

Biologie de l'infection au SRAS-CoV-2

B. BELAID, S.Y. RAHALI, R. DJIDJIK,
Service d'Immunologie Médicale,
CHU Issaad Hassani, Beni Messous, Alger



Résumé

La maladie à coronavirus 2019 (Covid-19) est une maladie infectieuse causée par le syndrome respiratoire aigu sévère coronavirus 2 (SRAS-CoV-2), qui est apparue pour la première fois à Wuhan, en Chine, en décembre 2019 et se propage maintenant dans le monde entier. Une stratégie efficace pour atténuer la pandémie en cours du nouveau coronavirus de 2019 nécessite une compréhension approfondie de sa transmission, de l'immunopathologie de l'infection au SRAS-CoV-2. Les réponses en anticorps spécifiques à l'antigène viral chez les patients Covid-19 ont commencé à être signalées mais il n'y a pas de consensus sur leurs profils. Il y a eu d'énormes progrès dans les tests de diagnostic in vitro (IVD) pour la maladie. Les principaux tests utilisés pour Covid-19 utilisent la réaction en chaîne par polymérase en temps réel de la transcriptase inverse (RT-PCR) qui prend quelques heures. Une large gamme de tests sérologiques tels que les tests ELISA, la chimiluminescence et les tests rapides à flux latéral, qui détectent les anticorps IgM et IgG produites chez les personnes en réponse à une infection par le SRAS-CoV-2. Au cours de l'évolution de la maladie, une évaluation longitudinale de la dynamique du nombre de lymphocytes et des marqueurs inflammatoires, y compris la CRP et l'IL-6, peut aider à identifier les cas de mauvais pronostic et à intervenir rapidement afin d'améliorer les résultats. Les biomarqueurs, tels que la procalcitonine, les D-dimères et la ferritine sériques élevées, sont également apparus comme de mauvais facteurs pronostiques.

>>> Mots-clés :

SRAS-CoV2, Covid-19, coronavirus, épidémiologie, immunopathologie, RT-PCR, sérologie

Introduction

La famille des coronavirus est constituée de virus à ARN, regroupée en quatre sous familles : α -coronavirus, β -coronavirus, γ -coronavirus et δ -coronavirus. Chez l'homme, quatre sont responsables de pathologies bé-

Abstract

Coronavirus disease 2019 (Covid-19) is an infectious disease caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), which first appeared in Wuhan, China in December 2019 and is spreading now all over the world. An effective strategy to mitigate the ongoing pandemic of the new coronavirus of 2019 requires a thorough understanding of its transmission, from the immunopathology of SARS-CoV-2 infection. Antibody responses specific to the viral antigen in Covid-19 patients have started to be reported but there is no consensus on their profiles. There have been huge advances in in vitro diagnostic tests (IVD) for the disease. The main tests used for Covid-19 use the real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) which takes a few hours. A wide range of serological tests such as ELISA, chemiluminescence and rapid lateral flow tests, which detect the IgM and IgG antibodies produced in people in response to SARS-CoV-2 infection. During the course of the disease, a longitudinal assessment of the dynamics of the number of lymphocytes and inflammatory markers, including CRP and IL-6, can help to identify cases of poor prognosis and to act quickly in order to improve results. Biomarkers, such as elevated serum procalcitonin, D-dimers and ferritin, also appeared to be poor prognostic factors.

>>> Key-words :

SARS-CoV2, Covid-19, coronavirus, epidemiology, immunopathology, RT-PCR, serology.

nignes chez les patients immunocompétents (HCoV-229E, OC43, NL63 et HKU1) [1], tandis que le SRAS-CoV-1 et le MERS-CoV potentiellement dangereux, ont été identifiés respectivement en 2003 et 2012 et sont à

l'origine des pathologies sévères mettant en jeu le pronostic vital ^[2].

En 2002-2003, essentiellement en Chine dans la province de Guangdong et à Hong Kong, 8.096 personnes ont été infectées par le SRAS-CoV-1 et 774 personnes avaient succombé suite au même virus. Le MERS-CoV a été responsable, en 2012, d'une épidémie localisée au Moyen Orient puis en 2015 en Corée du sud où le bilan était de 36 morts sur 186 cas confirmés ^[3].

L'hôte naturel de ces deux virus est la chauve-souris. Le SRAS-CoV-1 est passé chez l'homme probablement via la civette, le raton laveur ou encore le furet, alors que le MERS-CoV avait été transmis par le chameau ^[1].

