) comparée à sa population (4^{ème} en termes de densité).[205] Ceci peut être expliqué par la proximité de cette dernière de la commune de Tizi-ouizou où est le CHUTO. Au contraire, la Daïra de Tizirt (malgré sa densité faible) [205], a une demande comparable à celle de grandes daïra comme Azazga et Boghni.

4.1.3 Services

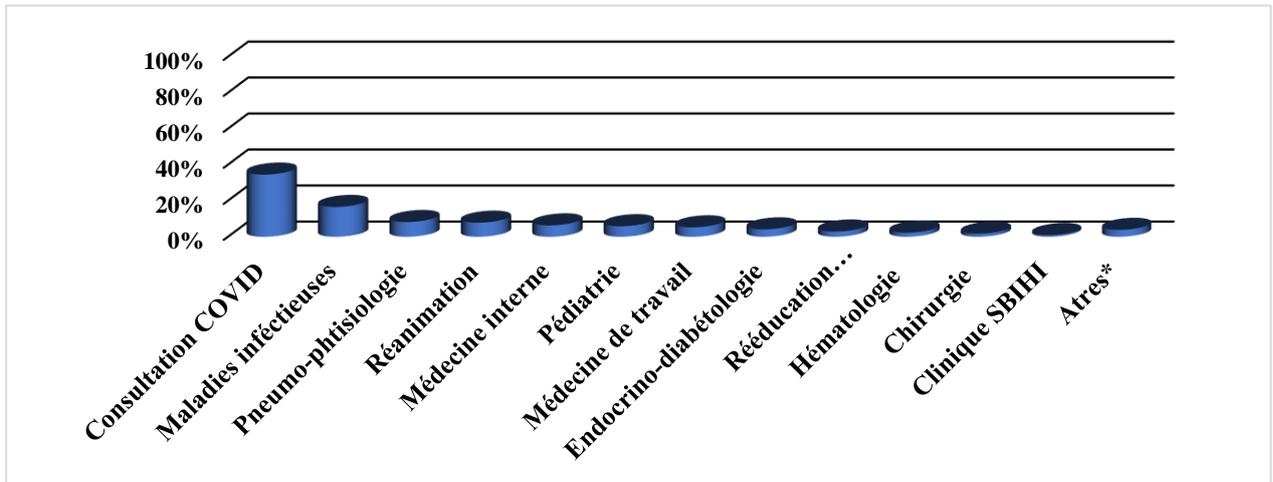


Figure 61: Répartition des demandes en tests PCR selon le service (N=5517).

Autres* : cardiologie, traumatologie, urologie, néphrologie.

NB : clinique SBIHI est une clinique spécialisée en gynécologie-obstétrique.

La demande provient principalement des services qui ont été dédiés à la prise en charge de l'épidémie à savoir la consultation COVID, maladies infectieuses, pneumologie et réanimation.

D'autres services ont été par la suite dégagés pour prendre en charge le nombre grandissant de cas comme la rééducation fonctionnelle et l'endocrinologie.

A noter qu'un nombre non négligeable (8.64%) de tests PCR a été effectué à la demande (dépistage systématique) avant certains actes médico-chirurgicaux (hématologie, chirurgie, Clinique sbihi ...).

Chapitre II : Résultats et discussion

4.2 Etude des résultats des tests PCR

4.2.1 Evolution de la demande en tests PCR dans le temps

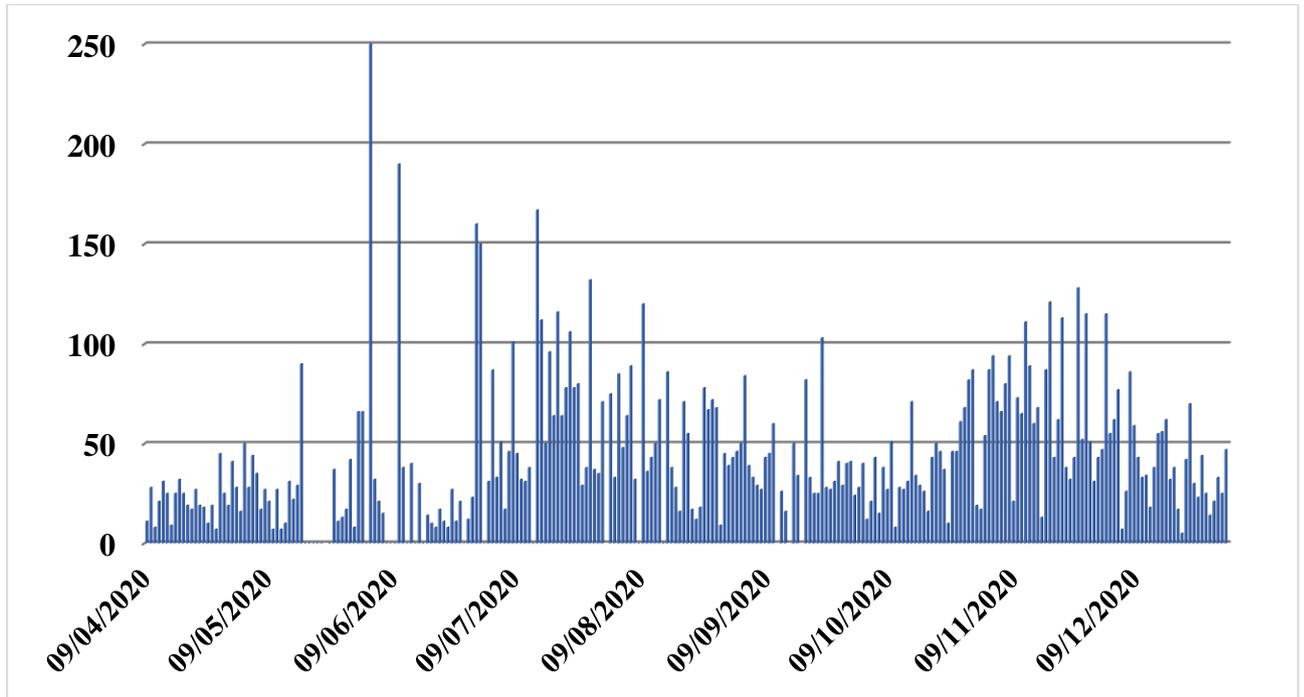


Figure 62 : Évolution de la demande en tests PCR dans le temps (N=12079).

La figure montre que l'activité est passée par deux périodes d'activité intense comprises entre le début Juin-fin Août ($\bar{X}=56$ prélèvements/jour) puis de fin Octobre-fin Décembre ($\bar{X}=55$ prélèvement/jour) correspondant aux pics de consultation et d'hospitalisations liées à la COVID-19.

Chapitre II : Résultats et discussion

4.2.2 Evolution du nombre de positifs et des taux de positivité

4.2.2.1 Evolution globale

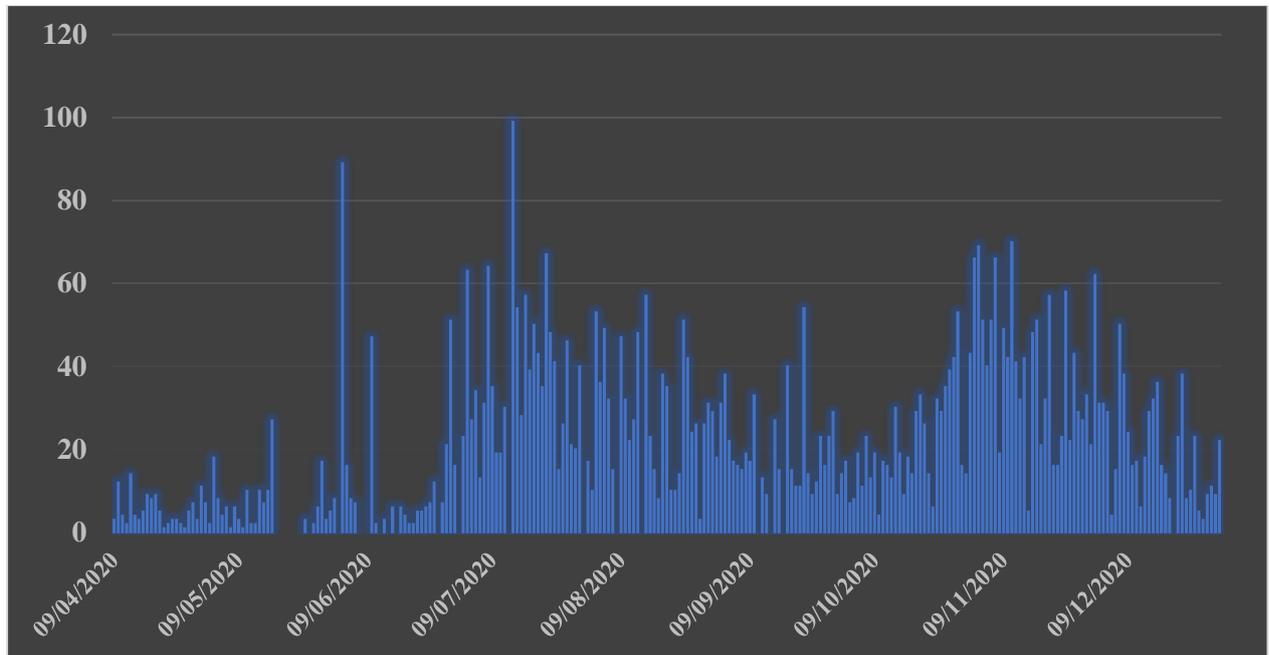


Figure 63:Évolution du nombre de positifs par jour (N=5905).

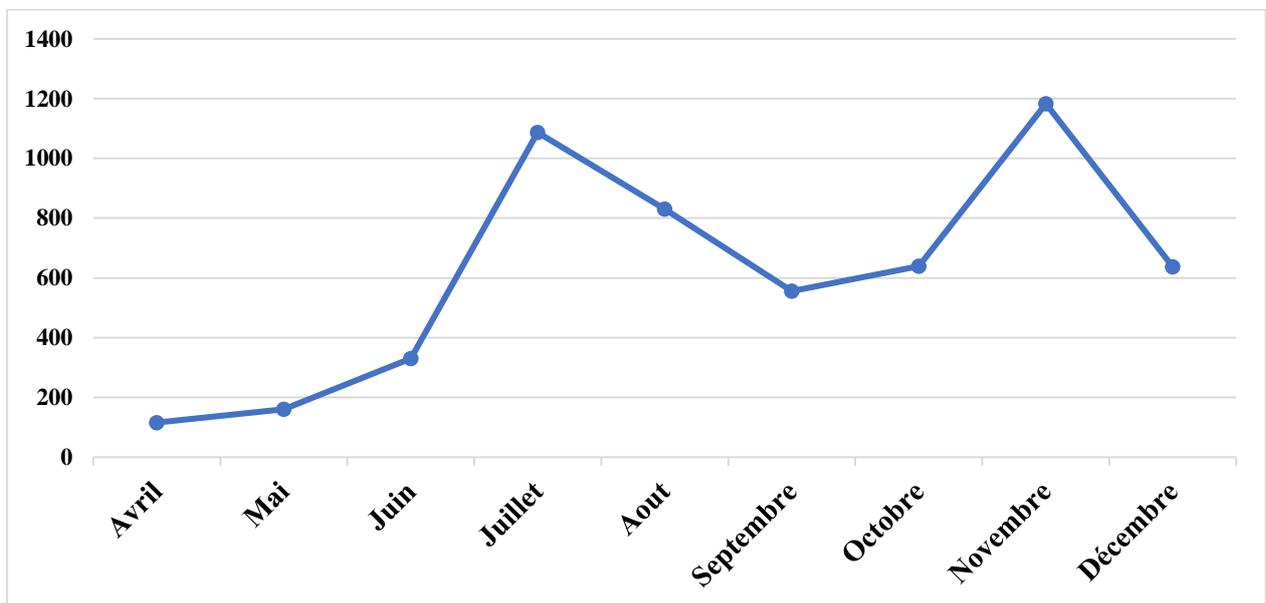


Figure 64: Évolution du nombre de positifs par mois (N=5905).

Ces paramètres évoluent de manière parallèle à la demande en tests PCR : ils sont passés par deux pics celui du mois de Juillet (\bar{X} =37 positifs/jour avec un pic à 81% de taux de positivité) et du mois de novembre (\bar{X} =39 positifs/jour avec un pic à 90% de taux de positivité).

Chapitre II : Résultats et discussion

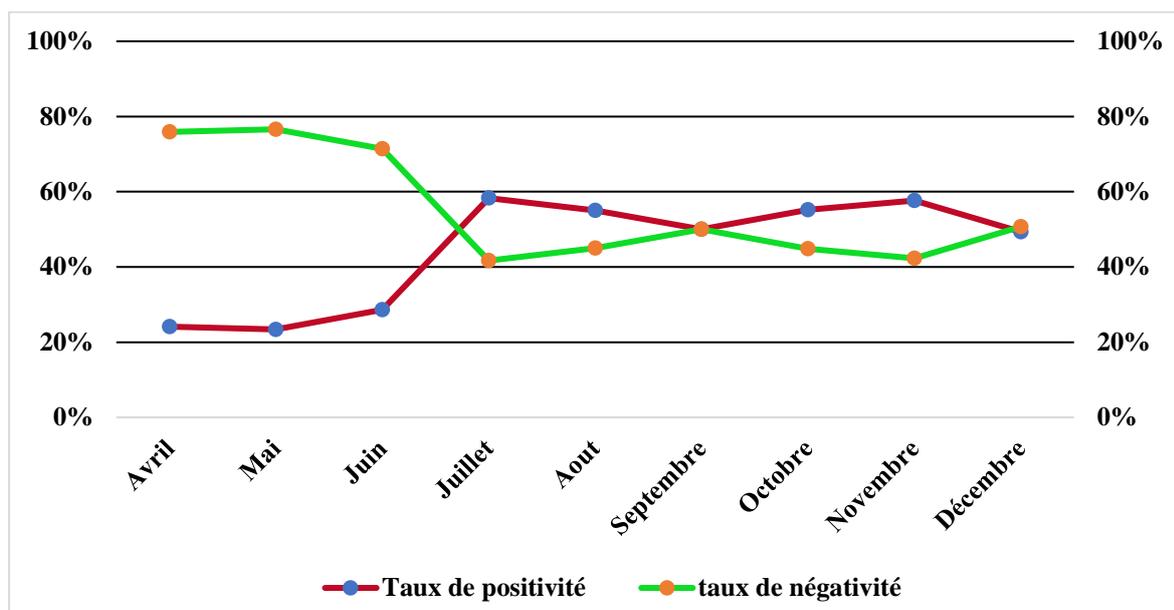


Figure 65: Évolution des taux de positivité et de négativité par mois (N=12079).

Nous remarquons que les taux de positivité et de négativité évoluent de manière inversée en fonction du temps et de la position par rapport au pic de cas : augmentation progressive du taux de positivité avant le pic, atteint un maximum lors du pic avant de se stabiliser puis de diminuer après le pic. La tendance inverse est observée pour le taux de négativité.

L'ensemble des paramètres étudiés ci-après sont abordés indépendamment du temps (sans tenir compte des différences entre la période du pic et celle hors pic).

4.2.2.2 Répartition des cas positifs selon les caractéristiques démographiques

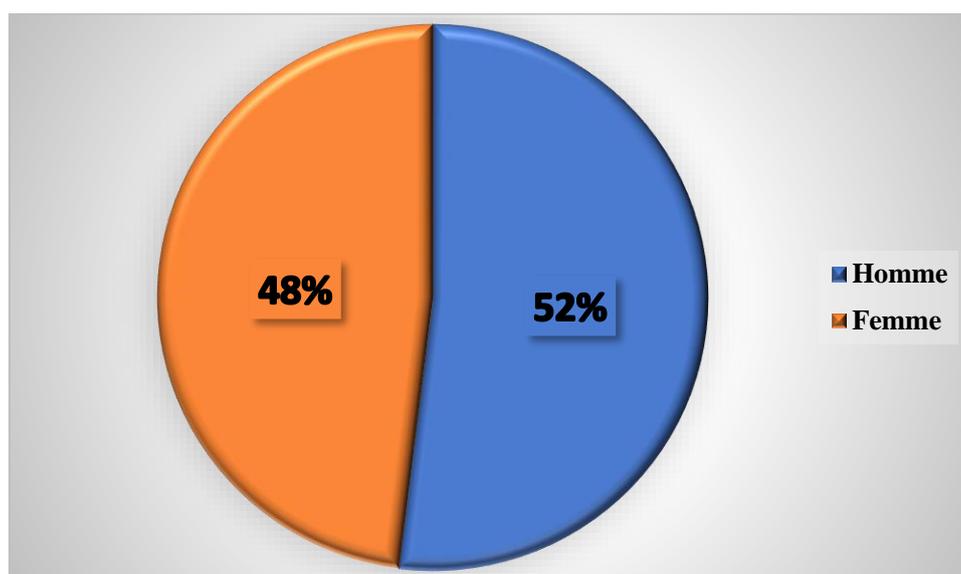


Figure 66: Répartition des cas positifs selon le sexe (N=5905).

Chapitre II : Résultats et discussion

Les hommes représentent 52% des positifs contre 48% chez les femmes, Avec un sexe-ratio égale à 1.08.

Selon 32 études chinoises, il a été estimé que les hommes représentent 55% des positive contre 45% chez les femmes ce qui est comparable aux résultats trouvés dans notre étude. [206]

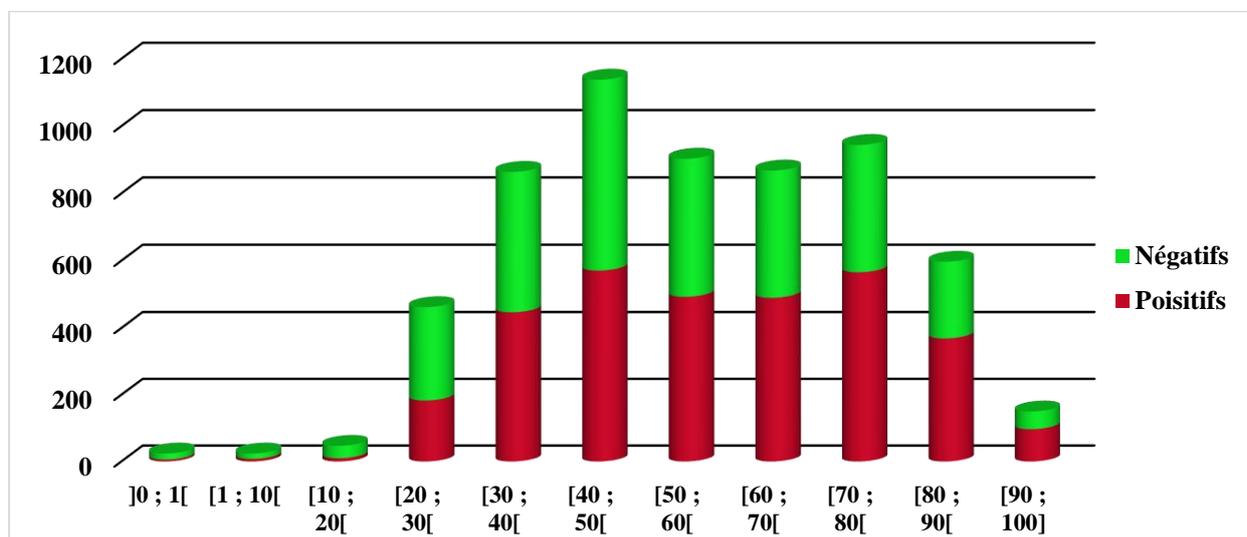


Figure 67: Répartition des cas positifs selon l'âge (N=3240).

L'âge moyen retrouvé chez la population positive est de 58.1 ans, avec 62.1% des sujets âgés de plus de 50 ans.

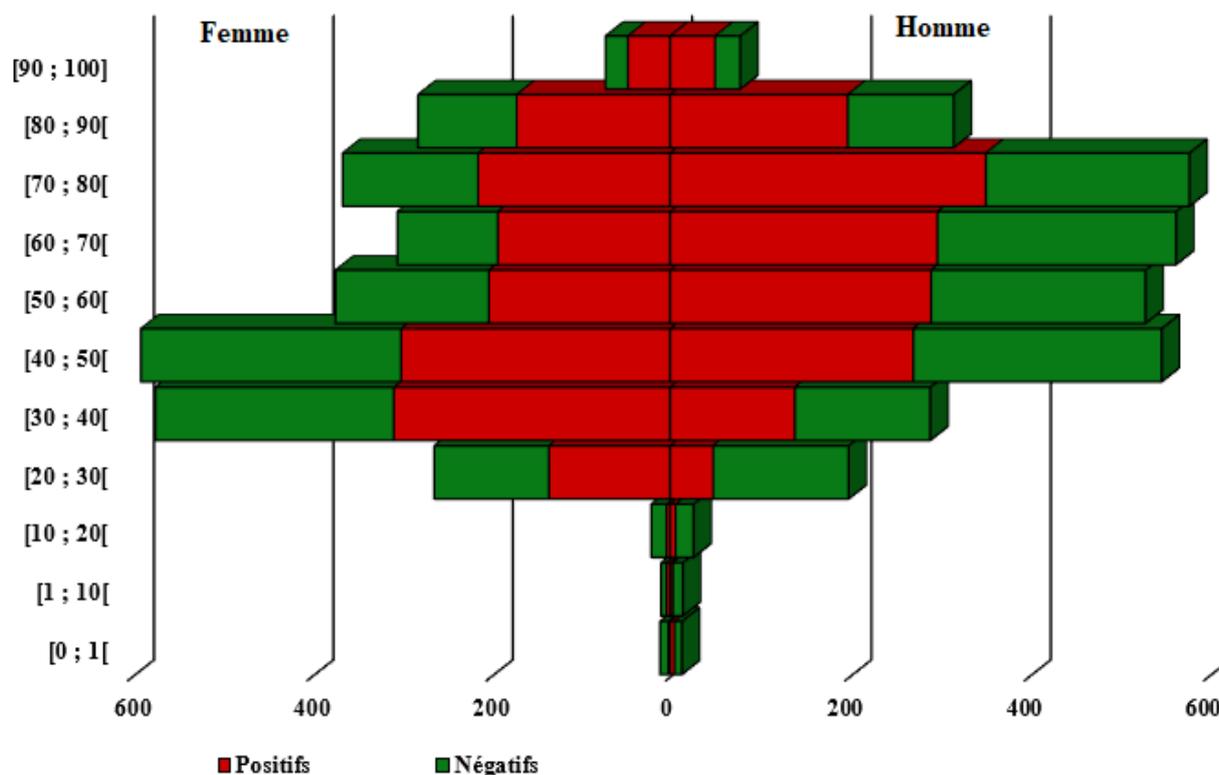


Figure 68: Répartition des cas positifs selon l'âge et le sexe (N=3240).