Au début de décembre 2019, Wuhan située dans la province de Hubei en Chine a connu l'apparition de nombreux cas de pneumopathies sévères ne répondant pas aux traitements habituels. La mise en évidence de l'agent responsable a eu lieu un mois plus tard, il s'agit d'un nouveau coronavirus appartenant aux β -coronavirus appelé SRAS-CoV-2 ^[4]. Les premières hypothèses sur la transmission du virus vers l'homme incriminent le pangolin sur le marché des fruits de mer de Huanan à Wuhan ^[5]. La transmission interhumaine a entraîné la propagation du virus vers certains pays voisins puis vers d'autres continents, d'où la pandémie d'aujourd'hui ^[6].

Le SRAS-CoV-2 est responsable d'une maladie essentiellement respiratoire pouvant être bénigne à sévère. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a baptisé cette maladie sous le nom Covid-19.

Devant la propagation rapide de ce virus dans le monde, de nombreuses publications sont apparues concernant les données cliniques, radiologiques et biologiques pour une meilleure maîtrise de cette infection. Cet article a pour objectif de décrire sur le plan biologique le Covid-19 ; en revanche, la clinique et la prise en charge thérapeutique sont en dehors de ses objectifs.

Données virologiques

a. Structure biologique

Chaque virion SRAS-CoV-2 mesure environ 50 à 200 nanomètres de diamètre ^[7]. Comme d'autres coronavirus, le SRAS-CoV-2 possède quatre protéines structurales (figure 1), connues sous le nom de protéines S (« Spike » ou pointe), E (enveloppe), M (membrane) et N (nucléocapside) ; la protéine N détient le génome viral (l'ARN viral), et les protéines S, E et M créent ensemble l'enveloppe virale. La protéine Spike permet au virus de se fixer et de fusionner avec la membrane d'une cellule hôte ^[8].

Des expériences de modélisation de protéines sur la protéine Spike du virus ont rapidement suggéré que le SRAS-CoV-2 avait une affinité suffisante pour l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 (ACE2) sur les cellules humaines pour les utiliser comme mécanisme d'entrée cellulaire ^[9].

Après qu'un virion SRAS-CoV-2 se soit attaché à une cellule cible, la protéase TMPRSS2 de la cellule coupe la protéine Spike du virus, exposant un peptide de fusion. Le virion libère alors de l'ARN dans la cellule et force la cellule à produire et à diffuser des copies du virus, qui infectent plus de cellules ^[8]. Le SRAS-CoV-2 produit au moins trois facteurs de virulence qui favorisent l'excrétion de nouveaux virions des cellules hôtes et inhibent la réponse immunitaire ^[8].

b. Transmission

La transmission interhumaine du SRAS-CoV-2 se produit principalement par le biais de gouttelettes respiratoires provenant de la toux et des éternuements dans un rayon d'environ 1,5 à 2 mètres (figure 1). Le contact indirect via des surfaces contaminées, comme le plastique et l'acier, est une autre cause possible d'infection ^[10].

Le virus est inactivé par le savon, qui déstabilise sa bicouche lipidique. De l'ARN viral a également été retrouvé dans des échantillons de selles d'individus infectés.

La contagiosité du virus pendant la période d'incubation est incertaine, cependant la charge virale au niveau du pharynx atteint son pic environ le 4ème jour après la contamination, puis décline au bout de la première semaine après le début de la symptomatologie ^[11]. L'OMS a indiqué que «la transmission à partir des cas asymptomatiques n'est probablement pas un facteur majeur de transmission».

c. Réservoir

Les premières infections connues de la souche SRAS-CoV-2 ont été découvertes à Wuhan, en Chine ^[12]. La source d'origine de la transmission virale à l'homme reste incertaine. Étant donné que bon nombre des premiers individus infectés par le virus étaient des travailleurs du marché des fruits de mer de Huanan ^[13], il a été suggéré que la souche pouvait provenir de ce marché. Cependant, d'autres études indiquent que les visiteurs peuvent avoir introduit le virus sur le marché, ce qui a ensuite facilité l'expansion rapide de l'infection ^[14].

L'analyse phylogénétique indique que les échantillons prélevés sur *Rhinolophus sinicus*, une espèce de chauves-souris ; présentent une ressemblance de 80% avec le SRAS-CoV-2 ^[15]. Elle indique également qu'un virus de *Rhinolophus affinis*, collecté dans la province

du Yunnan désigné RaTG13, a une ressemblance de 96% avec le SRAS-CoV-2 [12]. Le coronavirus du pangolin a jusqu'à 92% de ressemblance avec le SRAS CoV-2 [16].

Des chercheurs avaient découvert un échantillon de pangolin avec une seule séquence d'acide nucléique viral «similaire à 99%» à celle d'un ARN codant pour les protéines du SRAS-CoV-2 [17].

Les auteurs déclarent que «le domaine de liaison aux récepteurs de la protéine S du Pangolin-CoV nouvellement découvert est pratiquement identique à celui de 2019-nCoV, avec une différence d'acides aminés».

La protéine S du virus se lie au récepteur de surface cellulaire pendant l'infection [18].

Une analyse phylogénétique récente soutient la notion que les pangolins sont un hôte réservoir potentiel.

Cependant, il n'y a aucune preuve de lier les pangolins en tant qu'hôte intermédiaire pour le moment.

Bien qu'il existe un consensus scientifique sur le fait que les chauves-souris sont la source ultime de coronavirus, il est émis l'hypothèse qu'un coronavirus de type SRAS-CoV-2 est originaire de pangolins, est revenu aux chauves-souris, puis a « sauté » aux humains, entraînant le SRAS-CoV-2.

d. Phylogénétique

Le SRAS-CoV-2 appartient à la vaste famille de virus connus sous le nom de coronavirus. Il s'agit d'un virus à ARN simple brin de sens positif (+ ARNsb), avec un seul segment d'ARN linéaire. C'est le septième coronavirus connu à infecter des personnes, après 229E, NL63, OC43, HKU1, MERS-CoV et le SRAS-CoV [19].

SRAS-CoV-2 est un membre du sous-genre Sarbecovirus (lignée B-CoV B). Sa séquence d'ARN est d'environ 30.000 bases de longueur. Il est unique parmi les β -coronavirus connus dans son incorporation d'un site de clivage polybasique, une caractéristique connue pour augmenter la pathogénicité et la transmissibilité dans d'autres virus [20,21].

Le 11 février 2020, le Comité International de Taxonomie des Virus (ICTV) a annoncé que selon les règles existantes qui calculent les relations hiérarchiques entre les coronavirus sur la base de cinq séquences d'acides nucléiques conservées, les différences entre ce qui était alors appelé 2019-nCoV et la souche virale de l'épidémie de SRAS de 2003 était insuffisante pour en faire des espèces virales distinctes. Par conséquent, ils ont identifié le 2019-nCoV comme une souche de coronavirus, lié au syndrome respiratoire aigu sévère [22].