Chapitre II : Résultats et discussion

L'âge moyen de positivité est de 54.7 ans chez les femmes et de 61.3 ans chez les hommes.

Un total de 24 études a été inclus dont 20 études provenaient de Chine, 02 des États-Unis, 01 d'Italie et 01 de France, l'âge moyen de positive est de 52,4 ans chez les femmes et de 64.1 ans chez les hommes, ces résultats sont concordants avec notre étude (l'âge moyen des positifs est plus élevé chez les hommes que les femmes).[207]

Le taux de positivité est d'autant plus important que l'âge avance et ce chez les deux sexes.

4.2.2.3 Provenance

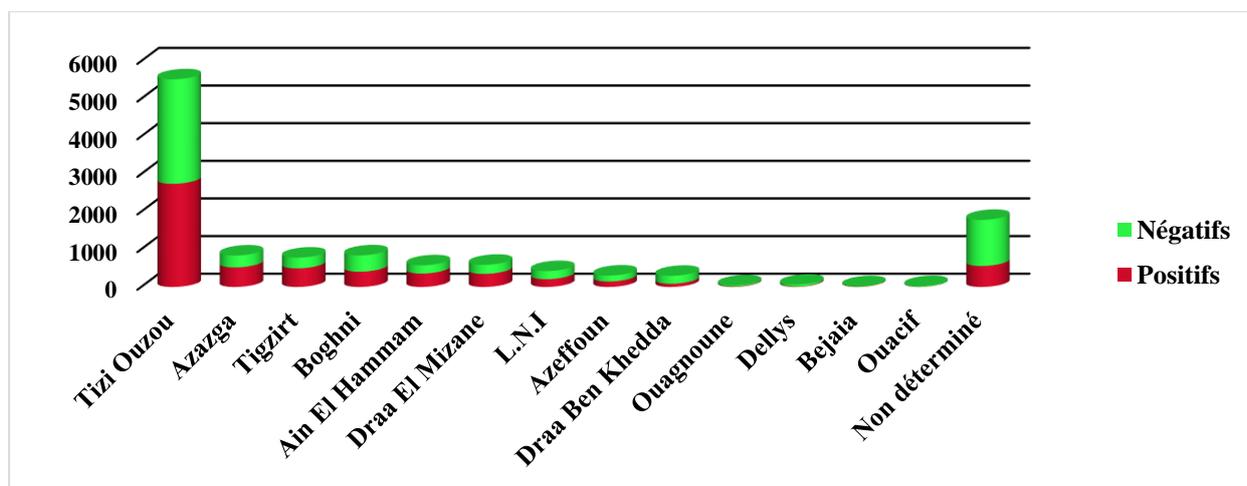


Figure 69 : Répartition des cas positifs selon la région de provenance (N=5905).

Elle suit globalement la demande, sauf pour la daïra de Tiggirt où le nombre de positifs est plus important.

4.2.2.4 Services

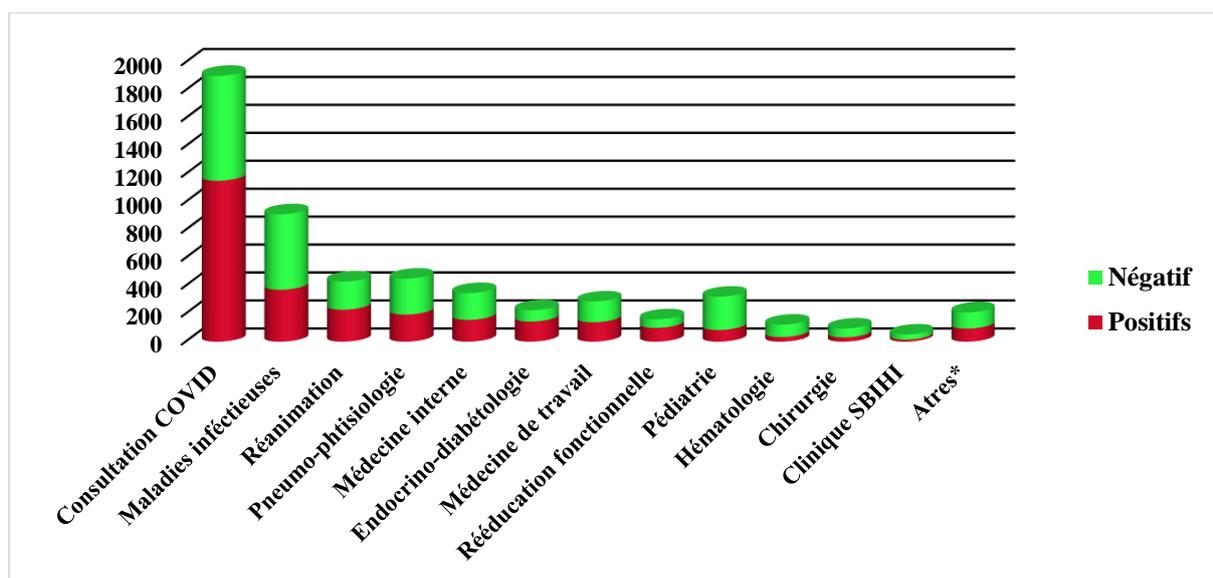


Figure 70: Répartition des cas positifs selon le service (N=2742).

Chapitre II : Résultats et discussion

Elle suit globalement la demande, hormis le service de pédiatrie (3% des cas positives) ainsi que les services de dépistage systématique où le nombre de positifs est très faible par rapport à la demande.

Des études chinoises ont confirmé ces résultats où le taux de positivité des personnes âgées de moins de 15 ans presetaient 2.1% des patients testés comme COVID-19 positifs.[208]

4.2.2.5 Selon les comorbidités associées

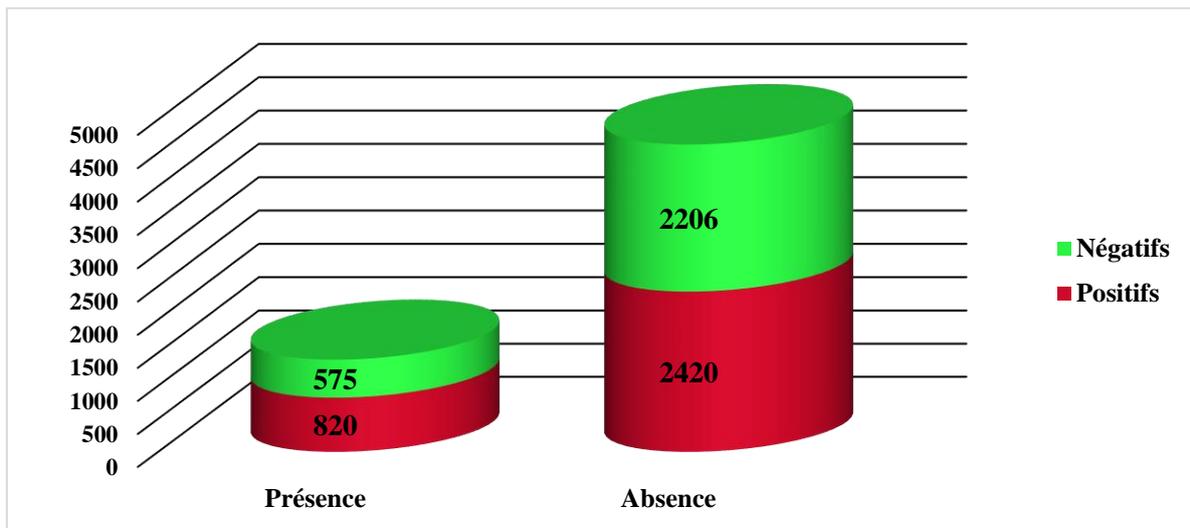


Figure 71 : Répartition des demandes en PCR selon la présence ou l'absence d'une comorbidité associée et aussi selon les résultats de la PCR (N=6021).

Les sujets qui présentent des comorbidités représentent 23% des demandes en tests PCR dont 58.8% de ces derniers sont positive.

Chapitre II : Résultats et discussion

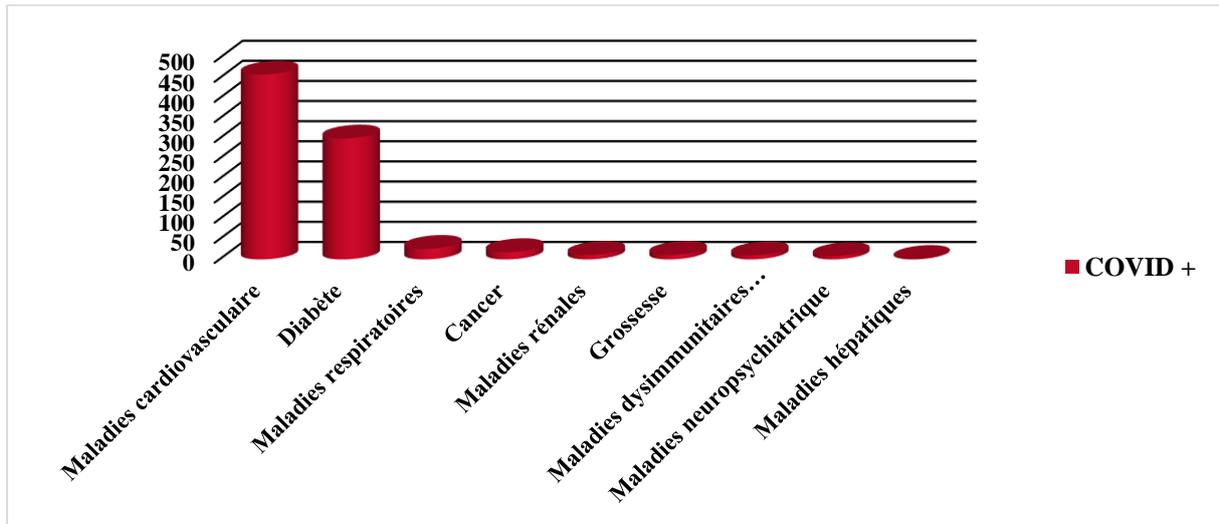


Figure 72: Répartition des comorbidités chez les cas positifs (N=820).

Les maladies cardiovasculaires et le diabète représentent 89.8% de l'ensemble des pathologies associées aux cas positifs (54.3% pour les MCV et 35.5% pour le diabète).

Pour les cas positive les MCV présentent 29% des maladie associé suivi du diabète de 11% (avec un total de 40% des maladies associés). [207]

4.2.2.6 Symptômes

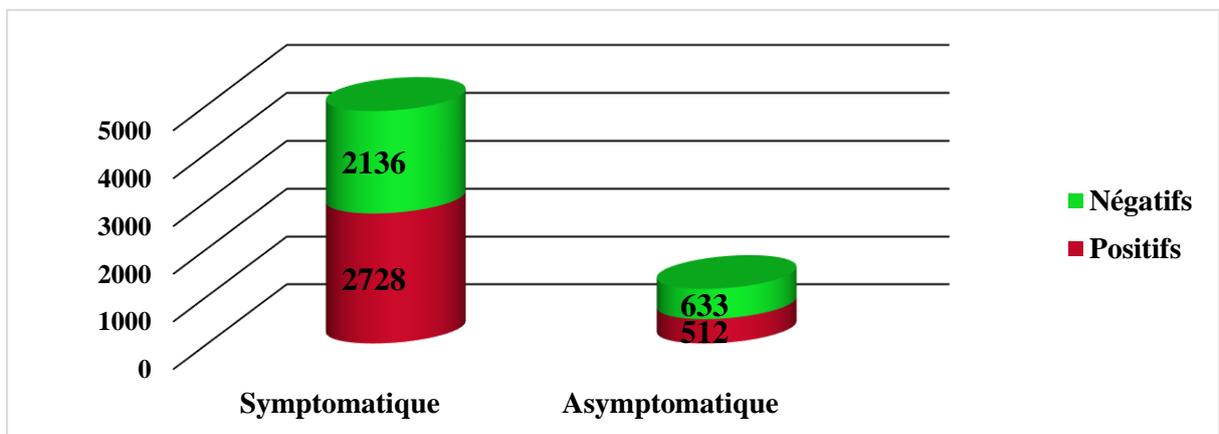


Figure 73 : Répartition des demandes de tests PCR selon la présence ou l'absence de symptômes associés (N=6021).

Parmi les cas positifs, les sujets asymptomatiques représentent 15.8%, à noter que « asymptomatique » regroupe aussi les individus n'ayant pas eu de fiche de renseignement remplie sur la plateforme du MSPRH.

Selon 136 études sur un total de 12713 patient testé positif, 15.1% était asymptomatique. [209]

Chapitre II : Résultats et discussion

Les sujets symptomatiques représentent 80% des demandes en tests PCR, ce qui est expliqué avec la politique de dépistage sélectif adoptée.

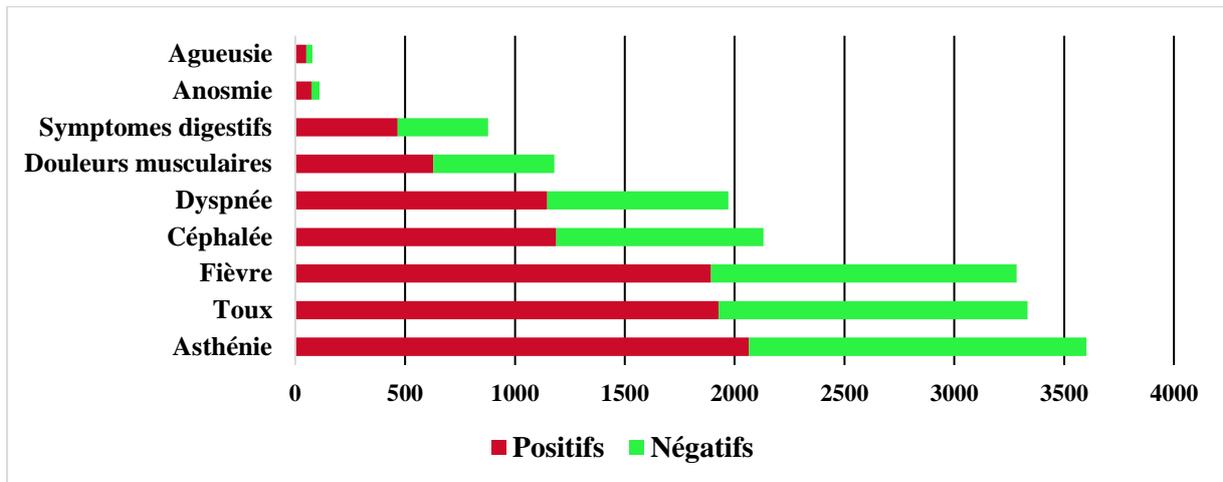


Figure 74: Répartition des sujets symptomatique selon le type de symptômes (N=4864).

La triade la plus retrouvée chez les positifs est l'association asthénie, toux et fièvre avec des taux de positivité de ces derniers est de 57.3%, 57.8% et de 57.6% respectivement. Il est à noter que le taux de positivité chez les individus présentant une anosmie et/ou agueusie est plus important (68%).

Des études ont montré que la triade fièvre, toux et asthénie est toujours dominatrice, avec un pourcentage de 91.3% 67.7% et 51% respectivement, chez les cas positifs. [210]

L'asthénie et la toux sont proches de nos résultats tandis la fièvre, nous observons une discordance des résultats (91.1% contre 54% dans notre étude), ceci est dû au fait que la température n'est pas mesurée systématiquement, en particulier en ambulatoire.

4.2.2.7 Evolution du nombre de positifs en fonction de la différence entre la DDS et la DDD :

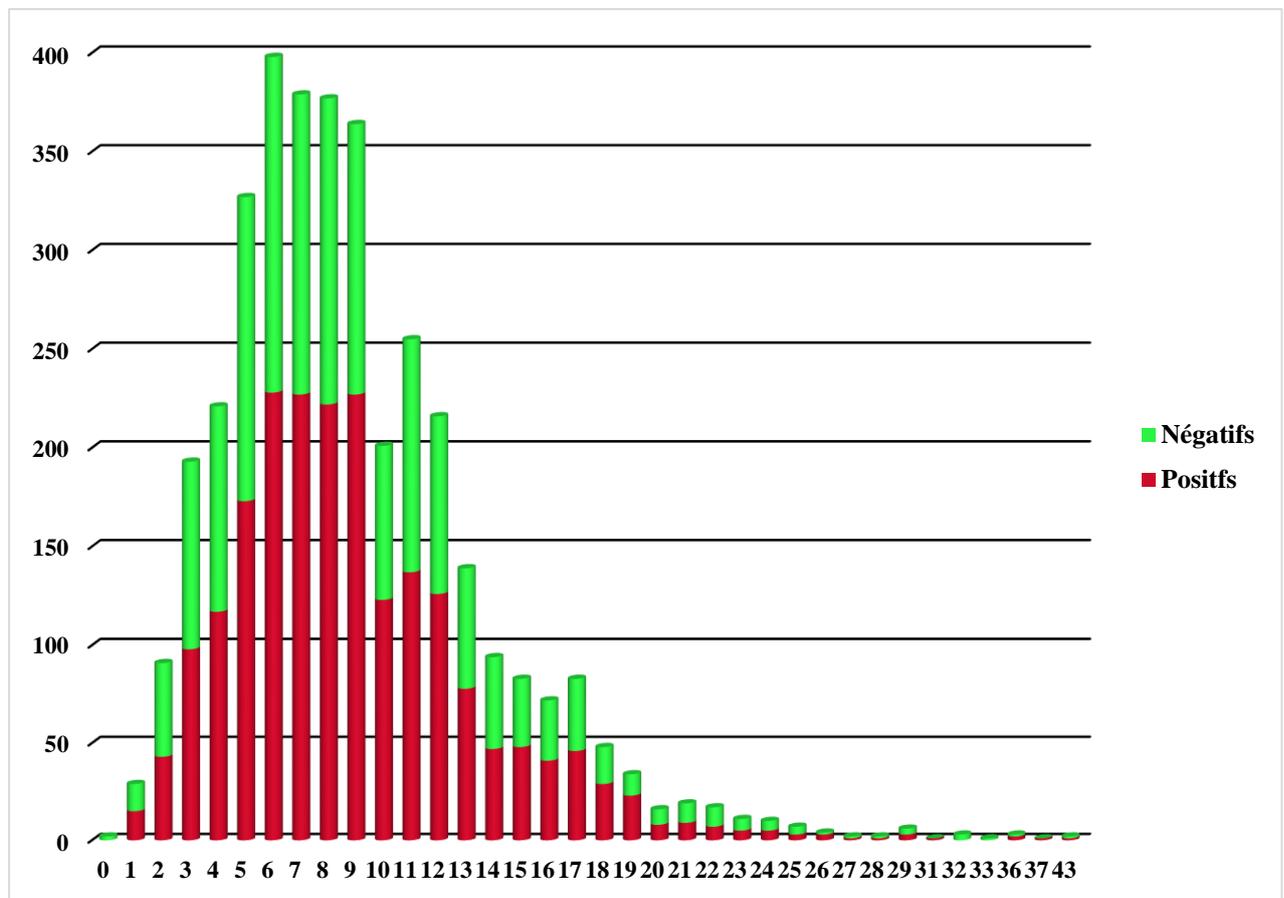


Figure 75 : Évolution des demandes en PCR selon la différence entre la DDS et la DDD.

Les patients consultent le plus souvent entre le 6^{ème} et le 9^{ème} jour avec une médiane de 08 jours.

4.3 Etude des décès

Durant la période du 24/08/2020 au 31/12/2020, nous avons analysé 192 prélèvements Post-mortem dont 149 entre le début et la fin du second pic épidémique.

4.3.1 Etude globale des décès

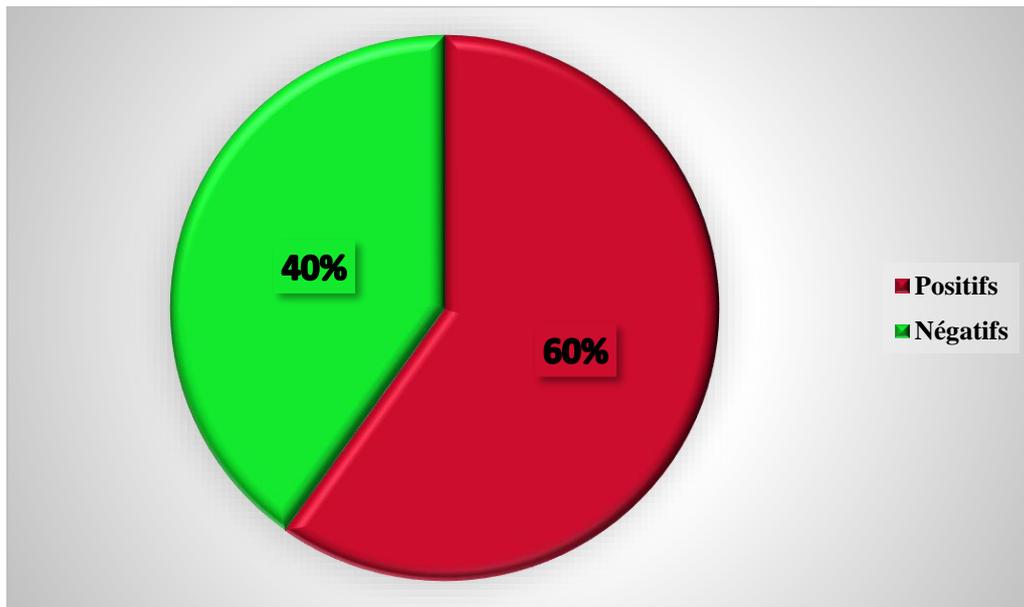


Figure 76: Taux global de positivité chez les sujets décédés (N=192).

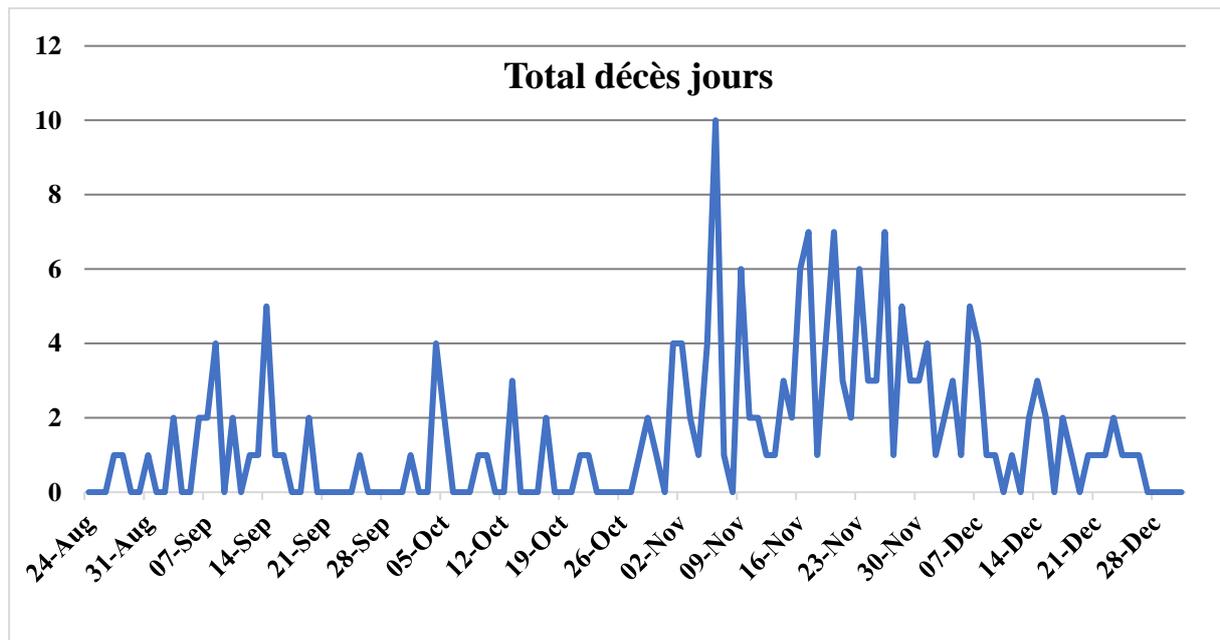


Figure 77 : Évolution du nombre total de décès par jour (N=192).

Chapitre II : Résultats et discussion

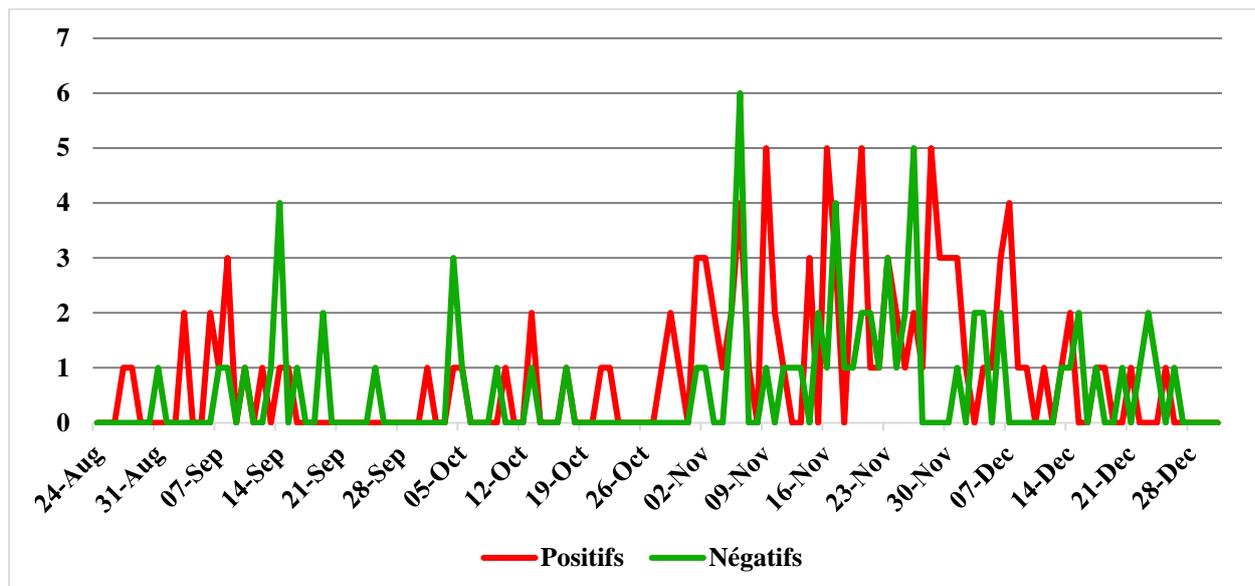


Figure 78: Évolution des décès COVID +/COVID - par jour (N=192).

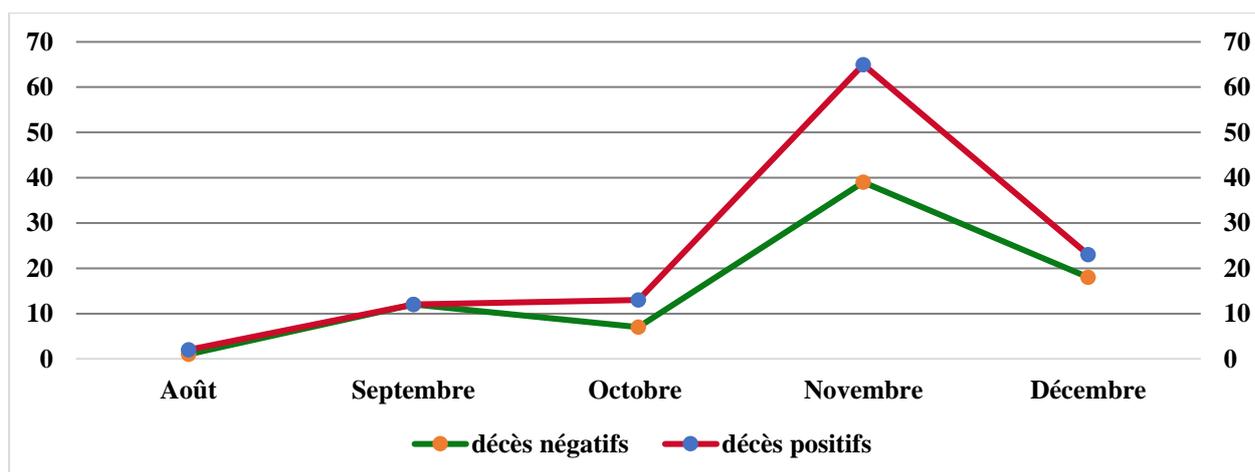


Figure 79 : Évolution des décès COVID +/COVID - par mois (N=192).

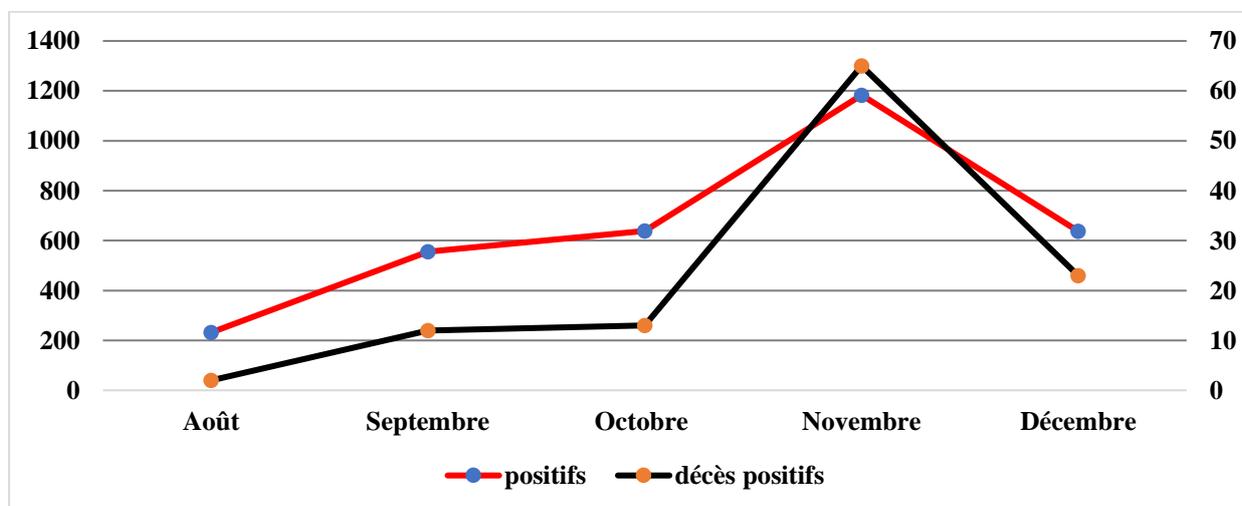


Figure 80: Évolution des cas positifs et des décès COVID + par mois.

Chapitre II : Résultats et discussion

Le taux global de positivité chez les patients décédés est de 60% soit 115 décès SARS-CoV-2 Positifs et 77 PCR négatives. Soit un ratio de létalité apparent de 3.5% (contre 2.6% à l'échelle nationale et 2.2% à l'échelle mondiale) [211]son évolution dans le temps est parallèle au taux de positivité de la population générale.

$$\text{Ratio de létalité apparent (CFR, en \%)} = \frac{\text{Nombre de décès dus à la maladie}}{\text{Nombre de cas confirmés}} \times 100$$

Cette différence pourrait être expliquée par la politique de diagnostic à large échelle dans les pays développés, mais pourrait aussi être due à une sous-estimation du nombre réel de cas positifs qui ne consultent pas.

4.3.2 Etude des décès selon les caractéristiques démographiques

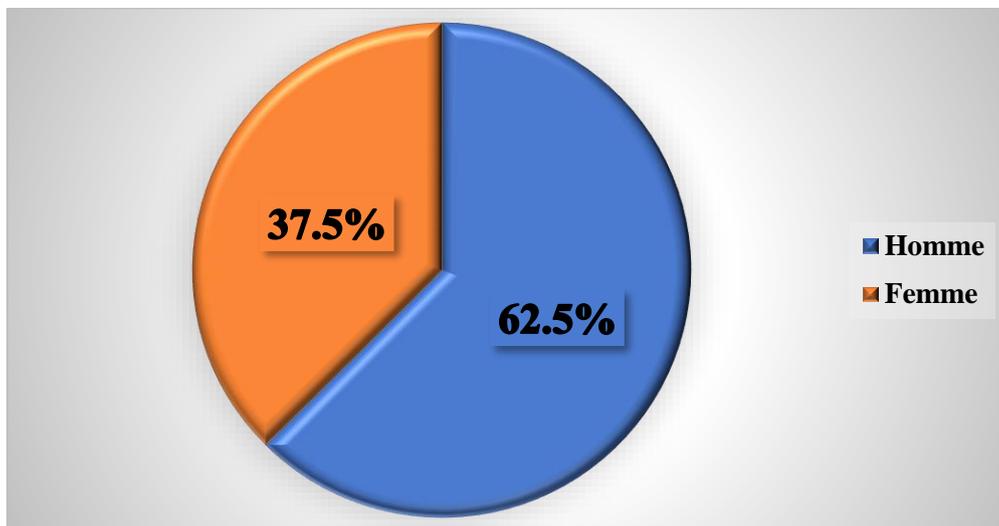


Figure 81: Répartition des décès COVID + selon le sexe (N=115).

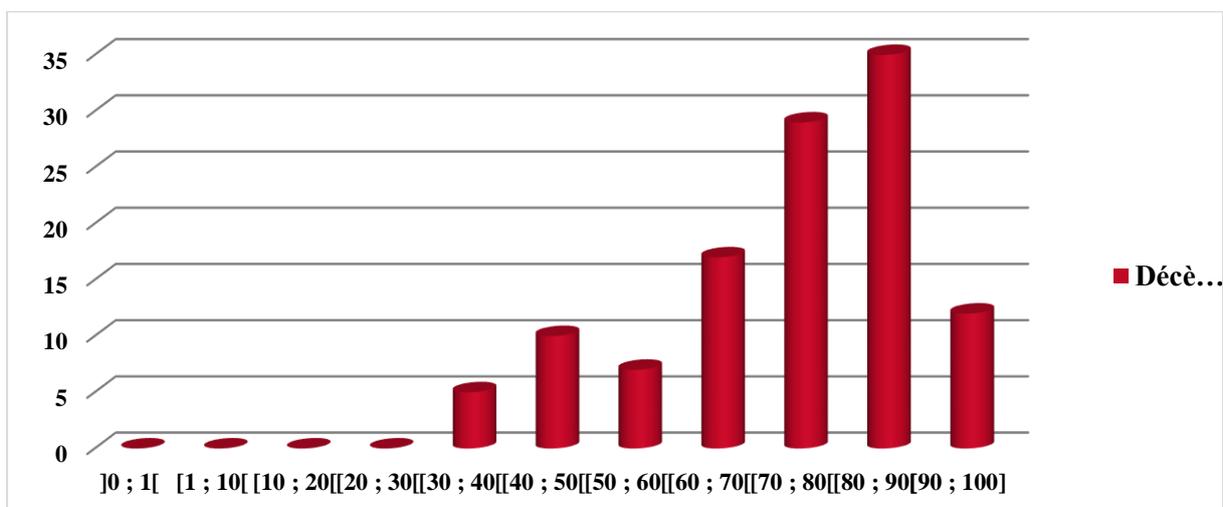


Figure 82: Répartition des décès COVID + selon l'âge (N=115).

Chapitre II : Résultats et discussion

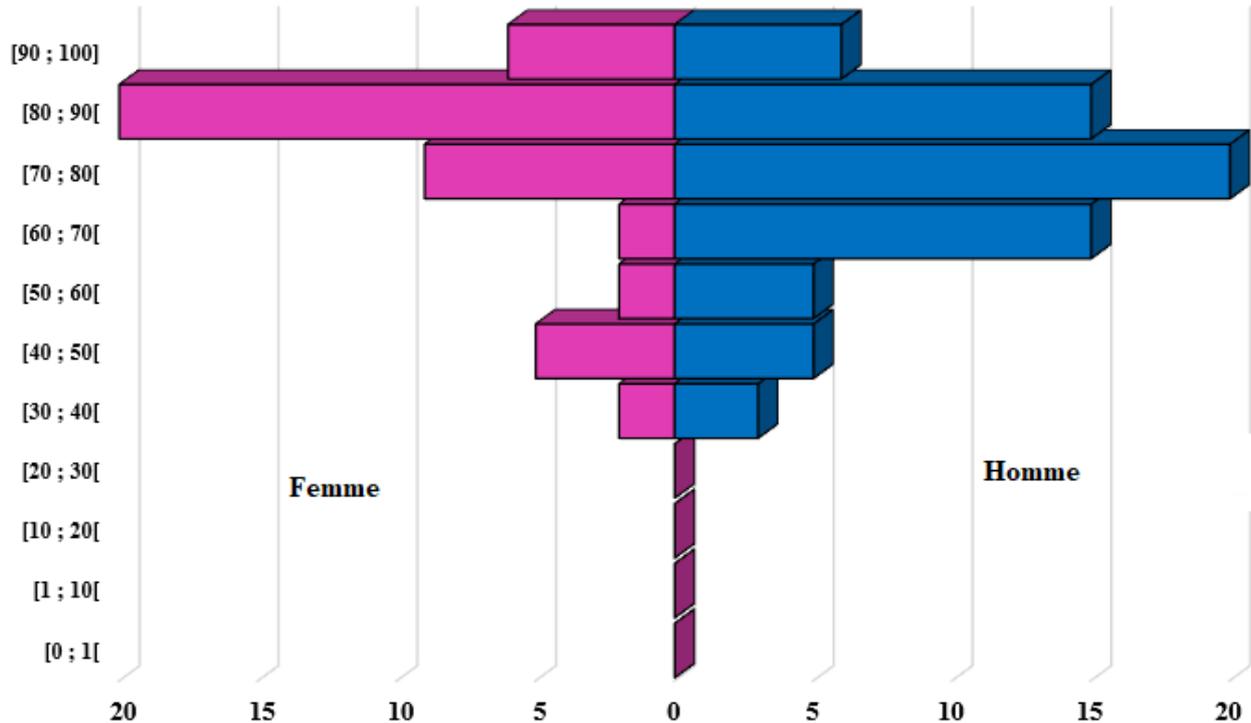


Figure 83: Répartition des décès COVID+ selon l'âge et le sexe (N=115).

Les patients décédés et confirmés COVID+ avaient un âge moyen de 73.5 ans (avec des extrémités entre 30 et 100 ans).

On observe que 50% des décès COVID+ ont plus de 75 ans et 73% ont plus de 65 ans.

Selon le sexe l'âge moyen est de 75.6 ans chez les femmes et de 71.4 ans chez les hommes, avec un sexe-ratio de 1.5.

Le taux de létalité apparent par sexe est de 3.1% chez le sexe féminin et de 4.2% chez le sexe masculin.

Selon 70 études dont le total de décès est de 214 361, le taux de létalité pour les hommes et les femmes étaient de 4,37% et 3,31% respectivement.[212]

Ces résultats confirment que les deux paramètres (sexe masculin et un âge supérieur à 65 ans) sont des facteurs de risque de mortalité dans la maladie COVID-19.

Chapitre II : Résultats et discussion

4.3.3 Provenance

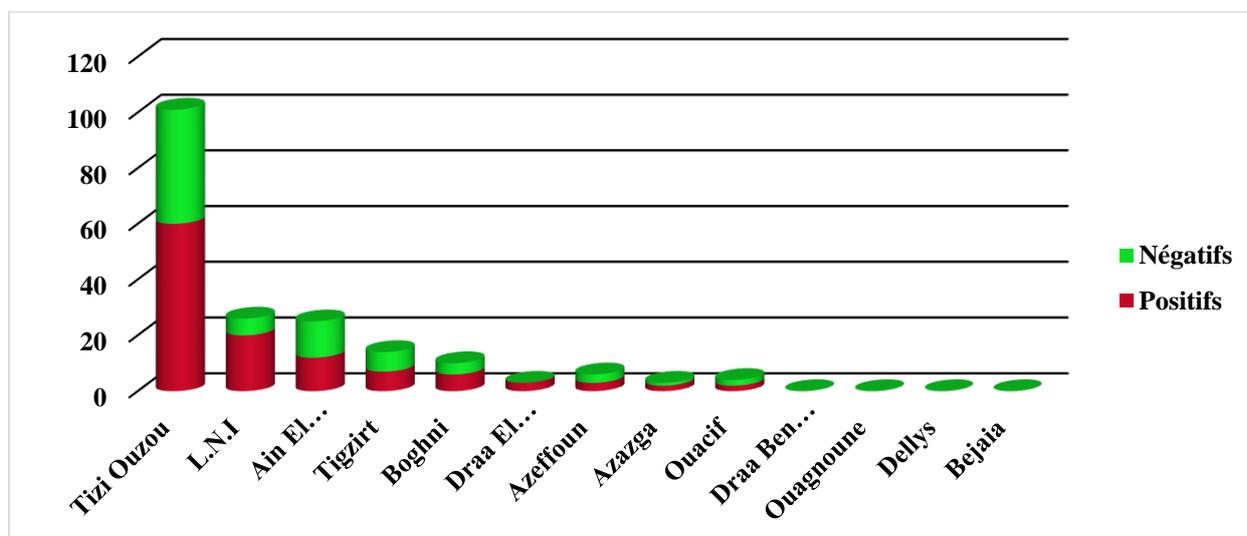


Figure 84 : Répartition des décès selon la région de provenance (N=192).

Après la daïra de Tizi-ouzou, Les daïras de LNI et de AEH ont enregistré le plus de décès suivis de Tizirt et de Boghni.

Azazga en revanche malgré un nombre élevé de positifs a enregistré un nombre faible de décès.

En matière de taux de létalité apparent, LNI a enregistré le taux le plus élevé avec 9.6% suivi de AEH 3.3% et Tizi-ouzou 2.1%. Azazga a eu le taux le plus faible avec 0.3%.

4.3.4 Services

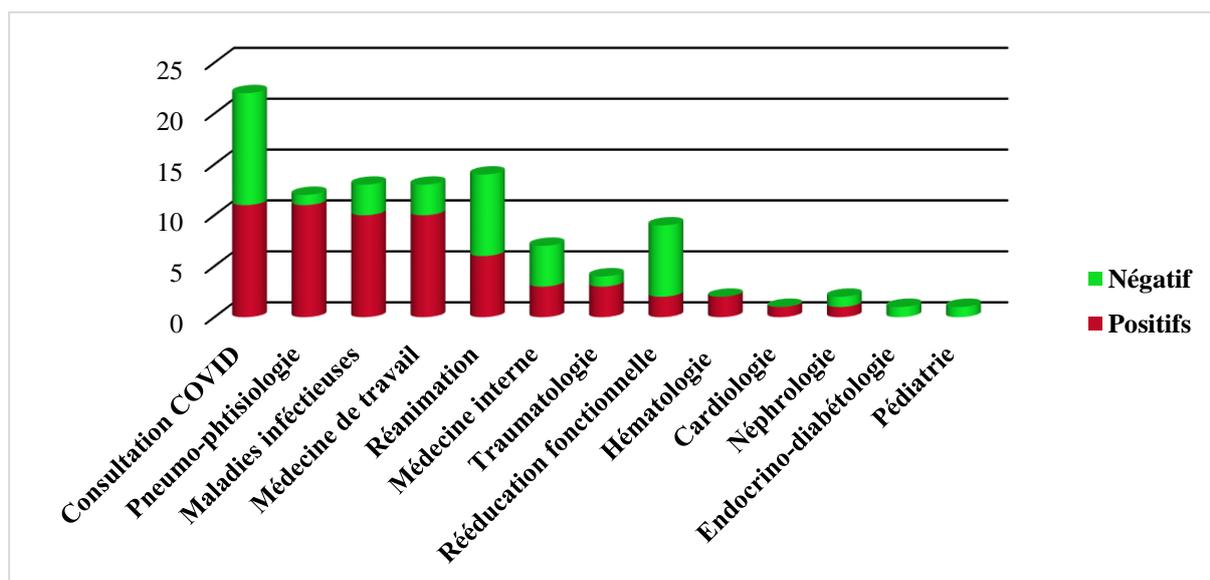


Figure 85 : Répartition des décès du CHUTO selon le service (N=101).