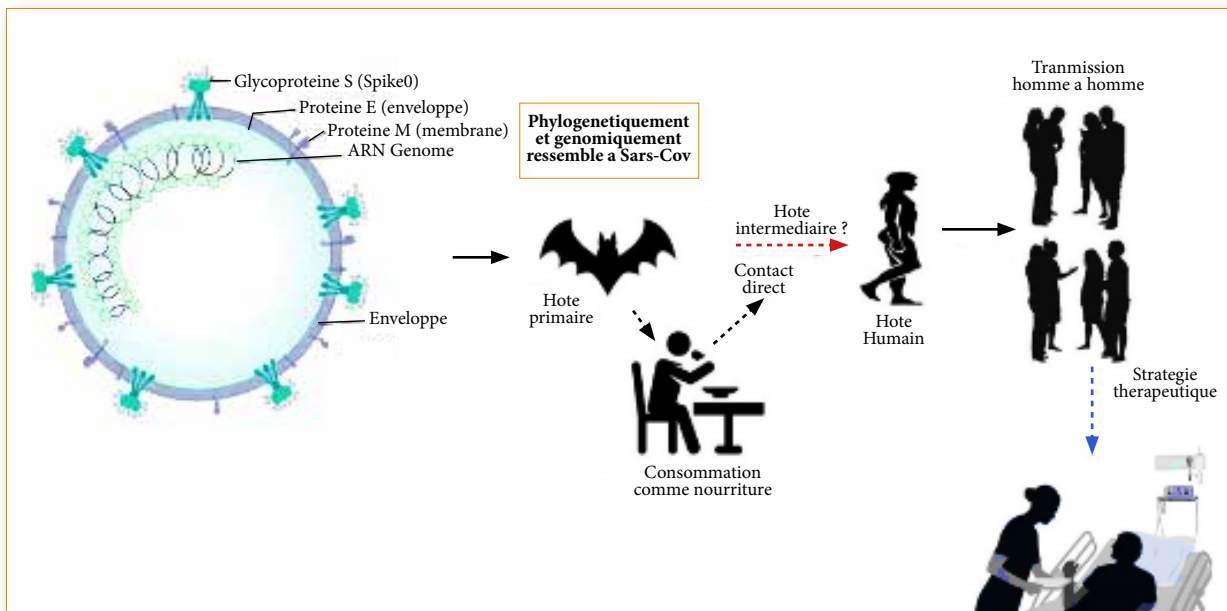


Figure 1 : Structure, réservoir et mode de transmission du SRAS-CoV-2 [7,23].

Immunopathologie du Covid-19

Comme pour toutes les maladies infectieuses, l'immunité de l'hôte a un rôle à la fois dans la lutte contre l'invasion de pathogènes et dans la limitation des dommages graves des organes et du mauvais pronostic. Le Covid-19 se présente sous divers phénotypes cliniques, des porteurs asymptomatiques à la pneumonie interstitielle,

au syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA), à la défaillance multiviscérale, voire la mort. L'immunité innée et adaptative sont toutes les deux impliquées dans l'immunité anti-SRAS-CoV-2.

a. Pénétration et répllication de coronavirus

La protéine S du coronavirus est un déterminant important dans le mécanisme d'entrée du virus dans les cellules hôtes [2].

La glycoprotéine Spike de l'enveloppe se lie à son récepteur cellulaire, ACE2 pour SRAS-CoV-1 et 2^[24]. L'entrée du SRAS-CoV dans les cellules se fait d'abord par fusion membranaire directe entre le virus et la membrane plasmique^[25].

Après l'entrée du virus dans les cellules, le génome de l'ARN viral est libéré dans le cytoplasme et est traduit en deux polyprotéines et protéines structurales ; après quoi le génome viral commence à se répliquer^[26]. Les glycoprotéines de l'enveloppe, nouvellement formées, sont insérées dans la membrane du réticulum endoplasmique ou Golgi, et la nucléocapside est formée par la combinaison d'ARN génomique et de protéine de la nucléocapside. Ensuite, les particules virales germent dans le compartiment intermédiaire réticulum endoplasmique-Golgi. Enfin, les vésicules contenant les particules virales fusionnent, migrent vers la membrane plasmique puis les nouveaux virions sont libérés^[27].

b. Réponse immunitaire innée à l'infection par le SRAS-CoV-2

Pour établir une réponse antivirale, les cellules immunitaires innées doivent reconnaître l'invasion du virus, souvent par des motifs moléculaires associés aux agents pathogènes (PAMPs). Pour le virus à ARN tel que le coronavirus, il est reconnu que les PAMPs sous forme d'ARN génomique viral ou les intermédiaires pendant la réplication virale, y compris l'ARNdb, sont reconnus soit par les récepteurs TLR3 et TLR7 et les senseurs cytosoliques d'ARN, RIG-I / MDA5. Cet événement de reconnaissance conduit à l'activation de la cascade de signalisation en aval, à savoir NF- κ B et IRF3, accompagnée de leur translocation nucléaire. Dans les noyaux, ces facteurs de transcription induisent l'expression d'IFN de type I et d'autres cytokines pro-inflammatoires et ces réponses initiales constituent la défense de première ligne contre l'infection virale au site d'entrée^[28].

L'IFN de type I via son récepteur IFNAR, à son tour, active la voie JAK-STAT, où les kinases JAK1 et TYK2 phosphorylent STAT1 et STAT2. STAT1/2 forment un complexe avec IRF9, et ensemble ils se déplacent vers le noyau pour initier la transcription des gènes stimulés par l'IFN (ISG) sous le contrôle de l'élément de réponse stimulé par l'IFN (ISRE) contenant des promoteurs^[28].

Une réponse de l'IFN de type I réussie devrait pouvoir supprimer la réplication et la dissémination virales à un stade précoce.

c. Présentation de l'antigène dans l'infection à coronavirus

Pendant que le virus pénètre dans les cellules, son antigène sera présenté aux cellules présentatrices d'antigènes,

qui constituent un élément central de l'immunité antivirale. Les peptides antigéniques sont présentés par un complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), puis reconnus par les lymphocytes T cytotoxiques spécifiques du virus (CTL). La présentation antigénique du SRAS-CoV dépend principalement des molécules du CMH-I^[29], mais le CMH-II contribue également à sa présentation. Des études antérieures montrent que de nombreux polymorphismes HLA sont corrélés à la sensibilité du SRAS-CoV, tels que HLA-B*4601, HLA-B*0703, HLA-DR B1*1202^[30] et HLA-Cw*0801^[31], alors que les allèles HLA-DR0301, HLA-Cw1502 et HLA-A*0201 sont liés à la protection contre l'infection par le SRAS^[32].