4.3.5 Comorbidité

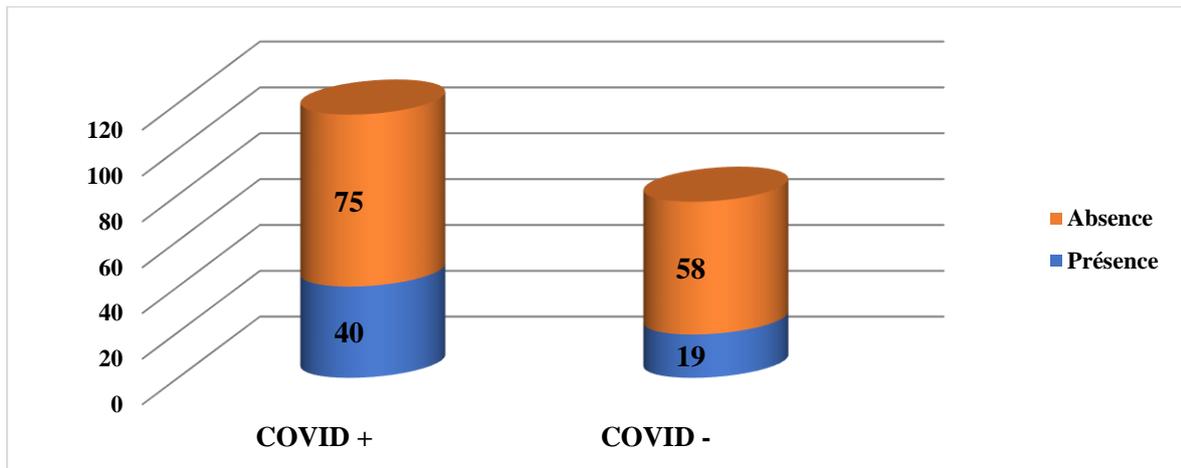


Figure 86 : Répartition des décès COVID +/COVID - selon la présence ou pas d'une comorbidité associée (N=192).

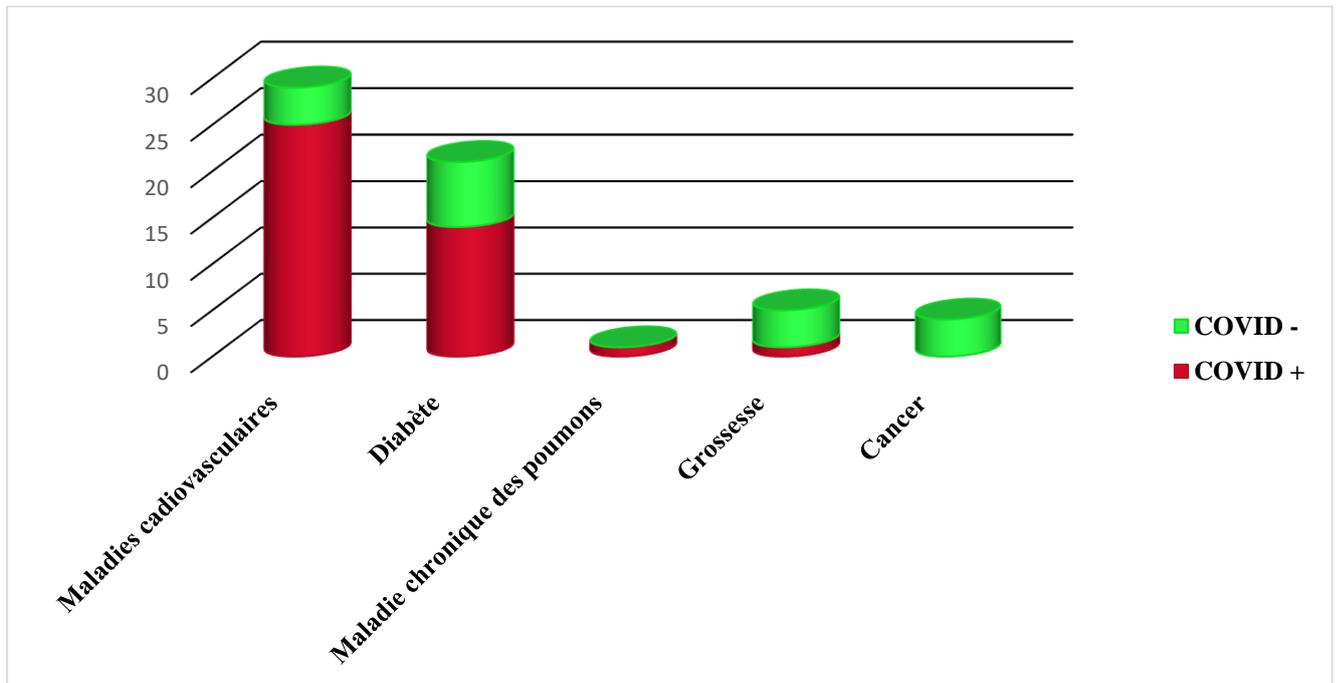


Figure 87 : Répartition des décès selon le type de comorbidité associée (N=59).

Chez les patients COVID + les pathologies associées sont retrouvées dans 35% des cas contre 25% chez les négatifs.

La pathologie qui se distingue le plus chez les décès COVID+ reste la pathologie cardiovasculaire suivi du diabète.

4.3.6 Symptômes

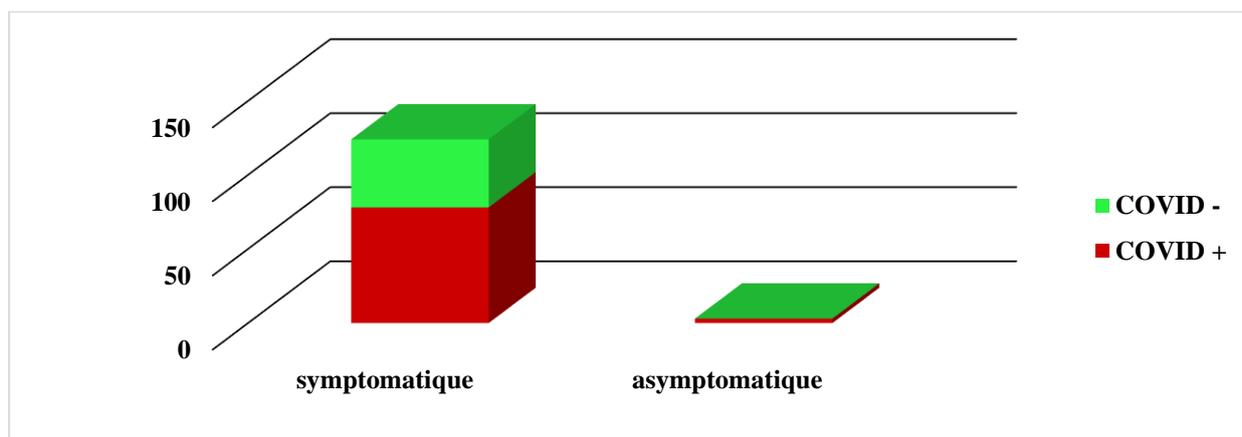


Figure 88 : Répartition des décès selon la présence ou pas de symptômes associés (N=192).

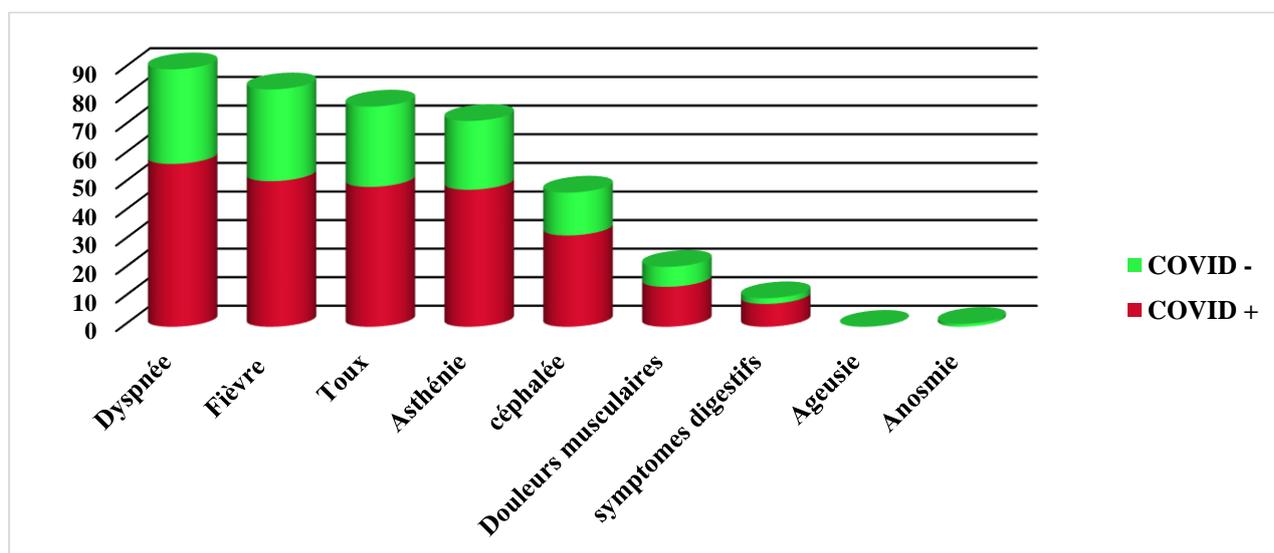


Figure 89: Fréquence de symptômes présents chez sujets décédés (N=124).

Les patients décédés ont été le plus souvent hospitalisés pour une dyspnée fébrile (conclusion : mortalité par SDRA)

Le dépistage des décès n'est pas systématiquement mais est à l'appréciation du médecin réalisant le constat de décès ; selon l'arrêté interministériel du 13 ramadan 1441 /06 mai 2020 relative aux prescriptions applicable au transport et l'inhumation des dépouilles des défunts dont le décès est lié à l'infection par le Coronavirus, **article 5.[213]**

Ces symptômes sont autant retrouvés chez les décès PCR négative faisant penser à :

- Le patient été positif mais il a été diagnostiqué en phase immunologique/lésionnelle (non détecté par PCR).

Chapitre II : Résultats et discussion

- L'augmentation de la prescription des dépistages post mortem de la COVID-19 suite à l'augmentation globale de l'incidence de la maladie durant le second pic.

Il est à noter que 2.6% (3 décès) ont été COVID+ mais asymptomatiques et 29% (n=34) n'ont pas vu leurs fiches de renseignement saisie sur la plateforme du MSPRH.

04 études (N= 7031) ont démontré que 67.3% des patients hospitalisé pour une forme sévère puis décédé par le SARS-CoV-2 présentaient une dyspnée.[214]

4.4 Etude de la corrélation entre la charge virale estimée par les Cts, la demande en tests PCR et le nombre de positifs



Figure 90: Hypothèse de la corrélation entre la baisse des Ct et l'augmentation des demandes en tests PCR ainsi que les cas positifs et les décès liés au COVID-19.

Chapitre II : Résultats et discussion

Hypothèse : la diminution du Ct moyen quotidien précède un pic de demande et de cas positifs.

Cette hypothèse est basée sur une évaluation quotidienne du Ct moyen du gène N suivie de son rapport à l'ensemble des cas positifs ; le Ct est le reflet direct de la charge virale et donc du nombre de particules virales excrétés par un individu donné traduisant sa contagiosité.

Nous avons constaté qu'une baisse soutenue du Ct quotidien moyen s'accompagnait à court terme d'une augmentation du nombre de cas positifs (R_0 du SARS-CoV-2 évalué à 3.3 à 5.7) puis des décès qui en découlent, le processus inverse est observé après que le Pic soit atteint.

Rationnel de l'hypothèse : le Ct traduit la charge virale ; un individu contaminé contagieux peut contaminer 5 à 7 personnes entraînant un décalage entre un cas découvert et les cas secondaires correspondant à la période d'incubation et du délai entre l'apparition des symptômes et la confirmation de la PCR positive que nous estimons à 10 jours (02 jours avant symptômes et une moyenne de 8 jour jusqu'au diagnostic).

Les décès par COVID représentent 3% du total des individus infectés et sont dus aux formes immunologiques et lésionnelles qui apparaissent plus tard après le début des symptômes. [211]

De ce fait, notre raisonnement veut qu'une baisse soutenue des Ct prélude à une augmentation du nombre de cas positifs qui à son tour précède l'apparition des décès. Le processus inverse s'observe alors après le pic.

Objectif :

Basé sur des informations déjà présentes au laboratoire (Ct, taux de positivité...), établir un modèle prédictif d'une nouvelle flambée épidémique qui permettra de :

- Prévoir les besoins en matériel et consommable nécessaire au maintien de l'activité du laboratoire.
- Intensifier les activités de sensibilisation (radio, communauté universitaire et hospitalière...)
- Informer les autorités au fur et à mesure sur l'évolution de l'épidémie dans la région.

Résultats :

Chapitre II : Résultats et discussion

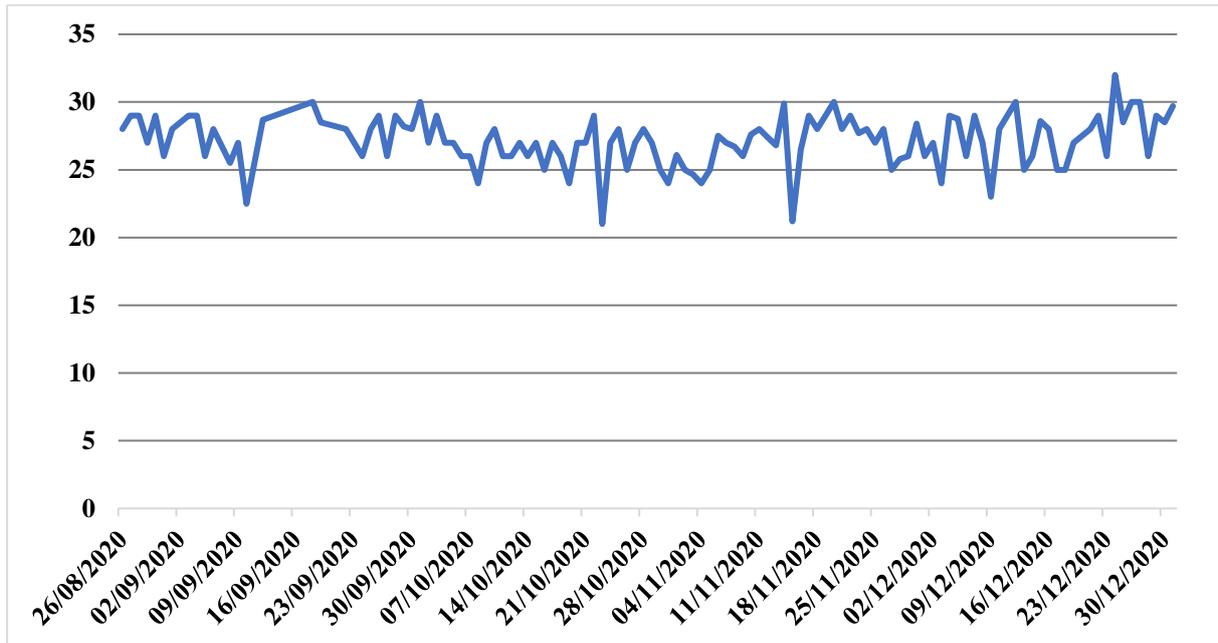


Figure 91: Évolution journalière des Ct.

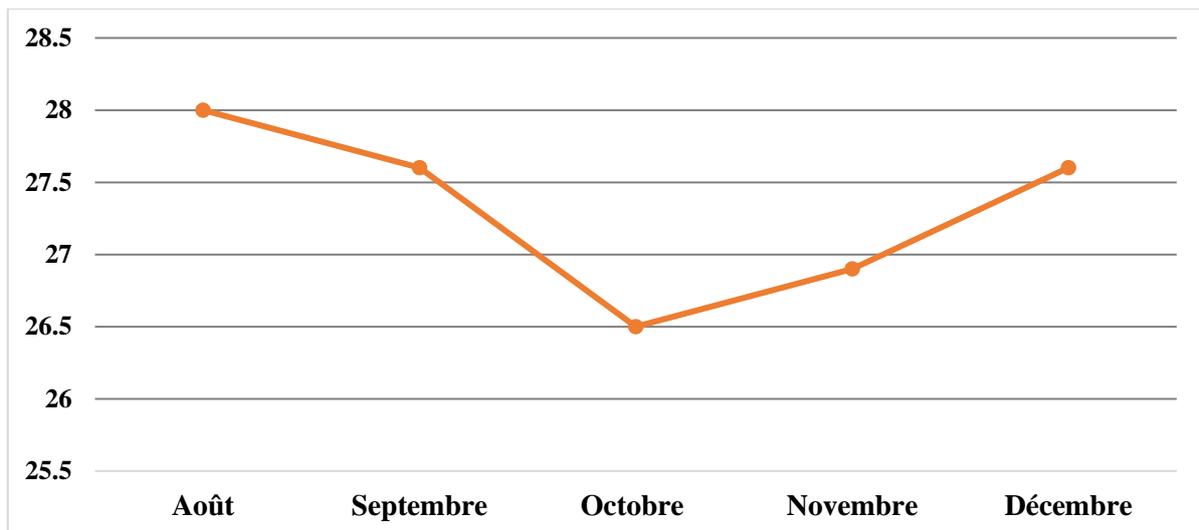


Figure 92: Évolution mensuelle des Ct.

Nous sommes en présence d'une série temporelle dont la variance change au cours du temps. En effet, pendant les 8 premières semaines, la variance de la série Ct est assez faible (et à peu près la même sur toute cette période) puis les semaines suivantes, la variance est nettement plus importante tout en restant à peu près constante sur cet intervalle

Nous pensons donc être en présence d'hétéroscédasticité conditionnelle,

La p-value est largement supérieur à 0.05, on rejette l'hypothèse nulle de dépendance de observations et on conclut que la séries est indépendantes.

Chapitre II : Résultats et discussion

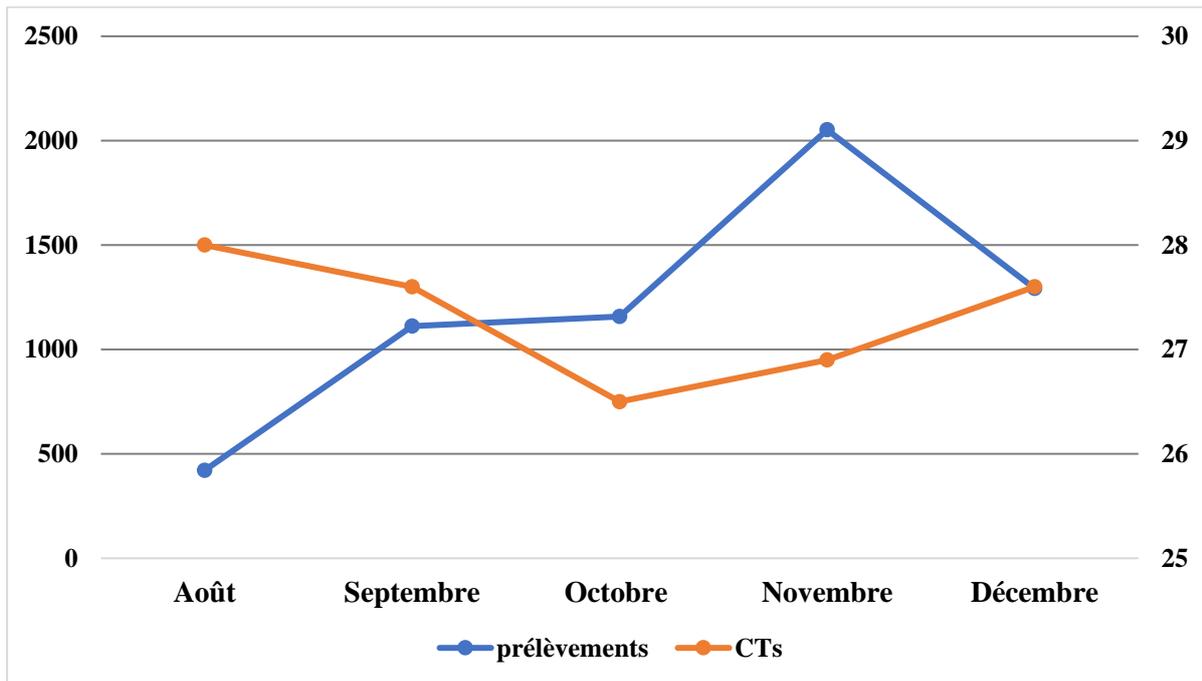


Figure 93: Évolution des CTs et de la demande en tests PCR par mois (N=6021).

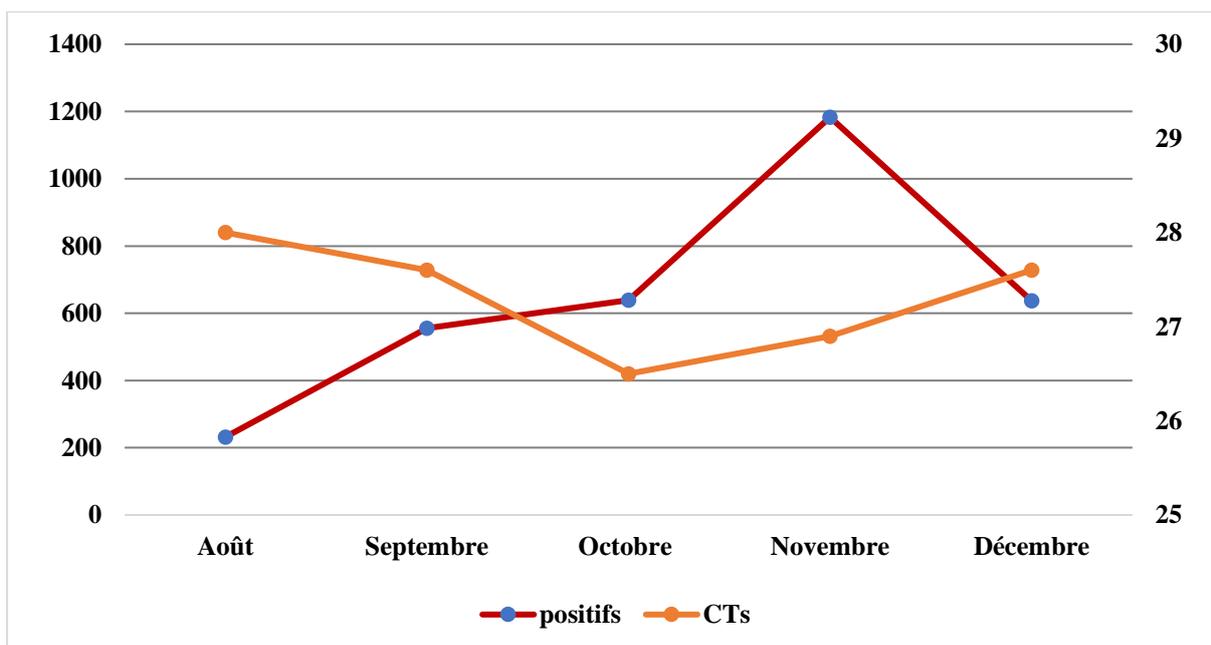


Figure 94: Évolution des CTs et des cas positifs par mois (N=3240).

Chapitre II : Résultats et discussion

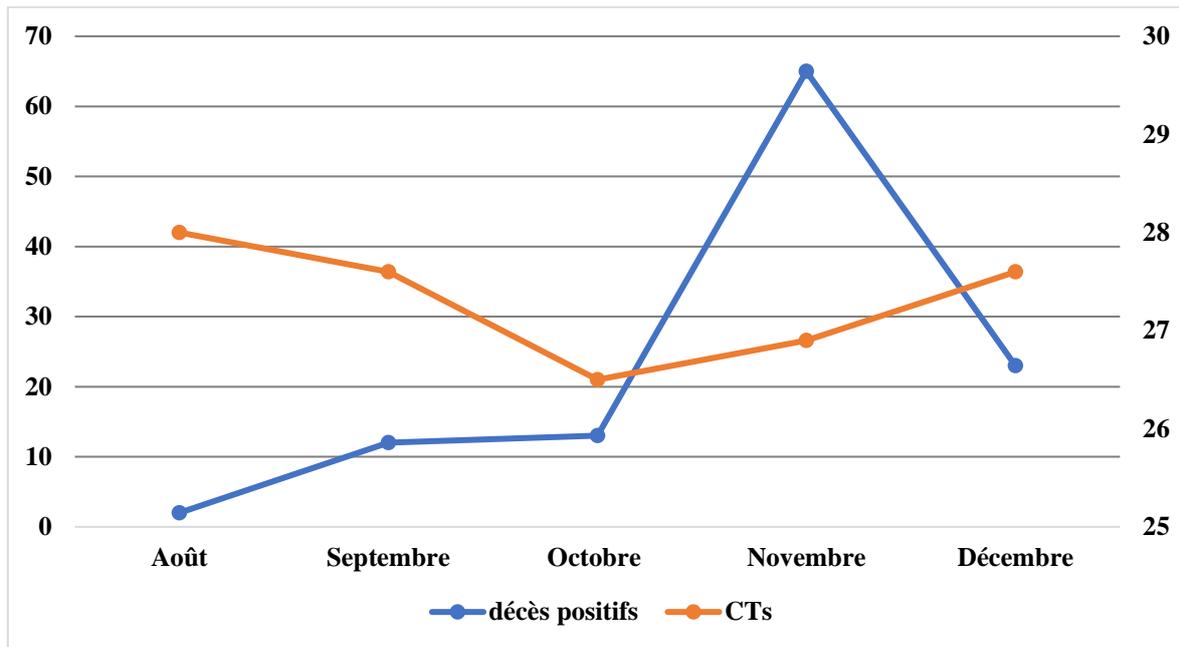


Figure 95 : Évolution des CTs et les décès COVID + par mois (N=115).

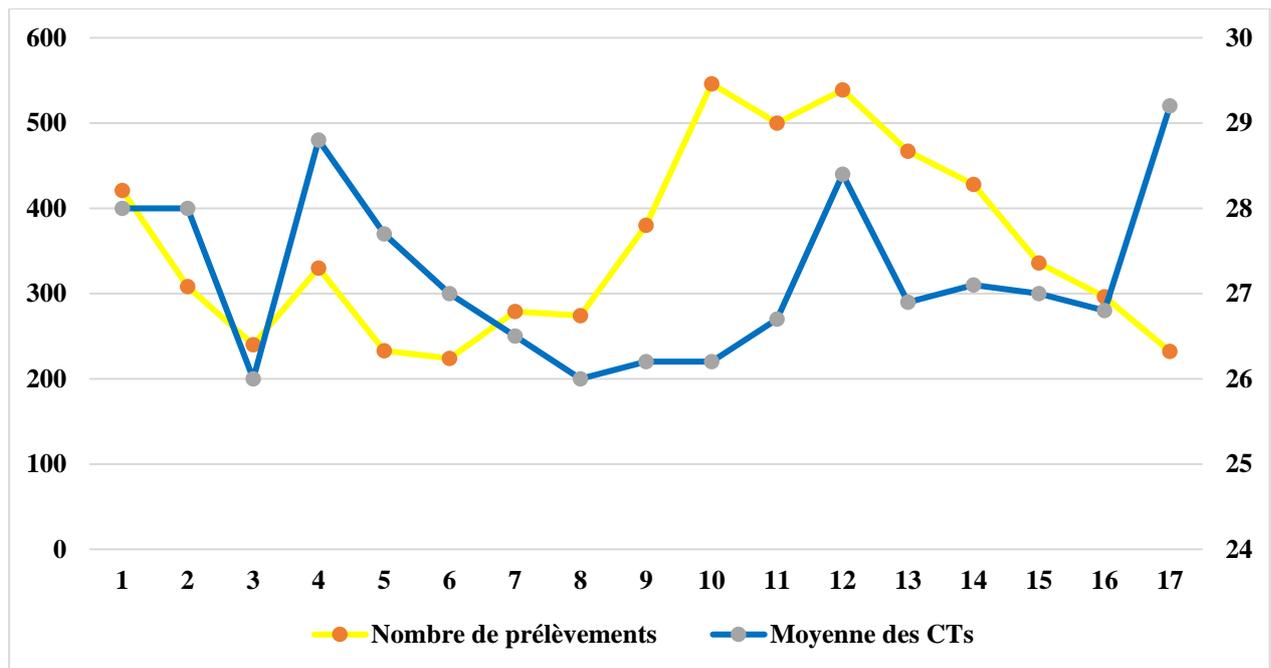


Figure 96: Évolution hebdomadaire de la demande générale en tests PCR.

Chapitre II : Résultats et discussion

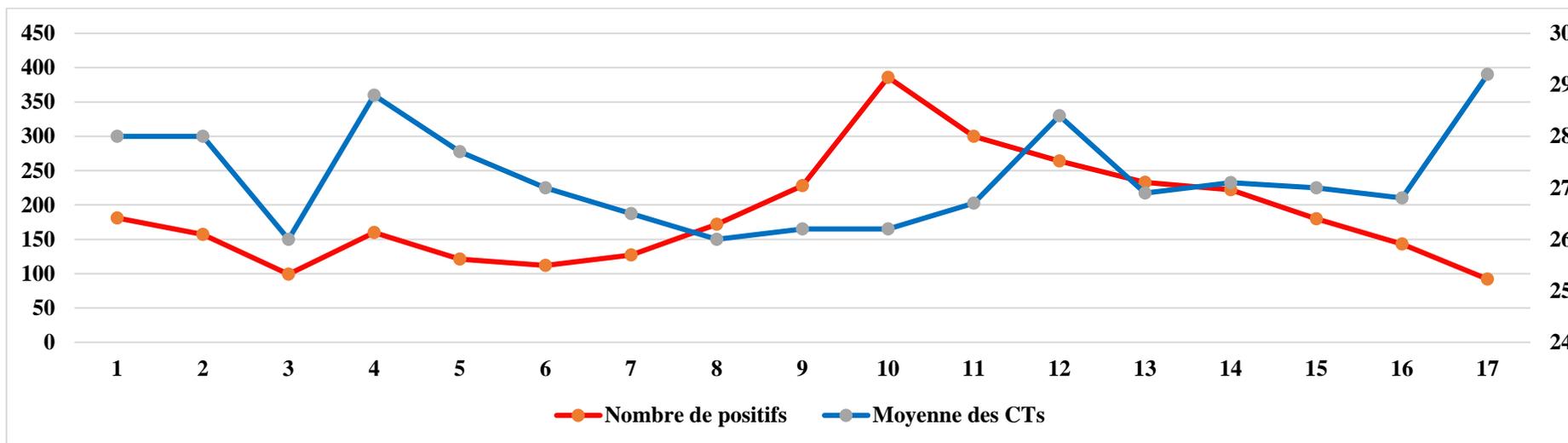


Figure 97: Évolution hebdomadaire des cas positifs et des Cts moyens.

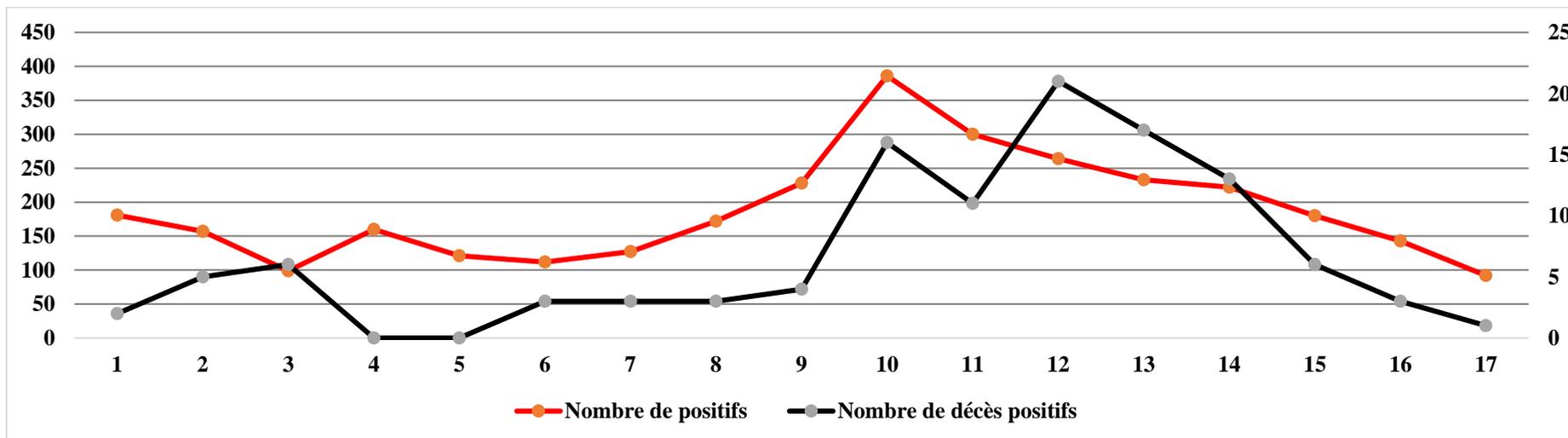


Figure 98 : Évolution hebdomadaire des cas positifs et décès positifs.

CHAPITRE II : Résultats et discussion

Nous observons que la baisse de la moyenne des CTs arrive vers la 8^{ème} semaine (3^{ème} semaine d'octobre) à sa valeur minimale, avant de remonter plus lentement jusqu'à fin décembre.

En parallèle le nombre de positifs assure son ascension à partir du point le plus bas de la courbe des Ct, atteint un maximum 02 semaines plus tard pour amorcer sa descente progressive tout au long du mois de décembre.

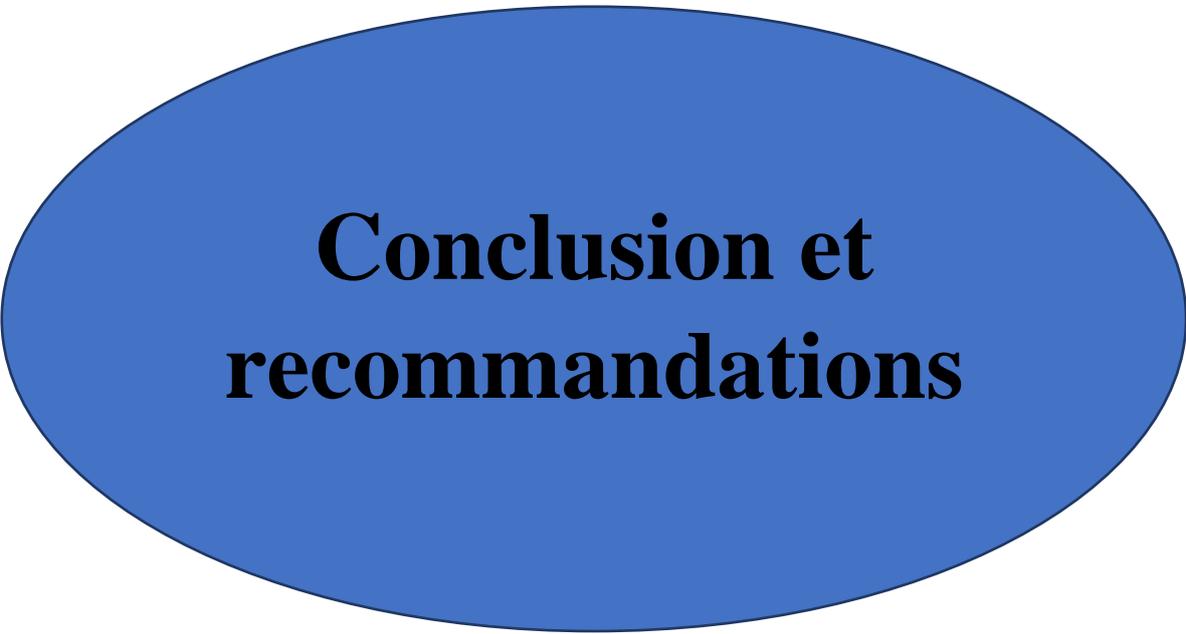
Le décalage de la courbe des décès par rapport à celle du nombre de positifs n'est pas visible sur une échelle mensuelle, mais est bien visible sur une échelle hebdomadaire.

En effet l'ascension des décès COVID + est décalée de 03 semaines (20 jours) de celle du nombre de cas positifs totaux, le pic des décès quant à lui est décalé de 02 semaines du pic de cas positifs.

➤ **En conclusion :**

Notre hypothèse est graphiquement vérifiée et peut être utilisée pour atteindre les objectifs fixés ci-dessus.

La principale limite à l'application de ce modèle reste la difficulté d'accès à l'information ; aussi elle n'est applicable qu'en cas de disponibilité à large échelle des kits de prélèvements et de diagnostic.



**Conclusion et
recommandations**

Conclusion et recommandations

Ce travail nous a permis de :

- ✓ Partager notre expérience en matière de gestion technique ainsi que l'ensemble des améliorations que nous avons apporté au processus en général.
- ✓ Partager notre expérience de gestion logistique de la plateforme biomoléculaire dédiée au SARS-CoV-2 et ayant permis la continuité de l'activité même lorsque la demande a été à son point culminant nous ayant permis même de faire des économies considérables.

En matière de données de santé les résultats montrent que :

- ✓ Notre laboratoire a traité, au 31 décembre 2020, 12079 prélèvements issus des différentes structures sanitaires de la Wilaya de Tizi-Ouzou.
- ✓ Notre région est passée par deux pics épidémiques (Juin-Aout et Octobre-Décembre).
- ✓ Que le nombre total d'infections est corrélé à la densité de population sauf pour la Daïra de Tigzirt. La mortalité quant à elle, a enregistré la plus forte fréquence dans les Daïra de Tizi-Ouzou, LNI et Ain el Hammam.
- ✓ En matière d'âge nos données montrent qu'il s'agit d'une maladie qui touche principalement le sujet âgé que ce soit en termes de morbidité ou de mortalité.
- ✓ En matière de sexe, le sexe masculin semble être plus à risque que le sexe féminin.
- ✓ En termes de comorbidités, les maladies cardio-vasculaires et le diabète viennent en tête de liste.
- ✓ En termes de symptomatologie, la COVID bénigne est le principal motif de prescription de tests PCR, en revanche chez les décès, le tableau de COVID sévère est plus prédominant.
- ✓ Nous avons proposé un modèle de suivi de l'épidémie (inspiré de celui basé sur la surveillance dans les eaux usées en France) et ce, à travers l'observation des Ct (Charges virales) moyens quotidiens des individus positifs, qui graphiquement est concordant avec l'hypothèse proposée.

Les principales difficultés rencontrées durant ce travail sont de trois ordres :

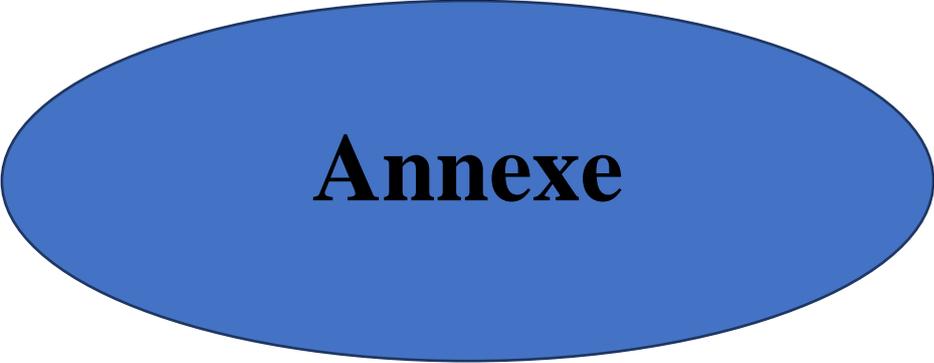
- ✓ La qualité de l'information mise à disposition du laboratoire, qui de plus et souvent incomplète ou même absente.

- ✓ Le caractère obsolète de certains appareils qui rend leurs réparations difficiles voire impossibles.
- ✓ L'absence de pré-nettoyage des prélèvements au niveau du CHUTO qui retarde considérablement le temps global de traitement des échantillons en particulier lors du pic épidémique.

Enfin, en plus de l'ensemble des recommandations apportés dans la partie pratique, nous conseillons vivement de :

- ✓ Faire des prévisions et multiplier les Fournisseurs : lors d'une épidémie, l'évolution de la demande en tests est imprévisible de plus que le marché devient instable, il est conseillé de multiplier les sources de ravitaillement et de faire des prévisions mensuelles, qui sont permis par l'utilisation des systèmes ouverts.
- ✓ La validation de la PCR sans extractions a probablement été permise par la nature même du prélèvement qui ne semble pas contenir des inhibiteurs de PCR. Elle reste une alternative intéressante en cas de rupture de stocks en réactif d'extraction.
- ✓ La cohésion de l'équipe a été une condition *sine qua none* à la réussite de ce projet, ainsi, dans le futur, au cas où cette situation sanitaire serait passible de se reproduire, nous recommandons de constituer une équipe de professionnels **du domaine** et de leurs garantir une atmosphère de travail sereine, car, même dans un contexte épidémique, les pressions extérieures et les tensions internes, peuvent rapidement dégénérer en particulier si la situation est appelée à durer.
- ✓ La situation sanitaire actuelle a nécessité la collaboration d'acteurs de différents domaines : UMMTO, CHUTO, La Direction de la santé et de la population ... la coordination entre ces différents acteurs est très importante à la réussite de la prise en charge de l'épidémie.

Nous avons eu la chance d'avoir des partenaires industriels de premiers choix qui nous ont aidé sous forme d'association gagnant-gagnant, nous recommandons vivement de chercher de pareille collaboration si la situation sanitaire l'exige.



Annexe

Annexe

Annexes

Annexe 1 : Les molécules à activité antivale approuvées par la FDA ayant action sur le SARS-CoV-2.[215]

μM	EC50	EC90	CC50	SI
Azithromycine	2.12	8.65	>40	>19
Spiramycin	7.95	10.45	>40	>5
Omeprazole	17.06	38.01	>40	>2.35
Oxprenolol hydrochloride	20.22	>40	>40	>2
Hydroxy-chloroquine	4.17	25.49	>40	>10
Clemizole hydrochloride	23.94	38.23	>40	>1.7
Alprostadil	5.39	62.40	>40	>7.4
Dolutegravir	22.04	42.81	>40	>1.8
Sulfadoxine	35.37	45.11	>40	>1.13
Opipramol dihydrochloride	5.05	5.97	>40	>7.9
Quinidine hydrochloride	5.11	>40	>40	>7.8
Vonoprazan	38.58	41.01	>40	>1
Exemestane	7.51	9.86	>40	5.3
Dyclonine hydrochloride	10.00	>40	>40	>4
Spiperone	2.49	13.10	>40	>16
Arbidol	10.7	15.2	>40 ^a	>3.7
Remdesivir 7 exp	1.67 ± 0.59	2.53 ± 0.67	nd	nd

Annexe

ID	Chemical name	Reported therapeutic effect	Inhibition index
01F08	Benoxinate hydrochloride	Local anesthetic	1.19
03G08	Clemizole hydrochloride	Antihistaminic, antibiotic, antineoplastic	1.01
05A10	Tacrine hydrochloride	CNS stimulant	1.44
06D11	Epiandrosterone	Anabolic	1.07
07B04	Omeprazole	Antiulcer	1.25
07G07	Pregnenolone	Anabolic, anti-inflammatory	1.66
07G09	Chloroquine diphosphate	Anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal	1.35
07H07	Mirtazapine	Antidepressant	1.03
08D06	Exemestane	Antineoplastic	1.10
08E11	Hydroxychloroquine sulfate	Antimalarial, anti-inflammatory, antirheumatic	1.43
08H03	Dipivefrin hydrochloride	Antiglaucoma	1.01
09D04	Opipramol dihydrochloride	Antidepressant	1.05
09F04	Promazine hydrochloride	Antipsychotic	1.16
10G08	Merbromin disodium salt	Antiseptic, antibacterial	1.12

Table 1. Inhibition index and detailed description of the 14 highest confident hit compounds.