Dans l'infection MERS-CoV, les molécules MHC II, telles que HLA-DRB1*11:01 et HLA-DQB1*02:0, sont associées à la sensibilité à l'infection MERS-CoV^[33].

d. Immunité humorale et cellulaire

La présentation de l'antigène stimule par la suite l'immunité humorale et cellulaire, qui est médiée par les lymphocytes B et T spécifiques du virus. Semblable aux infections virales aiguës courantes, le profil d'anticorps contre le virus du SRAS-CoV présente un schéma typique de la production d'IgM et d'IgG. Les anticorps IgM spécifiques du SRAS-CoV disparaissent à la fin de la semaine 12, tandis que les anticorps IgG peuvent durer longtemps, ce qui indique que les anticorps IgG peuvent principalement jouer un rôle protecteur^[34].

Par rapport aux réponses humorales, il y a plus de recherches sur l'immunité cellulaire du coronavirus.

Le dernier rapport montre que le nombre de cellules T CD4+ et CD8+ dans le sang périphérique des patients infectés par le SRAS-CoV-2 est considérablement réduit, tandis que son statut est une activation excessive, comme en témoignent les proportions élevées de HLA-DR (CD4 : 3,47%) et CD38 (CD8 : 39,4%), fractions doubles positives (HLA-DR+CD38+)^[35].

De même, la réponse en phase aiguë chez les patients atteints du SRAS-CoV est associée à une diminution sévère des lymphocytes T CD4+ et CD8+. Même s'il n'y a pas d'antigène, les lymphocytes T CD4+ et CD8+ mémoires peuvent persister pendant quatre ans chez une partie des individus guéris du SRAS-CoV et peuvent effectuer la prolifération des lymphocytes T, la réponse retardée et la production d'IFN- γ ^[36].

Ces résultats peuvent fournir des informations précieuses pour la conception rationnelle des vaccins contre le SRAS-CoV-2.

e. Tempête Cytokinique dans le Covid-19

Le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) est un événement immunopathologique courant dans les

infections aux SRAS-CoV-2, le SRAS-CoV et le MERS-CoV [35]. L'un des principaux mécanismes du SDRA est la tempête cytokinique, la réponse inflammatoire systémique non contrôlée potentiellement mortelle résultant de la libération de grandes quantités de cytokines pro-inflammatoires (IFN- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18, IL-33, TNF- α , TGF- β , etc.) et les chimio kinés (CCL2, CCL3, CCL5, CXCL8, CXCL9, CXCL10, etc.) par les cellules immunitaires effectrices dans l'infection par le SRAS-CoV [37].

À l'instar de ceux atteints du SRAS-CoV, les personnes

atteintes d'une infection sévère au MERS-CoV présentent des taux élevés d'IL-6, IFN- α et CCL5, CXCL8, CXCL-10 dans le sérum par rapport à ceux atteints de la maladie modérée à légère [38].

La tempête de cytokines déclenchera une attaque violente du système immunitaire contre l'organisme, provoquera un SDRA et une défaillance de multiples organes ; et conduira finalement à la mort dans les cas graves, d'infection par le SRAS-CoV-2, tout comme ce qui se produit dans le SRAS-CoV et le MERS-CoV [35].