Annexe 2 :Caractéristique des vaccins candidats promoteurs contre la COVID-19 Et enjeu relatif de leur utilisation.[149]

Annexe

Type	Caractéristiques	Qualités	Défauts
Vivant atténué	Produit à partir d'une souche virale atténuée	<ul style="list-style-type: none"> Approche largement éprouvée Le vaccin comporte plusieurs antigènes Induction d'une immunité humorale et cellulaire 	<ul style="list-style-type: none"> Procédés pour l'atténuation non validés Risque de retour à la forme sauvage Production nécessite des laboratoires sécurisés
Inactivé	Produit à partir d'une souche virale inactivée	<ul style="list-style-type: none"> Approche largement éprouvée Le vaccin comporte plusieurs antigènes Induction d'une immunité humorale et cellulaire Stabilité du vaccin sur le terrain 	<ul style="list-style-type: none"> L'intégrité des antigènes ciblés pourrait être altérée par le procédé d'inactivation Réponse immunitaire pourrait être faible et un adjuvant nécessaire Possible risque augmenté d'infection ou d'aggravation de la maladie par des anticorps non fonctionnels comme constaté dans certaines études chez l'animal Production nécessite des laboratoires sécurisés
Protéinique	Peptidique (spicule viral) ou sous-unitaire (région d'un spicule viral)	<ul style="list-style-type: none"> Approche largement éprouvée Stabilité du vaccin sur le terrain 	<ul style="list-style-type: none"> Privilégie la réponse humorale Risque de produire des anticorps avec faible affinité Risque de maladie aggravée par des anticorps non fonctionnels Réponse immunitaire pourrait être faible et un adjuvant nécessaire
Particulaire	Nanoparticule ou particule pseudovirale	<ul style="list-style-type: none"> Approche novatrice mais déjà réussie pour des vaccins autorisés (VHB, VPH, Zona) 	<ul style="list-style-type: none"> Réponse immunitaire pourrait être faible et un adjuvant nécessaire Stabilité du vaccin sur le terrain incertaine
Vecteur viral	Avec ou sans multiplication	<ul style="list-style-type: none"> Approche novatrice mais déjà réussie pour des vaccins pour animaux Induction d'une immunité humorale et cellulaire 	<ul style="list-style-type: none"> Approche novatrice avec un seul exemple de vaccin autorisé chez l'humain (Ebola) Risque d'interférence causée par des anticorps dirigés contre le virus vecteur Effets secondaires importants

Annexe 3 : Caractéristiques des vaccins candidats contre la COVID-19 et enjeux relatifs à leur utilisation.[149]

Type	Caractéristiques	Qualités	Défauts
ARNm	Brin d'ARNm stabilisé qui doit s'intégrer au cytoplasme de cellules de l'hôte	<ul style="list-style-type: none"> Développement rapide à partir d'une plateforme générique Possibilité de production rapide à grande échelle Induction d'une immunité humorale et cellulaire 	<ul style="list-style-type: none"> Approche novatrice, mais peu d'expérience avec des vaccins pour l'humain (un seul vaccin autorisé : Ebola) Effets secondaires importants Réponse immunitaire pourrait être faible Stabilité du vaccin sur le terrain incertaine Risque théorique de tolérance génétique
ADN	Brin d'ADN stabilisé qui doit s'intégrer au nucléoplasme de cellules de l'hôte	<ul style="list-style-type: none"> Induction d'une immunité humorale et cellulaire Possibilité de production rapide à grande échelle Stabilité sur le terrain 	<ul style="list-style-type: none"> Approche novatrice, mais pas encore aboutie pour des vaccins pour l'humain (mais bien pour usage vétérinaire) Nécessite un vecteur ou une méthode de transport pour atteindre le noyau des cellules immunitaires Risque théorique de mutation génomique chez l'hôte (non constaté chez l'animal) Réponse immunitaire pourrait être faible Risque théorique d'induction d'une tolérance immunitaire
Vaccins 'off-target'	Vaccin vivant atténué dirigé contre autre maladie (BCG, rougeole, polio orale)	<ul style="list-style-type: none"> Vaccins homologués Disponibles en grande quantité (sauf BCG) Calendrier comportant une seule dose Sécurité établie 	<ul style="list-style-type: none"> Immunité de faible amplitude et potentiellement de courte durée Délais pour l'apparition de l'immunité (BCG)

Annexe

Compagnie	Plateforme	Nom	Stade de développement	Caractéristiques
Sinovac	Vaccin inactivé adsorbé	PICoVacc	<ul style="list-style-type: none"> Phase 3 : Brésil, Indonésie Codes : NCT04456595 669/UN6.KEP/EC/2 020 	<ul style="list-style-type: none"> Technologie largement éprouvée pour des vaccins Induction d'anticorps neutralisants et protecteurs chez le macaque
Wuhan Institute of Biological Products/Sinopharm	Vaccin inactivé cultivé sur cellule Vero avec adjuvant aluminium	-	<ul style="list-style-type: none"> Phase 3 : Émirats arabes unis Code : ChiCTR2000034780 	<ul style="list-style-type: none"> Technologie largement éprouvée pour des vaccins Induction d'anticorps neutralisants chez l'humain en Phase 1 Effets secondaires mineurs et peu fréquents
Beijing Institute of Biological Products/Sinopharm	Vaccin inactivé cultivé sur cellule Vero avec adjuvant aluminium	-	<ul style="list-style-type: none"> Phase 3 : Émirats arabes unis Argentine Codes : ChiCTR2000034780 NCT04560881 	<ul style="list-style-type: none"> Technologie largement éprouvée pour des vaccins Peu d'information disponible quant aux résultats des études concernant ce vaccin
Novavax*	Nanoparticule composée de la glycoprotéine spiculaire (S) produite par recombinaison avec une saponine végétale (Matrix-M1) comme adjuvant	NVX-CoV2373 ARS-CoV-2	<ul style="list-style-type: none"> Phase 3 : Royaume-Uni Code : 2020-004123-16 	<ul style="list-style-type: none"> Technologie largement éprouvée pour des vaccins Induction d'anticorps sériques neutralisants protecteurs et d'une réponse cellulaire impliquant les CD4 et CD8 chez l'animal (souris et babouins) Induction d'anticorps sériques neutralisants et d'une réponse cellulaire impliquant les CD4 de type Th1 chez l'homme Deux doses et adjuvant nécessaires Effets secondaires mineurs Stabilité sur le terrain probable

Compagnie	Plateforme	Nom	Stade de développement	Caractéristiques
Sanofi-GSK*	Vaccin protéinique recombinant constitué de la protéine spiculaire produite par une plateforme utilisant le baculovirus et d'un adjuvant (AS03)		Phase 1	Plateforme déjà utilisée pour produire un vaccin influenza autorisé dans plusieurs pays
Medicago	Particule pseudovirale produite à partir de plantes et avec adjuvant : AS03 ou CpG1018		Phase 1 : essai autorisé au Canada Code : NCT04450004	Pas de résultats encore publiés
University of Oxford/AstraZeneca*	Vecteur viral sans multiplication basé sur un adénovirus de chimpanzé de type Ad5	ChAdOx1-S /AZD1222	Phase 3 : Royaume-Uni, États-Unis, Brésil, Russie Codes : ISRCTN89951424 NCT04516746 NCT04540393 NCT04400838 NCT04536051	<ul style="list-style-type: none"> Vecteur est un adénovirus du chimpanzé Induction d'une réponse humorale et cellulaire préférentielle de type Th1 chez l'animal Protection contre la pneumonie, mais non contre la multiplication du virus dans le pharynx chez le macaque Induction d'anticorps neutralisants chez l'humain Réponse améliorée après une deuxième dose Peu de détails sur la nature de la réponse cellulaire chez l'humain Réponses humorales et cellulaires affectées par la présence d'anticorps dirigés contre le vecteur Effets secondaires fréquents : douleurs locales et fièvre chez environ 50 % des vaccinés Signal d'effet indésirable sévère (myélite transverse)

Suite annexe 3

Annexe

CanSino/Beijing Institute of Biotechnology	Vecteur viral sans multiplication basé sur un adénovirus humain de type Ad5	Ad5-nCoV	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Phase 3 : Pakistan, Russie ▶ Codes : NCT04526990 NCT04540419 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Induction d'anticorps protecteurs chez le macaque ▶ Induction d'une réponse humorale et cellulaire chez l'humain avec production d'anticorps neutralisants ▶ Réponse immunologique amoindrie chez les personnes âgées ▶ Effets secondaires locaux et systémiques fréquents ▶ Vaccin autorisé en Chine pour la vaccination de certaines catégories de personnes 	Johnson & Johnson – Janssens*	Vecteur viral sans multiplication basé sur un adénovirus humain de type Ad26 exprimant la glycoprotéine spiculaire du SRAS-CoV-2	Ad26.COV2.S	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Phase 3 : États-Unis, Ukraine, Afrique du Sud, Philippines, Pérou, Mexique, Colombie, Chili, Brésil, Argentine ▶ Code : NCT04505722 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Induction d'anticorps neutralisants protecteurs chez le macaque ▶ Dans une étude de Phase 1/2, induction d'anticorps neutralisants et d'une réponse cellulaire de type Th1 avec CD4 et CD8 après une seule dose ▶ Réactions locales et systémiques chez environ la moitié des vaccinés
Gamaleya Research Institute	Vecteur viral sans multiplication basé sur un adénovirus humain de type Ad5 (une des 2 doses) ou Ad 26 (l'autre dose)	Gam-COVID-Vac Sputnik V	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Phase 3 : Russie, Biélorussie ▶ Codes : NCT04530396 NCT04564716 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Utilisation de 2 adénovirus distincts pour la première et seconde dose pour minimiser les interférences liées aux anticorps dirigés contre le vecteur ▶ Dans deux essais de Phase 1, induction d'anticorps neutralisants et d'une réponse cellulaire avec CD4 et CD8 ▶ Réponse immunologique plus élevée avec le vaccin congelé que lyophilisé ▶ Effets secondaires fréquents, incluant douleurs au site d'injection et fièvre chez la moitié des participants 	Moderna*	ARN messenger codant la protéine spiculaire du SRAS-CoV-2 dans sa forme préfusionnelle et encapsulé dans une nanoparticule lipidique	mRNA-1273	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Phase 3 : États-Unis ▶ Code : NCT04470427 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Chez le macaque, induction d'anticorps neutralisants protecteurs au niveau du poumon et du pharynx et d'une réponse cellulaire de type Th1 avec des CD4, mais sans CD8 ▶ Dans étude de Phase 1, induction d'anticorps neutralisants ▶ Effets secondaires généraux et locaux chez la moitié des participants (certains pouvant nécessiter une hospitalisation) ▶ Conservation à -20 °C
					Pfizer*	ARN messenger codant la protéine spiculaire du SRAS-CoV-2 et encapsulé dans une nanoparticule lipidique	BNT162b2	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Phase 3 : États-Unis, Argentine, Brésil, Turquie ▶ Code : NCT04368728 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Dans une étude de Phase 1, induction d'anticorps neutralisants, avec titres élevés après la seconde dose, ainsi que d'une réponse cellulaire avec CD4 et CD8 ▶ La version BNT162b2 du vaccin s'est révélée moins réactogène et plus immunogène que la version BNT162b1, qui ne codait qu'une partie de la protéine spiculaire ▶ Effets secondaires locaux et systémiques chez environ 50 % des vaccinés ▶ Conservation à -70 °C

Suite annexe 3

Annexe

Divers	Vaccins préparés à partir d'une des souches du bacille bilié de Calmette et Guérin (BCG) ou d'un dérivé de nouvelle génération (VPM1002)	BCG VPM1002	<ul style="list-style-type: none">▶ 19 études de Phase 3 dans 13 pays incluant une étude au Canada avec le vaccin VPM1002▶ Code : NCT04439045	<ul style="list-style-type: none">▶ Vaccins largement utilisés et dont les caractéristiques sont bien connues▶ Vaccins sécuritaires si les contre-indications sont respectées▶ Effet sur la COVID-19 lié au <i>trained immunity</i>▶ Un essai randomisé chez des adultes immunocompétents âgés de 65 ans a mis en évidence une protection de l'ordre de 80 % contre les infections respiratoires excluant la COVID-19 non encore présente et cela sur une période de 12 mois▶ Grande capacité de production au niveau mondial, mais accès limité au Canada
--------	--	----------------	--	--

Annexe 4: Ions et molécules inhibant la PCR

Annexe

Type of inhibitor	Molecule or ion	Source	Mechanism/s ^a
	Polysaccharides	Feces	Binding to polymerase
	Proteinases (plasmin)	Milk	Degradation of polymerase
	Reverse transcriptase	RT-PCR	Competition with DNA polymerase and/or formation of complex with ssDNA
	Tannic acid	Soil	Binding to polymerase
	Urea	Urine	Prevents non-covalent bonding, acting directly on polymerase or hindering primer annealing
Nucleic acid inhibitors	Bilirubin	Feces	Competition with template
	Cellulose, nitrocellulose	Sampling filters	Binding to DNA
	Ethanol	DNA extraction	Precipitation of DNA
	Ethidium bromide	DNA extraction	Binding to DNA
	Formaldehyde	Preservative	Interference with DNA and DNA polymerase
	Heparin	Anticoagulant	Binding to DNA, competition with template and direct interaction with polymerase
	Immunoglobulin G	Blood	Binding to ssDNA
	Isopropanol	DNA extraction	Precipitation of DNA
	PEG	DNA extraction	Precipitation of DNA
	SYBR Green I	Detection dye	Binding to dsDNA with high affinity
	SYTOX Orange	Detection dye	Binding to dsDNA with high affinity
	TO-PRO-3	Detection dye	Binding to dsDNA with high affinity
Fluorescence inhibitors	Humic compounds	Soil	Fluorescence quenching, direct interaction with polymerase and primer annealing
	Polymeric surfaces	Miniaturized real-time PCR instruments	Binding of detection dye, e.g., SYBR Green

Type of inhibitor	Molecule or ion	Source	Mechanism/s ^a
Polymerase inhibitors	Al ³⁺	Sampling using aluminum-shafted swabs	Alters ion composition
	Alginate	Sampling with calcium alginate swabs	Adsorption of Mg ²⁺ or entrapment of polymerase
	Bile salts (cholic and deoxycholic acid)	Feces	Direct effect on polymerase
	Calcium ions	Milk	Competition with the polymerase cofactor Mg ²⁺
	Collagen	Bone	Alteration of ion composition by binding cations
	EDTA	Anticoagulant	Chelation of Mg ²⁺
	FeCl ₃		Release of iron ions
	Free radicals	UV treatment of PCR tubes	Reaction with polymerase
	Fulvic acid	Soil	Binding to polymerase
	Heme	Blood	Release of iron ions and competition with template
	KAc/K ₂ Cr ₂ O ₇	DNA extraction/preservative	Alteration of ion composition
	Lactoferrin	Blood	Release of iron ions
	LiCl	Growth medium	Alteration of ion composition
	Melanin	Skin, hair	Binding to polymerase
	MgCl ₂	Growth medium	Alteration of level of Mg ²⁺ in PCR
	Myoglobin	Muscle tissue	Release of iron ions
	NaCl		Alteration of ion composition
	NaOH	DNA extraction	Degradation of DNA, pH-mediated denaturation of polymerase
	NH ₄ Ac	DNA extraction	Alteration of ion composition
	Phenol	Soil, DNA purification	Denaturation of polymerase or binding to the polymerase via hydrogen bonds
	Phytic acid	Feces	Chelation of Mg ²⁺ or change in ion content if present as salt

Annexe

Annexe 5 : Application et technologies recommandé pour le séquençage du génome SARS-CoV-2.

[216]Annexe 6 : Fiche de notification des cas

Fiche de notification de cas suspect, probable ou confi

Déclaration initiale Déclaration mi:

Wilaya de :
 Établissement de santé déclarant :
 Médecin déclarant :
 Date de notification : / / / / / / / / / /

I/ Identification du patient
 Nom : Prénom : Sexe : Masculin
 Age : / / / / en année ; si (< 1 an) : / / / / en mois ; ou si (< 1 mois) : / / / /
 Profession :
 Adresse patient : commune wilaya : ..
 Nationalité : N° tél/contact :

II/ Informations cliniques
 Date de début des symptômes: / / / / / / / / / /
1-Symptômes à l'admission (cocher tous les symptômes rapportés)
 Fièvre (≥38°C) Toux Dyspnée Céphalées Asthénie
 Douleurs musculaire Diarrhée Douleur abdominale Anosmie
 Autres (préciser) :

2- Antécédents et comorbidités : Non Oui Inconnu
 Si oui, à préciser : 1-grossesse trimestre 7-post-partum<6semain
 2-maladies cardiovasculaires 8-immunodépression (V
 3-HTA 9-Maladies chroniques
 4-Diabète 10-Maladies rénales
 5-Maladie du foie 11-cancer
 6-Maladie neurologique ou Neuromusculaire chronique 12- Autres
 préciser

3-Hospitalisation :
 Service d'hospitalisation :
 Date d'hospitalisation: / / / / / / / / / /
 Patient intubé : Non Oui Inconnu Prélèvement : Non Ou
 Si oui, date de prélèvement : / / / / / / / / / / et Type de prélèvement
 2-Pharyngé 3-Nasopharyngé 4-Lavage broncho-alvéolaire
 5-Autre Si oui Précisez
 TDM thoracique : Non Oui si oui, images scannographiques en faveur

III- Notion d'exposition
 Contact étroit avec un cas : Non Oui
 Si oui, avec cas : suspect confirmé probable le lieu de contact (pré

IV/ Résultat du laboratoire
 Résultats : positif négatif non concluant en cours,
 Date de réception des résultats : / / / / / / / / / /
 Date d'édition des résultats : / / / / / / / / / /

V/ Évolution clinique
 Évolution: en cours guérison décès
 Date de décès ou de sortie de l'hôpital: / / / / / / / / / /

Signature et cachet du médecin déclarant

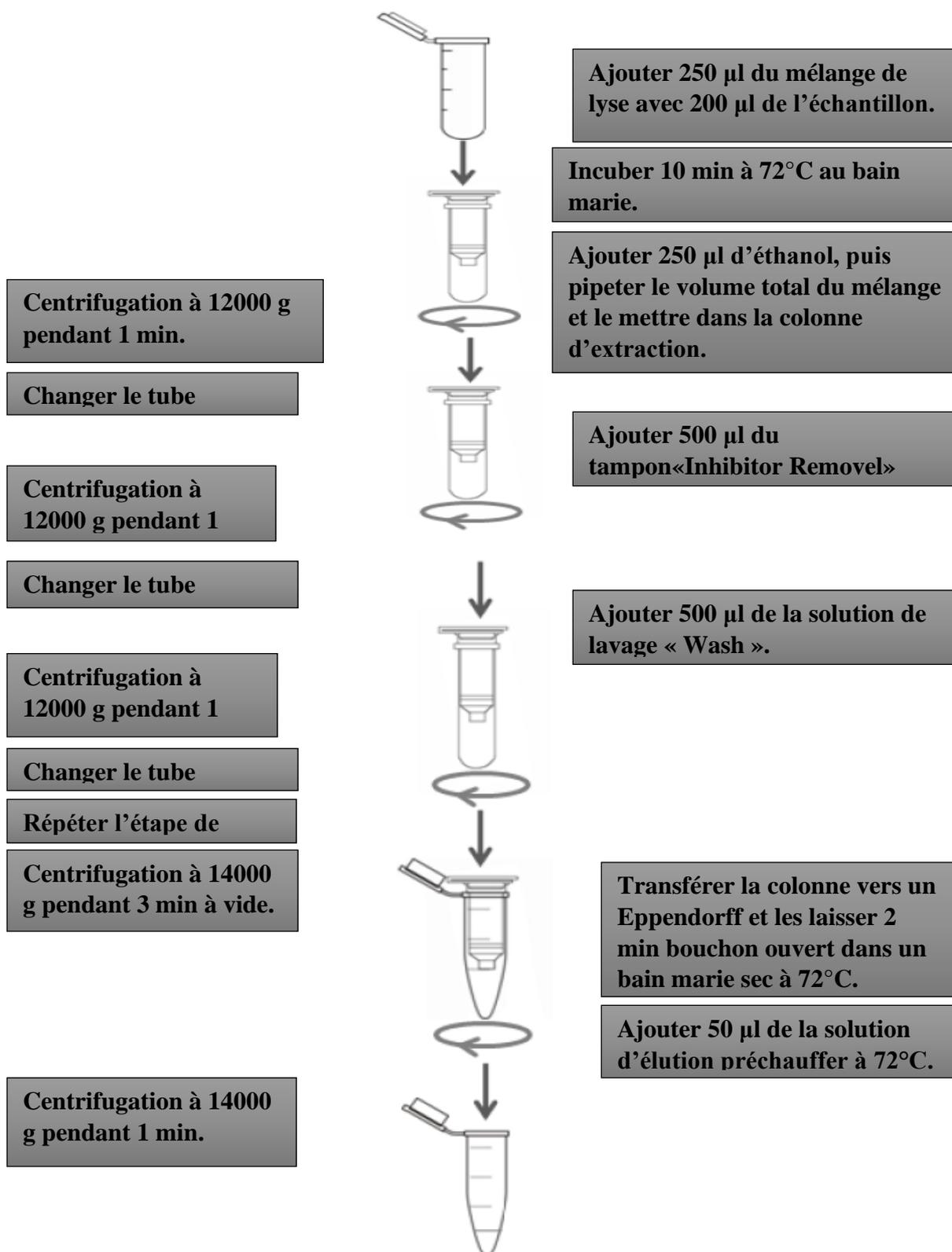
COVID-19.[217]

Application	Recommended sequencing platforms	Recommended library construction approaches	Recommended read length	Recommended minimum local coverage (approximate)
Transmission patterns, clade/lineage assignment, confirmation of reinfection, phenotypically relevant mutations, data reporting	MiSeq/NextSeq/iSeq/Nov aSeq (Illumina), Ion Torrent (Thermo Fisher), MinION (Oxford Nanopore), Sequel System (PacBio)	Amplicon-based (ARTIC, commercial, in-house)	>100 bp	>10x over >95% of genome
Confirmation of reinfection and/or direct transmission (in cases where minority variants are required)	MiSeq/NextSeq/iSeq/Nov aSeq (Illumina), Ion S5 series/Genexus (Thermo Fisher)	Amplicon-based (ARTIC, commercial, in-house)	>100 bp	>500x over >95% of genome
In-depth genome analysis (large indels, recombination, rearrangements, quasi-species haplotypes)	MinION (Oxford Nanopore), Sequel System (PacBio)	Amplicon-based (>1000 bp fragments), capture-based, untargeted	>1000 bp	>500x over >95% of genome
Detection of unknown pathogens or highly divergent strains	MiSeq/NextSeq/iSeq/Nov aSeq (Illumina), Ion S5 series/Genexus (Thermo Fisher), MinION (Oxford Nanopore)	Untargeted RNA sequencing, β-CoV-specific RT-PCR	>100bp	>5Gbp data per sample

Annexe

Annexe

Annexe 7 : Protocole d'extraction manuelle.[218]



ARN viral

Annexe

Annexe 8 : Protocole des kits d'amplification utilisé dans le laboratoire de diagnostic moléculaire du virus SARS-CoV-2.

1- Le kit de PCR thermofisher :

https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/superscript_onestep_qrtPCR_man.pdf?fbclid=IwAR04_Gt4DDOv9NJYe ma4NTV1GJnCI7IPe6RwsdBCuAyiH2kkEVtj7O3jT1o

2- Le kit BGI :

https://www.fda.gov/media/136472/download?fbclid=IwAR001vsziLKuXIeIYFkgU_oq6Uo2kjyx94QBg_pHyRcGynA7UfRqXto0bF0

3- Le Kit sansure biotech :

<https://www.fda.gov/media/137651/download>

4- Le Kit virella :

https://www.covid19aaz.com/pdf/Instructions-d%27utilisation_virellaSARS-CoV-2%20seqc_v1.0%20FR_20200330.pdf

5- Le Kits Eurobioplex :

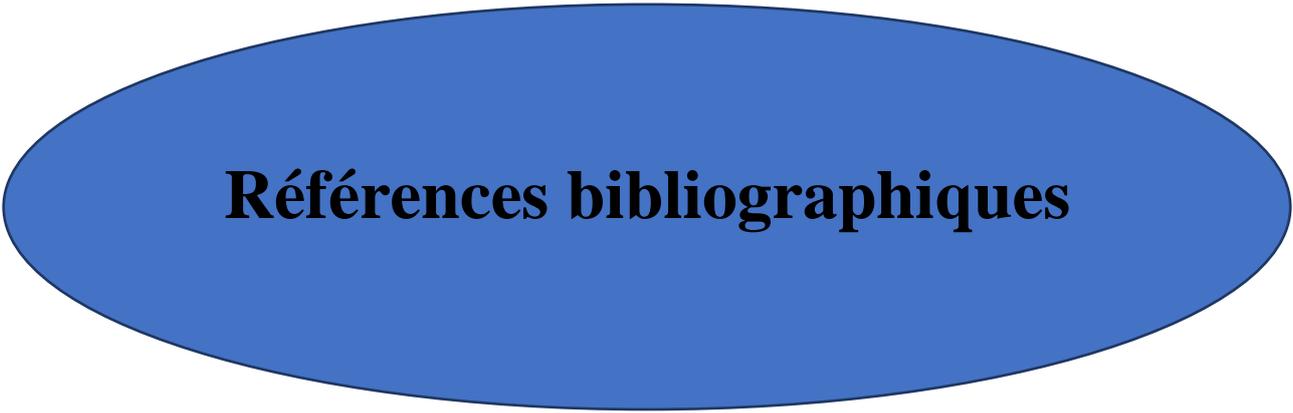
https://www.bmgrp.eu/fileadmin/user_upload/images/news/FT_EBX-041_SARS-Cov-2-FR-EN-25032020.pdf

6- Da an gene kit :

https://www.who.int/diagnostics_laboratory/eual/eul_0493_141_00_detection_kit_for_2019_ncov_rna_pcr_flourescence_probing.pdf

7- Le kit Qiagene :

<https://www.fda.gov/media/137026/download>



Références bibliographiques

Références bibliographiques

Les références bibliographiques

1. *RAPPORT DE SITUATION SUR L'ÉPIDÉMIE DU COVID-19 en Algérie.*
2. Daszak, P., *Global trends in emerging infectious diseases.* Nature, 2008. **451**(7181): p. 990-993.
3. Gowtage-Sequeria, S. and M. Woolhouse, *Host range and emerging and reemerging pathogens.* Emerging Infectious Diseases, 2005. **11**(12): p. 1842-1847.
4. Nathan, W., P.-D. Claire, and D. Jared, *Origins of major infectious diseases.* Nature, 2007. **447**(17): p. 279-283.
5. Lacroix, A., *La détection et la caractérisation de coronavirus et astrovirus chez les chiroptères au Cambodge et au Laos.* 2016, Université de Montpellier.
6. Shchelkanov, M.Y., et al., *History of investigation and current classification of coronaviruses (Nidovirales: Coronaviridae).* Russian Journal of Infection and Immunity, 2020. **10**(2): p. 221-246.
7. Vabret, A., et al., *Human coronaviruses.* Pathologie-biologie, 2008. **57**(2): p. 149-160.
8. Walls, A.C., et al., *Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein.* Cell, 2020. **181**(2): p. 281-292. e6.
9. Van Doremalen, N., et al., *Aerosol and surface stability of SARS-CoV-2 as compared with SARS-CoV-1.* New England journal of medicine, 2020. **382**(16): p. 1564-1567.
10. Kirtipal, N., S. Bharadwaj, and S.G. Kang, *From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses.* Infection, Genetics and Evolution, 2020: p. 104502.
11. Sallard, E., et al., *Retrouver les origines du SARS-CoV-2 dans les phylogénies de coronavirus.* médecine/sciences, 2020. **36**(8-9): p. 783-796.
12. *Origine et évolution du SARS-Cov-2.* Académie des sciences, 11 juin 2020.
13. Zhang, T., Q. Wu, and Z. Zhang, *Probable pangolin origin of SARS-CoV-2 associated with the COVID-19 outbreak.* Current biology, 2020. **30**(7): p. 1346-1351. e2.
14. *Préparation et riposte aux situations d'urgence / Un variant du SARS-CoV-2 chez le vison – Danemark.* Available from: <https://www.who.int/csr/don/03-december-2020-mink-associated-sars-cov2-denmark/fr/?fbclid=IwAR2N24gOMlZgfbIIYIJlSRcjbHbEPxatiSQAt2pDm13nTr37cuVOpnCm6c>.
15. Poudel, U., et al., *Animal coronaviruses and coronavirus disease 2019: Lesson for one health approach.* Open veterinary journal, 2020. **10**(3): p. 239–251-239–251.
16. Lefeuvre, C., É. Przyrowski, and V. Apaire-Marchais, *Aspects virologiques et diagnostic du coronavirus SARS-CoV-2.* Actualités Pharmaceutiques, 2020. **59**(599): p. 18-23.
17. Zhand, S., et al., *COVID-19: the immune responses and clinical therapy candidates.* International journal of molecular sciences, 2020. **21**(15): p. 5559.
18. Yoshimoto, F.K., *The proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS CoV-2 or n-COV19), the cause of COVID-19.* The protein journal, 2020. **39**: p. 198-216.
19. Hoffmann, M., et al., *SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor.* cell, 2020. **181**(2): p. 271-280. e8.
20. Mu, J., et al., *SARS-CoV-2-encoded nucleocapsid protein acts as a viral suppressor of RNA interference in cells.* Science China Life Sciences, 2020. **63**(9): p. 1-4.
21. Voß, D., et al., *Studies on membrane topology, N-glycosylation and functionality of SARS-CoV membrane protein.* Virology journal, 2009. **6**(1): p. 1-13.
22. Schoeman, D. and B.C. Fielding, *Coronavirus envelope protein: current knowledge.* Virology journal, 2019. **16**(1): p. 1-22.

Références bibliographiques

23. Gordon, D.E., et al., *A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing*. Nature, 2020. **583**(7816): p. 459-468.
24. *A Review of the SARS-CoV-2 (COVID-19) Genome and Proteome*. 2020; Available from: https://www.genetex.com/MarketingMaterial/Index/SARS-CoV-2_Genome_and_Proteome#table1.
25. Dr. Liji Thomas, M. *La protéine de SARS-CoV-2 Neucleocapside (n) est fortement glycosylée*. 2020; Available from: <https://www.news-medical.net/news/20200830/10/French.aspx>.
26. Toussaint, C., *Les hélicases*. 1995.
27. Jauregui, A.R., et al., *Identification of residues of SARS-CoV nsp1 that differentially affect inhibition of gene expression and antiviral signaling*. PloS one, 2013. **8**(4): p. e62416.
28. Cornillez-Ty, C.T., et al., *Severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural protein 2 interacts with a host protein complex involved in mitochondrial biogenesis and intracellular signaling*. Journal of virology, 2009. **83**(19): p. 10314-10318.
29. Báez-Santos, Y.M., S.E.S. John, and A.D. Mesecar, *The SARS-coronavirus papain-like protease: structure, function and inhibition by designed antiviral compounds*. Antiviral research, 2015. **115**: p. 21-38.
30. Sakai, Y., et al., *Two-amino acids change in the nsp4 of SARS coronavirus abolishes viral replication*. Virology, 2017. **510**: p. 165-174.
31. Wu, C., et al., *Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods*. Acta Pharmaceutica Sinica B, 2020. **10**(5): p. 766-788.
32. Angelini, M.M., et al., *Severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural proteins 3, 4, and 6 induce double-membrane vesicles*. MBio, 2013. **4**(4).
33. Cottam, E.M., M.C. Whelband, and T. Wileman, *Coronavirus NSP6 restricts autophagosome expansion*. Autophagy, 2014. **10**(8): p. 1426-1441.
34. Kirchdoerfer, R.N. and A.B. Ward, *Structure of the SARS-CoV nsp12 polymerase bound to nsp7 and nsp8 co-factors*. Nature communications, 2019. **10**(1): p. 1-9.
35. Snijder, E., E. Decroly, and J. Ziebuhr, *The nonstructural proteins directing coronavirus RNA synthesis and processing*. Advances in virus research, 2016. **96**: p. 59-126.
36. Jang, K.-J., et al., *A high ATP concentration enhances the cooperative translocation of the SARS coronavirus helicase nsP13 in the unwinding of duplex RNA*. Scientific reports, 2020. **10**(1): p. 1-13.
37. Deng, X., et al., *Coronavirus nonstructural protein 15 mediates evasion of dsRNA sensors and limits apoptosis in macrophages*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2017. **114**(21): p. E4251-E4260.
38. Gouilh, A.V.M.A., *coronavirus*.
39. Mourier, T., et al., *Host-directed editing of the SARS-CoV-2 genome*. Biochemical and biophysical research communications, 2020.
40. *Préparation et riposte aux situations d'urgence / Un variant du SARS-CoV-2* 31 décembre 2020; Available from: <https://www.who.int/csr/don/31-december-2020-sars-cov2-variants/fr/>.
41. *About Variants of the Virus that Causes COVID-19*. 2021; Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/transmission/variant.html>.
42. *Variant Covid : chiffres en France, symptômes, c'est quoi ?* ; Available from: <https://sante.journaldesfemmes.fr/fiches-maladies/2685453-mutation-coronavirus-variant-covid-19-france-symptomes-definition-angleterre-bresil-sud-africain-californien/#variant-californien-covid>.
43. Zimmer, C. *New California Variant May Be Driving Virus Surge There, Study Suggests*. Jan. 19, 2021; Available from: <https://www.nytimes.com/2021/01/19/health/coronavirus-variant-california.html>.

Références bibliographiques

44. Zhou, P., et al., *A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin*. *nature*, 2020. **579**(7798): p. 270-273.
45. Xu, X., et al., *Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission*. *Science China Life Sciences*, 2020. **63**(3): p. 457-460.
46. Daly, J.L., et al., *Neuropilin-1 is a host factor for SARS-CoV-2 infection*. *Science*, 2020. **370**(6518): p. 861-865.
47. Cantuti-Castelvetri, L., et al., *Neuropilin-1 facilitates SARS-CoV-2 cell entry and infectivity*. *Science*, 2020. **370**(6518): p. 856-860.
48. Rahman, N., et al., *Virtual screening of natural products against Type II transmembrane serine protease (TMPRSS2), the priming agent of coronavirus 2 (SARS-CoV-2)*. *Molecules*, 2020. **25**(10): p. 2271.
49. Chu, H., et al., *Comparative tropism, replication kinetics, and cell damage profiling of SARS-CoV-2 and SARS-CoV with implications for clinical manifestations, transmissibility, and laboratory studies of COVID-19: an observational study*. *The Lancet Microbe*, 2020. **1**(1): p. e14-e23.
50. Wurtz, N., et al., *Culture of SARS-CoV-2 in a panel of laboratory cell lines, permissivity, and differences in growth profile*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2021: p. 1-8.
51. Cagno, V., *SARS-CoV-2 cellular tropism*. *The Lancet Microbe*, 2020. **1**(1): p. e2-e3.
52. Varghese, P.M., et al., *Host-pathogen interaction in COVID-19: Pathogenesis, potential therapeutics and vaccination strategies*. *Immunobiology*, 2020: p. 152008.
53. Amir, I.J. and Z. Lebar, *Covid-19: virologie, épidémiologie et diagnostic biologique*. *Option/Bio*, 2020. **31**(619): p. 15.
54. *SARS-CoV-2 Life Cycle: Stages and Inhibition Targets*. Available from: <https://www.antibodies-online.com/resources/18/5410/sars-cov-2-life-cycle-stages-and-inhibition-targets/>.
55. Machhi, J., et al., *The natural history, pathobiology, and clinical manifestations of SARS-CoV-2 infections*. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 2020: p. 1-28.
56. V'kovski, P., et al., *Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2*. *Nature Reviews Microbiology*, 2020: p. 1-16.
57. *Coronavirus*. Available from: https://www.who.int/fr/health-topics/coronavirus/coronavirus#tab=tab_1.
58. *Covid-19, une maladie infectieuse*. Available from: <https://www.covireivac.fr/glossaire/covid19/>.
59. Backer, J.A., D. Klinkenberg, and J. Wallinga, *Incubation period of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) infections among travellers from Wuhan, China, 20–28 January 2020*. *Eurosurveillance*, 2020. **25**(5): p. 2000062.
60. Plaçais, L. and Q. Richier, *COVID-19: Clinical, biological and radiological characteristics in adults, infants and pregnant women. An up-to-date review at the heart of the pandemic*. *La Revue de medecine interne*, 2020.
61. Organization, W.H., *Novel Coronavirus (2019-nCoV): situation report, 3*. 2020.
62. Liu, Y., et al., *The reproductive number of COVID-19 is higher compared to SARS coronavirus*. *Journal of travel medicine*, 2020.
63. Karimzadeh, S., R. Bhopal, and H.N. Tien, *Review of infective dose, routes of transmission, and outcome of COVID-19 caused by the SARS-CoV-2 Virus: comparison with other respiratory viruses*. 2020.
64. To, K.K.-W., et al., *Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study*. *The Lancet Infectious Diseases*, 2020. **20**(5): p. 565-574.

Références bibliographiques

65. Chan, J.F.-W., et al., *A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster*. The lancet, 2020. **395**(10223): p. 514-523.
66. Chen, W., et al., *Detectable 2019-nCoV viral RNA in blood is a strong indicator for the further clinical severity*. Emerging microbes & infections, 2020. **9**(1): p. 469-473.
67. Wang, W., et al., *Detection of SARS-CoV-2 in different types of clinical specimens*. Jama, 2020. **323**(18): p. 1843-1844.
68. Wu, P., et al., *Characteristics of ocular findings of patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19) in Hubei Province, China*. JAMA ophthalmology, 2020. **138**(5): p. 575-578.
69. Verity, R., et al., *Estimates of the severity of coronavirus disease 2019: a model-based analysis*. The Lancet infectious diseases, 2020. **20**(6): p. 669-677.
70. *Risk factors and risk groups*. 2020; Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/latest-evidence/epidemiology>.
71. Pijls, B.G., et al., *Demographic risk factors for COVID-19 infection, severity, ICU admission and death: a meta-analysis of 59 studies*. BMJ open, 2021. **11**(1): p. e044640.
72. De Almeida, L.F. and T.M. Coimbra, *When less or more isn't enough: Renal maldevelopment arising from disequilibrium in the renin-angiotensin system*. Frontiers in pediatrics, 2019. **7**: p. 296.
73. Alexandre, J., et al. *Renin-angiotensin-aldosterone system and COVID-19 infection*. in *Annales d'endocrinologie*. 2020. Elsevier.
74. *Système rénine-angiotensine-aldostérone et infections à COVID-19*. Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique.
75. Zhang, Q., et al., *Association of angiotensin-converting enzyme 2 gene polymorphism and enzymatic activity with essential hypertension in different gender: A case-control study*. Medicine, 2018. **97**(42).
76. Ciaglia, E., C. Vecchione, and A.A. Puca, *COVID-19 infection and circulating ACE2 levels: protective role in women and children*. Frontiers in pediatrics, 2020. **8**: p. 206.
77. Guan, W.-j., et al., *Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China*. New England journal of medicine, 2020. **382**(18): p. 1708-1720.
78. Jin, Y., et al., *Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of COVID-19*. Viruses, 2020. **12**(4): p. 372.
79. Sharon E. Fox, et al., *Pulmonary and Cardiac Pathology in Covid-19: The First Autopsy Series from New Orleans*. 2020.
80. Ling, Y., et al., *Persistence and clearance of viral RNA in 2019 novel coronavirus disease rehabilitation patients*. Chinese medical journal, 2020.
81. De Greef, J., et al., *COVID-19: infection par le virus SARS-CoV-2*. Louvain médical, 2020. **139**: p. 290.
82. Helms, J., et al., *Neurologic features in severe SARS-CoV-2 infection*. New England Journal of Medicine, 2020. **382**(23): p. 2268-2270.
83. Troyer, E.A., J.N. Kohn, and S. Hong, *Are we facing a crashing wave of neuropsychiatric sequelae of COVID-19? Neuropsychiatric symptoms and potential immunologic mechanisms*. Brain, behavior, and immunity, 2020.
84. Finlay, B.B. and G. McFadden, *Anti-immunology: evasion of the host immune system by bacterial and viral pathogens*. Cell, 2006. **124**(4): p. 767-782.
85. Wang, D., et al., *Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China*. Jama, 2020. **323**(11): p. 1061-1069.
86. Huang, C., et al., *Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China*. The lancet, 2020. **395**(10223): p. 497-506.
87. Mehta, P., et al., *COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression*. The lancet, 2020. **395**(10229): p. 1033-1034.

Références bibliographiques

88. Ziegler, C.G., et al., *SARS-CoV-2 receptor ACE2 is an interferon-stimulated gene in human airway epithelial cells and is detected in specific cell subsets across tissues*. *Cell*, 2020. **181**(5): p. 1016-1035. e19.
89. Boudewijns, R., et al., *STAT2 signaling as double-edged sword restricting viral dissemination but driving severe pneumonia in SARS-CoV-2 infected hamsters*. *BioRxiv*, 2020.
90. Sette, A. and S. Crotty, *Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19*. *Cell*, 2021.
91. Moderbacher, C.R., et al., *Antigen-specific adaptive immunity to SARS-CoV-2 in acute COVID-19 and associations with age and disease severity*. *Cell*, 2020. **183**(4): p. 996-1012. e19.
92. Galani, I.-E., et al., *Untuned antiviral immunity in COVID-19 revealed by temporal type I/III interferon patterns and flu comparison*. *Nature immunology*, 2021. **22**(1): p. 32-40.
93. Brouwer, P.J., et al., *Potent neutralizing antibodies from COVID-19 patients define multiple targets of vulnerability*. *Science*, 2020. **369**(6504): p. 643-650.
94. Dan, J.M., et al., *Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection*. *Science*, 2021.
95. Lundgren, J.D., et al., *A Neutralizing Monoclonal Antibody for Hospitalized Patients with Covid-19*. *The New England journal of medicine*, 2020.
96. El Hasbani, G., et al., *COVID-19, Antiphospholipid Antibodies, and Catastrophic Antiphospholipid Syndrome: A Possible Association?* *Clinical Medicine Insights: Arthritis and Musculoskeletal Disorders*, 2020. **13**: p. 1179544120978667.
97. Malas, M.B., et al., *Thromboembolism risk of COVID-19 is high and associated with a higher risk of mortality: A systematic review and meta-analysis*. *EClinicalMedicine*, 2020. **29**: p. 100639.
98. Luis Ortega-Paz, D.C., Gilles Montalescot, and Dominick J. Angiolillo, *Coronavirus Disease 2019–Associated Thrombosis and Coagulopathy: Review of the Pathophysiological Characteristics and Implications for Antithrombotic Management*. *Journal of the American Heart Association*. , 2020.
99. Okba, N.M., et al., *Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2– specific antibody responses in coronavirus disease patients*. *Emerging infectious diseases*, 2020. **26**(7): p. 1478-1488.
100. Amanat, F., et al., *A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans*. *Nature medicine*, 2020. **26**(7): p. 1033-1036.
101. Ledford, H., *COVID-19 reinfection: three questions scientists are asking*. *Nature*, 2020. **585**: p. 168-169.
102. Duggan, N.M., et al., *Is novel coronavirus 2019 reinfection possible? Interpreting dynamic SARS-CoV-2 test results*. *The American Journal of Emergency Medicine*, 2021. **39**: p. 256. e1-256. e3.
103. Weisblum, Y., F. Schmidt, and F. Zhang, *Escape from neutralizing antibodies by SARS-CoV-2 spike protein variants*. *bioRxiv*. Posted online, 2020. **22**.
104. To, K.K.-W., et al., *Coronavirus disease 2019 (COVID-19) re-infection by a phylogenetically distinct severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 strain confirmed by whole genome sequencing*. *Clinical Infectious Diseases*, 2020.
105. Organization, W.H., *WHO COVID-19 case definition*. 2020, World Health Organization.
106. Pascarella, G., et al., *COVID-19 diagnosis and management: a comprehensive review*. *Journal of internal medicine*, 2020. **288**(2): p. 192-206.
107. *CODIV-19 et détection moléculaire du SARS-CoV-2 chez les individus asymptomatiques*. Available from: https://www.inesss.qc.ca/fileadmin/doc/INESSS/COVID-19/COVID-19_INESSS_detection_moleculaire_individus_asymptomatiques.pdf.
108. Carl Heneghan, J.B., Tom Jefferson, *COVID-19: What proportion are asymptomatic?* *The Centre for Evidence-Based Medicine*, April 6, 2020.

Références bibliographiques

109. Cella, L., et al., *Injuries from asymptomatic COVID-19 disease: new hidden toxicity risk factors in thoracic radiation therapy*. International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics, 2020. **108**(2): p. 394-396.
110. Wong, C.K., et al., *Clinical presentations, laboratory and radiological findings, and treatments for 11,028 COVID-19 patients: a systematic review and meta-analysis*. Scientific reports, 2020. **10**(1): p. 1-16.
111. Siordia Jr, J.A., *Epidemiology and clinical features of COVID-19: A review of current literature*. Journal of Clinical Virology, 2020: p. 104357.
112. Hassan, S.A., et al., *Coronavirus (COVID-19): a review of clinical features, diagnosis, and treatment*. Cureus, 2020. **12**(3).
113. Wu, C., et al., *Risk factors associated with acute respiratory distress syndrome and death in patients with coronavirus disease 2019 pneumonia in Wuhan, China*. JAMA internal medicine, 2020. **180**(7): p. 934-943.
114. Zhou, F., et al., *Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study*. The lancet, 2020. **395**(10229): p. 1054-1062.
115. Zu, Z.Y., et al., *Coronavirus disease 2019 (COVID-19): a perspective from China*. Radiology, 2020. **296**(2): p. E15-E25.
116. Li, K., et al., *The clinical and chest CT features associated with severe and critical COVID-19 pneumonia*. Investigative radiology, 2020.
117. Shi, H., et al., *Radiological findings from 81 patients with COVID-19 pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study*. The Lancet infectious diseases, 2020. **20**(4): p. 425-434.
118. Lodé, B., et al., *Imagerie de la pneumonie COVID-19*. Journal d'imagerie diagnostique et interventionnelle, 2020. **3**(4): p. 249-258.
119. Bastard, P., et al., *Autoantibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19*. Science, 2020. **370**(6515).
120. Zhang, Q., et al., *Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19*. Science, 2020. **370**(6515).
121. Chen, H., et al., *Clinical characteristics and intrauterine vertical transmission potential of COVID-19 infection in nine pregnant women: a retrospective review of medical records*. The lancet, 2020. **395**(10226): p. 809-815.
122. D'Antiga, L., *Coronaviruses and immunosuppressed patients: the facts during the third epidemic*. Liver Transplantation, 2020. **26**(6): p. 832-834.
123. Liang, W., et al., *Cancer patients in SARS-CoV-2 infection: a nationwide analysis in China*. The lancet oncology, 2020. **21**(3): p. 335-337.
124. Zhang, L., et al., *Clinical characteristics of COVID-19-infected cancer patients: a retrospective case study in three hospitals within Wuhan, China*. Annals of oncology, 2020. **31**(7): p. 894-901.
125. Wei, M., et al., *Novel coronavirus infection in hospitalized infants under 1 year of age in China*. Jama, 2020. **323**(13): p. 1313-1314.
126. Desvaux, É. and J.-F. Faucher, *Covid-19: aspects cliniques et principaux éléments de prise en charge*. Revue Francophone des Laboratoires, 2020. **2020**(526): p. 40-47.
127. Bonny, V., et al., *COVID-19: Pathogenesis of a multi-faceted disease*. La Revue de Medecine Interne, 2020.
128. Gautret, P., et al., *Clinical efficacy and safety profile of hydroxychloroquine and azithromycin against COVID-19*. International Journal of Antimicrobial Agents, 2021. **57**(1): p. 106242.
129. Gautret, P., et al., *Hydroxychloroquine and azithromycin as a treatment of COVID-19: results of an open-label non-randomized clinical trial*. International journal of antimicrobial agents, 2020. **56**(1): p. 105949.

Références bibliographiques

130. Rosenberg, E.S., et al., *Association of treatment with hydroxychloroquine or azithromycin with in-hospital mortality in patients with COVID-19 in New York State*. *Jama*, 2020. **323**(24): p. 2493-2502.
131. Monteil, V., et al., *Inhibition of SARS-CoV-2 infections in engineered human tissues using clinical-grade soluble human ACE2*. *Cell*, 2020. **181**(4): p. 905-913. e7.
132. Khan, A., et al., *A pilot clinical trial of recombinant human angiotensin-converting enzyme 2 in acute respiratory distress syndrome*. *Critical care*, 2017. **21**(1): p. 1-9.
133. Siegel, D., et al., *Discovery and synthesis of a phosphoramidate prodrug of a pyrrolo [2, 1-f][triazin-4-amino] adenine C-nucleoside (GS-5734) for the treatment of Ebola and emerging viruses*. 2017, ACS Publications.
134. *Covid-19 : l’OMS déconseille l’utilisation du remdesivir*. 20 novembre 2020; Available from: https://news.un.org/fr/story/2020/11/1082772?fbclid=IwAR2EVDt4CC_6CJh5KGvbbMJk0ioT UJs6-cl-0FpClx5fko7C1EqlwsP7tGc.
135. Wang, M., et al., *Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro*. *Cell research*, 2020. **30**(3): p. 269-271.
136. Furuta, Y., T. Komeno, and T. Nakamura, *Favipiravir (T-705), a broad spectrum inhibitor of viral RNA polymerase*. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 2017. **93**(7): p. 449-463.
137. Hossen, M.S., et al., *A review on current repurposing drugs for the treatment of COVID-19: reality and challenges*. *SN comprehensive clinical medicine*, 2020: p. 1-13.
138. Caly, L., et al., *The FDA-approved drug ivermectin inhibits the replication of SARS-CoV-2 in vitro*. *Antiviral research*, 2020. **178**: p. 104787.
139. Matusik, É., M. Ayadi, and N. Picard, *Covid-19, prise en charge, pistes thérapeutiques et vaccinales*. *Actualités Pharmaceutiques*, 2020. **59**(599): p. 27-33.
140. Mair-Jenkins, J., et al., *The effectiveness of convalescent plasma and hyperimmune immunoglobulin for the treatment of severe acute respiratory infections of viral etiology: a systematic review and exploratory meta-analysis*. *The Journal of infectious diseases*, 2015. **211**(1): p. 80-90.
141. *PROTOCOLE D’UTILISATION THERAPEUTIQUE : Plasma convalescent COVID-19 Infection par le coronavirus SARS-CoV-2 (maladie COVID-19)*. 24 avril 2020.
142. *relatif à l’utilisation thérapeutique de plasma de convalescents chez les malades atteints de Covid-19*. Haut Conseil de la santé publique, 27 avril 2020.
143. Xie, Y., et al., *Effect of regular intravenous immunoglobulin therapy on prognosis of severe pneumonia in patients with COVID-19*. *The Journal of infection*, 2020.
144. Hung, I.F.-N., et al., *Triple combination of interferon beta-1b, lopinavir-ritonavir, and ribavirin in the treatment of patients admitted to hospital with COVID-19: an open-label, randomised, phase 2 trial*. *The Lancet*, 2020. **395**(10238): p. 1695-1704.
145. Wang, Y., et al., *Early, low-dose and short-term application of corticosteroid treatment in patients with severe COVID-19 pneumonia: single-center experience from Wuhan, China*. *MedRxiv*, 2020.
146. Maes, T., K. Bracke, and G.G. Brusselle, *COVID-19, asthma, and inhaled corticosteroids: another beneficial effect of inhaled corticosteroids?* 2020, American Thoracic Society.
147. Callaway, E., *The race for coronavirus vaccines: a graphical guide*. *Nature*, 2020. **580**(7805): p. 576.
148. Dai, L. and G.F. Gao, *Viral targets for vaccines against COVID-19*. *Nature Reviews Immunology*, 2020: p. 1-10.
149. Québec, C.s.l.i.d., *Caractéristiques des vaccins candidats contre la COVID-19 et enjeux relatifs à leur utilisation au Québec AVIS DU COMITÉ SUR L’IMMUNISATION DU QUÉBEC*. 7 octobre 2020.
150. Lotfi, M., M.R. Hamblin, and N. Rezaei, *COVID-19: Transmission, prevention, and potential therapeutic opportunities*. *Clinica chimica acta*, 2020.

Références bibliographiques

151. Guen, A.-L., et al., *Fiche: Gestion des prélèvements biologiques d'un patient suspect ou confirmé de COVID-19 Version 6*.2020.
152. SIMON, F. *Covid 19* 11 déc. 2020; Available from: <https://www.mesvaccins.net/web/covid-19.html?fbclid=IwAR0UpFT--tFstKzBnk-8W-kl67cEVk0ur8jj7OORN5wT87j2TexJlVgAHyY>.
153. Sethuraman, N., S.S. Jeremiah, and A. Ryo, *Interpreting diagnostic tests for SARS-CoV-2*.*Jama*, 2020. **323**(22): p. 2249-2251.
154. Santé, H.A.d., *Cahier des charges définissant les modalités d'évaluation des performances des tests sérologiques détectant les anticorps dirigés contre le SARS-CoV-2*. 2020, Haute Autorité de Santé France.
155. *Place des tests sérologiques dans la stratégie de prise en charge de la maladie COVID-19*. 1er mai 2020, Haute Autorité de santé.
156. Che, X.-y., et al., *Antigenic Cross-Reactivity between Severe Acute Respiratory Syndrome—Associated Coronavirus and Human Coronaviruses 229E and OC43*.*Journal of Infectious Diseases*, 2005. **191**(12): p. 2033-2037.
157. Gorse, G.J., M.M. Donovan, and G.B. Patel, *Antibodies to coronaviruses are higher in older compared with younger adults and binding antibodies are more sensitive than neutralizing antibodies in identifying coronavirus-associated illnesses*.*Journal of medical virology*, 2020. **92**(5): p. 512-517.
158. mondiale de la Santé, O., *Détection des antigènes à l'aide de tests immunologiques rapides pour le diagnostic de l'infection à SARS-CoV-2: orientations provisoires, 11 septembre 2020*. 2020, Organisation mondiale de la Santé.
159. santé, H.H.A.d., *Revue rapide sur les tests de détection antigénique du virus SARS-CoV-2*. octobre 2020.
160. Croville, G., *Séquençage et PCR à haut débit: application à la détection et la caractérisation d'agents pathogènes respiratoires aviaires et au contrôle de pureté microbiologique des vaccins*. 2017, PSL Research University.
161. *DNA Purification : This guide provides a comprehensive introduction to DNA and RNA purification methods, including the basics of DNA isolation, plasmid growth and nucleic acid quantification.*; Available from: https://worldwide.promega.com/resources/guides/nucleic-acid-analysis/dna-purification/?fbclid=IwAR2o8zIsOxdeYqSGPDy_wrBlGF5rpLdBBu3lQyZm3yo3BpXLpIXsTj7KXUA.
162. *Si-Mag™ Magnetic Beads for DNA Extraction and Purification and Kits*. Available from: <https://mvspacific.com/REAGENTS/DNA%20Isolation%20Kits.htm>.
163. Tagu, D., *Principe des techniques de biologie moléculaire et génomique: 3e édition revue et augmentée*. 2018: Editions Quae.
164. *AU CŒUR DE L'ADN*. Available from: <https://www.gnis-pedagogie.org/sujet/coeur-adn/?fbclid=IwAR0cLQNYOyXEg9dz7AagMUADbecPo0JyeS5EnzhZrqYqVFO6EwjpBmeQl>.
165. *Real-time PCR handbook*.
166. Ravi, N., et al., *Diagnostics for SARS-CoV-2 detection: A comprehensive review of the FDA-EUA COVID-19 testing landscape*.*Biosensors and Bioelectronics*, 2020. **165**: p. 112454.
167. Poitras, E. and A. Houde, *La PCR en temps réel: principes et applications*.*Reviews in biology and biotechnology*, 2002. **2**(2): p. 2-11.
168. Yüce, M., E. Filiztekin, and K.G. Özkaya, *COVID-19 diagnosis—A review of current methods*.*Biosensors and Bioelectronics*, 2020: p. 112752.
169. Ninove, L., *Approche optimisée du diagnostic moléculaire des infections virales: application à la pandémie de grippe A/H1N1*. 2011, Aix-Marseille 2.
170. Rosenstraus, M., et al., *An internal control for routine diagnostic PCR: design, properties, and effect on clinical performance*. *Journal of clinical microbiology*, 1998. **36**(1): p. 191-197.

Références bibliographiques

171. *Choosing an Endogenous Control for Gene Expression Analysis Using Real-Time PCR (qPCR)*. Available from: <https://www.thermofisher.com/dz/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/gene-expression-analysis-real-time-pcr-information/choosing-endogenous-control-gene-expression-analysis-real-time-pcr.html>.
172. Mori, Y. and T. Notomi, *Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases*. *Journal of infection and chemotherapy*, 2009. **15**(2): p. 62-69.
173. Lalli, M.A., et al., *Rapid and extraction-free detection of SARS-CoV-2 from saliva with colorimetric LAMP*. *Medrxiv*, 2020.
174. Kellner, M.J., et al., *A rapid, highly sensitive and open-access SARS-CoV-2 detection assay for laboratory and home testing*. 2020.
175. Fu, S., et al., *Applications of loop-mediated isothermal DNA amplification*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 2011. **163**(7): p. 845-850.
176. Yuan, X., et al., *Current and perspective diagnostic techniques for COVID-19*. *ACS infectious diseases*, 2020. **6**(8): p. 1998-2016.
177. Berthet, N., et al., *Les puces à ADN en virologie: concepts de base et applications pour la détection des virus*. *Virologie*, 2013. **17**(2): p. 61-80.
178. Jalandra, R., et al., *Strategies and perspectives to develop SARS-CoV-2 detection methods and diagnostics*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2020: p. 110446.
179. mondiale de la Santé, O., *Tests diagnostiques pour le dépistage du SARS-CoV-2: orientations provisoires, 11 septembre 2020*. 2020, Organisation mondiale de la Santé.
180. Lamoril, J., et al., *Les techniques de séquençage de l'ADN: une révolution en marche. première partie*. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, 2008. **23**(5): p. 260-279.
181. *Next Generation Sequencing (NGS) An Introduction*. Available from: https://old.abmgood.com/marketing/knowledge_base/next_generation_sequencing_introduction.php?fbclid=IwAR3KbxzZ4JYY0AzOMW7xsDbPaUWftkmf_dYDym5q8YN-oanN9xHuUOYWVF4.
182. Metzker, M.L., *Sequencing technologies—the next generation*. *Nature reviews genetics*, 2010. **11**(1): p. 31-46.
183. Gharizadeh, B., et al., *Long-read pyrosequencing using pure 2'-deoxyadenosine-5'-O'-(1-thiotriphosphate) Sp-isomer*. *Analytical biochemistry*, 2002. **301**(1): p. 82-90.
184. Ronaghi, M., M. Uhlén, and P. Nyérén, *A sequencing method based on real-time pyrophosphate*. *Science*, 1998. **281**(5375): p. 363-365.
185. Desai, A.N. and A. Jere, *Next-generation sequencing: ready for the clinics?* *Clinical genetics*, 2012. **81**(6): p. 503-510.
186. Loman, N.J., et al., *Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms*. *Nature biotechnology*, 2012. **30**(5): p. 434-439.
187. Ondov, B.D., et al., *Efficient mapping of Applied Biosystems SOLiD sequence data to a reference genome for functional genomic applications*. *Bioinformatics*, 2008. **24**(23): p. 2776-2777.
188. Hsiao, Y.-P., et al., *Advances and Applications of Ion Torrent Personal Genome Machine in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma Reveal Novel Gene Mutations*. *Materials*, 2016. **9**(6): p. 464.
189. Shendure, J., et al., *Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome*. *Science*, 2005. **309**(5741): p. 1728-1732.
190. Drmanac, R., et al., *Human genome sequencing using unchained base reads on self-assembling DNA nanoarrays*. *Science*, 2010. **327**(5961): p. 78-81.
191. Orlando, L., et al., *True single-molecule DNA sequencing of a pleistocene horse bone*. *Genome research*, 2011. **21**(10): p. 1705-1719.

Références bibliographiques

192. Clarke, J., et al., *Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing*. Nature nanotechnology, 2009. **4**(4): p. 265-270.
193. He, M., X. Chi, and J. Ren, *Applications of Oxford Nanopore Sequencing in Schizosaccharomyces pombe*, in *Yeast Protocols*. 2021, Springer. p. 97-116.
194. Eid, J., et al., *Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules*. Science, 2009. **323**(5910): p. 133-138.
195. Song, C.-X., et al., *Sensitive and specific single-molecule sequencing of 5-hydroxymethylcytosine*. Nature methods, 2012. **9**(1): p. 75-77.
196. Pennisi, E., *Semiconductors inspire new sequencing technologies*. 2010, American Association for the Advancement of Science.
197. Berglund, E.C., A. Kiiialainen, and A.-C. Syvänen, *Next-generation sequencing technologies and applications for human genetic history and forensics*. Investigative genetics, 2011. **2**(1): p. 1-15.
198. Ilie, M., et al., *Les méthodes de séquençage de «nouvelle génération»(NGS) et le cancer broncho-pulmonaire: principales technologies, applications et limites actuelles en pathologie*. Revue Francophone des Laboratoires, 2014. **2014**(458): p. 51-58.
199. mondiale de la Santé, O., *Guide de production locale: formulations des produits hydro-alcooliques recommandés par l’OMS*. 2010, Organisation mondiale de la Santé.
200. *How to Make Strong (0.5%) Chlorine Solution from Liquid Bleach*.
201. Organization, W.H., *Laboratory biosafety guidance related to coronavirus disease 2019 (COVID-19): interim guidance, 13 May 2020* 2020, World Health Organization.
202. SALOMON, J. and B. WORMS, *Avis du 25 septembre 2020 de la Société Française de Microbiologie (SFM) relatif à l’interprétation de la valeur de Ct (estimation de la charge virale) obtenue en cas de RT-PCR SARS-CoV-2 positive sur les prélèvements cliniques réalisés à des fins diagnostiques ou de dépistage Version 4*. 2020.
203. Jaafar, R., et al., *Correlation Between 3790 Quantitative Polymerase Chain Reaction–Positives Samples and Positive Cell Cultures, Including 1941 Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Isolates*. Clinical Infectious Diseases, 2020.
204. Grant, P.R., et al., *Extraction-free COVID-19 (SARS-CoV-2) diagnosis by RT-PCR to increase capacity for national testing programmes during a pandemic*. BioRxiv, 2020.
205. *Annuaire statistique Année 2018 / Direction de la Programmation et du Suivi Budgétaires* M.d.F.D.G.d. Budget, Editor. 2018.
206. Baradaran, A., et al., *Prevalence of comorbidities in COVID-19 patients: A systematic review and meta-analysis*. Archives of Bone and Joint Surgery, 2020. **8**(Suppl 1): p. 247.
207. Liu, H., et al., *Comorbid chronic diseases are strongly correlated with disease severity among COVID-19 patients: a systematic review and meta-analysis*. Aging and disease, 2020. **11**(3): p. 668.
208. Zare-Zardini, H., et al., *Coronavirus disease 2019 (COVID-19) in children: prevalence, diagnosis, clinical symptoms, and treatment*. International Journal of General Medicine, 2020. **13**: p. 477.
209. Keeley, P., et al., *Symptom burden and clinical profile of COVID-19 deaths: a rapid systematic review and evidence summary*. BMJ supportive & palliative care, 2020. **10**(4): p. 381-384.
210. Yang, J., et al., *Prevalence of comorbidities and its effects in patients infected with SARS-CoV-2: a systematic review and meta-analysis*. International Journal of Infectious Diseases, 2020. **94**: p. 91-95.
211. *MORTALITY ANALYSES*. Available from: https://coronavirus.jhu.edu/data/mortality?fbclid=IwAR3ltEvR5edsIUm4MqN4V-sOm9gyaDC1uUNFeylOhZlXvnTL8Z_iq_ieFpk.
212. Peckham, H., et al., *Male sex identified by global COVID-19 meta-analysis as a risk factor for death and ICU admission*. Nature communications, 2020. **11**(1): p. 1-10.

Références bibliographiques

213. *Décret exécutif n° 20-109 du 12 Ramadhan 1441 correspondant au 5 mai 2020 relatif aux mesures exceptionnelles destinées à la facilitation de l'approvisionnement du marché national en produits pharmaceutiques, en dispositifs médicaux et en équipements de détection en riposte à la pandémie du Coronavirus (COVID-19).*JOURNAL OFFICIEL DE LA REPUBLIQUE ALGERIENNE N° 27.
214. Yanez, N.D., et al., *COVID-19 mortality risk for older men and women.* BMC Public Health, 2020. **20**(1): p. 1-7.
215. Touret, F., et al., *In vitro screening of a FDA approved chemical library reveals potential inhibitors of SARS-CoV-2 replication.* Scientific reports, 2020. **10**(1): p. 1-8.
216. *WHO Emergency Use Assessment Coronavirus disease (COVID-19) IVDs PUBLIC REPORT Product: Detection Kit for 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV) RNA (PCR-Fluorescence Probing).* August 2020, version 1.0.
217. *Note N °33 : Relative à la mise à jour des modalités de Surveillance , détection , notifications et conduite à tenu devant un Cas suspect, probable ou confirmé d'infection covid-19 / Direction Générale de la Prévention et de la Promotion de la Santé / Ministère de la sante, de la population et de la réforme hospitalière.*
218. *NukEx Pure RNA/DNA Instruction Manual Version 2.4 / 22.09.2014.*

Résumé :

L'écllosion de la COVID-19 en Algérie en Février 2020 a imposé des actions rapides pour prendre en charge les malades ; le laboratoire de diagnostic moléculaire de l'infection SARS-CoV-2 de l'UMMTO est à notre connaissance le premier laboratoire universitaire Algérien à s'être imposé comme principal acteur du diagnostic de la COVID-19 dans la Wilaya.

Nos principaux objectifs sont de partager l'expérience du laboratoire acquise durant ces mois d'activités sur le plan technique et logistique puis de mettre la lumière sur la situation sanitaire liée à la COVID-19.

Au 31 Décembre 2020, nous avons traité 12079 échantillons, dont 49% de positifs étalés sur deux pics épidémiques, ces derniers proviennent de l'ensemble des Dairas de la Wilaya de Tizi-Ouzou. Celles qui sont les plus touchés par la mortalité sont Tizi-Ouzou, LNI et Ain el Hammam.

La symptomatologie la plus fréquente est celle de la COVID bénigne chez les positifs de la population générale et ceux de la COVID sévère chez les décès positifs, qui de plus, touche les âges extrêmes et plus le sexe masculin que le féminin.

Les comorbidités les plus récentes sont les maladies cardiovasculaires et le diabète.

Le suivi de l'évolution de la charge virale moyenne des positifs peut constituer un modèle de suivi de l'évolution de l'état sanitaire lié à la COVID-19.

Mots clés : qRT-PCR, COVID-19, SRAS-CoV-2, Coronavirus, charge virale, cycle seuil, épidémie, Tizi-Ouzou, UMMTO.

SUMMARY:

COVID-19 outbreak in Algeria since February 2020 imposed quick healthcare measures to take in charge patients, the UMMTO'S SARS-CoV-2 molecular diagnostic laboratory is to our knowledge the first Algerian university laboratory to impose itself as the leader of COVID-19 diagnosis in the Wilaya of Tizi-Ouzou.

Our main objectives were to share our experience in the technical and logistical fields then to share our data on the health situation from our perspective.

By December 31st 2020, we tested 12076 samples, 49% were positive to SARS-CoV-2 throughout 02 epidemic peaks. The demand came from all the Dairas of the Wilaya of Tizi-Ouzou. Those who recorded the highest death tall were the Dairas of Tizi-Ouzou, LNI, and Ain El Hammam.

The main symptoms reported were those of benign COVID in general population positives, and severe COVID in death's positives, the latter were more prevalent in extreme ages and in men more than in women.

The main comorbidities reported were cardiovascular diseases and diabetes.

The evolution of the daily mean viral load in positive individuals may constitute a model to follow the global evolution of the health situation related to COVID-19.

Keywords : qRT-PCR, COVID-19, SARS-CoV-2, Coronavirus, viral load, threshold cycle, epidemic, Tizi-Ouzou, UMMTO.