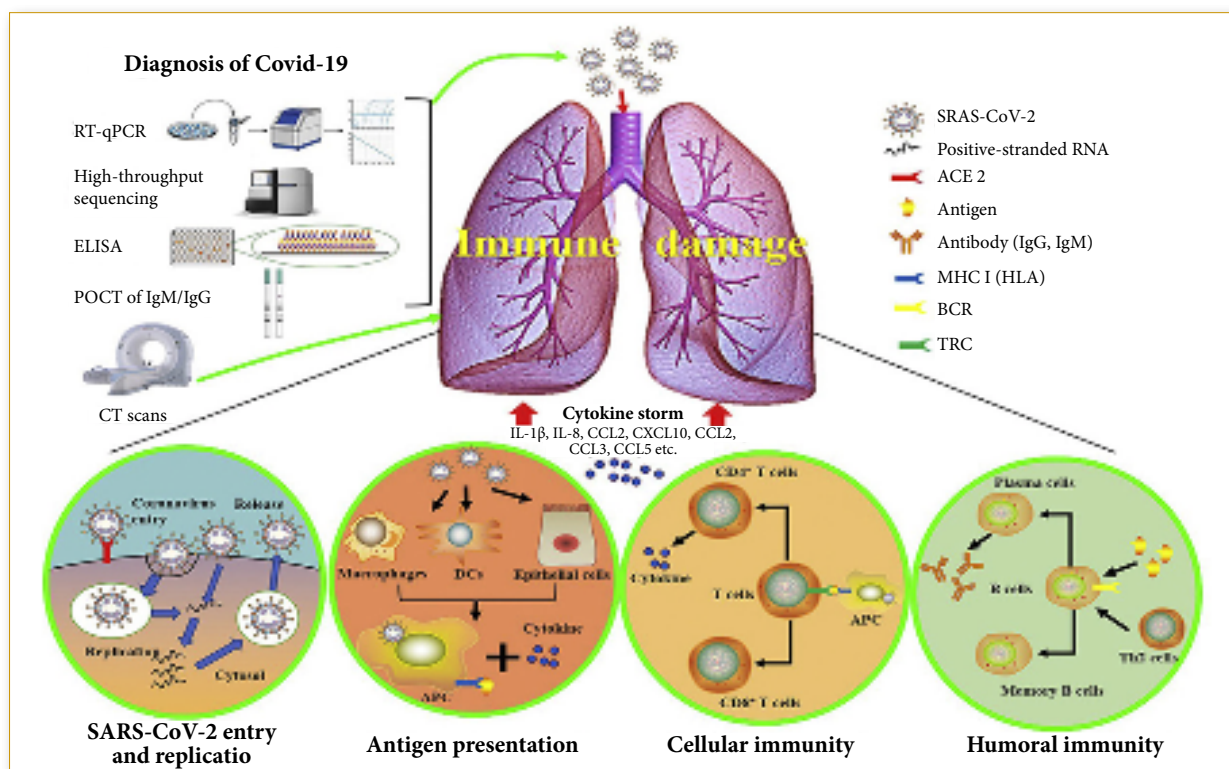


Figure 1 : Schéma récapitulatif de l'immunopathologie du Covid-19 [45].

Échappement du SRAS-CoV-2 au système immunitaire

Le SRAS-CoV et le MERS-CoV utilisent plusieurs stratégies pour éviter les réponses immunitaires. Les Pampas peuvent être reconnus par les récepteurs de l'immunité innée (PRR). Cependant, le SRAS-CoV et le MERS-CoV peuvent induire la production de vésicules à double membrane dépourvues de PRR, puis se répliquer dans ces vésicules, évitant ainsi la détection par l'hôte de leur ARNdb [39].

L'IFN type I a un effet protecteur contre l'infection par le SRAS-CoV et le MERS-CoV, mais la voie IFN-I est inhibée chez les souris infectées [40,41].

La protéine accessoire 4a de MERS-CoV peut bloquer l'induction de l'IFN au niveau de l'activation de MDA5 par interaction directe avec l'ARN double brin [42].

Par ailleurs, l'ORF4a, l'ORF4b, l'ORF5 et les protéines membranaires du MERS-CoV inhibent le transport nucléaire du facteur régulateur IFN 3 (IRF3) et l'activation du promoteur IFN- β [43].

La présentation de l'antigène peut également être affectée par le coronavirus. Par exemple, l'expression génique liée à la présentation de l'antigène est régulée à la baisse après une infection par MERS-CoV [44]. Par conséquent, la destruction de l'évasion immunitaire de SRAS-CoV-2 est impérative dans son traitement et le développement de médicaments spécifiques.

Diagnostic biologique

a. Preuve de l'infection virale

• Recherche du génome viral par RT-PCR

Le diagnostic de Covid-19 est posé par la détection de l'ARN du SRAS-CoV-2 par réaction en chaîne par polymérase à transcription reverse (RT-PCR) [46]. Divers tests RT-PCR sont utilisés dans le monde ; différents tests amplifient et détectent différentes régions du génome du SRAS-CoV-2. Les cibles génétiques communes incluent la nucléocapside (N), l'enveloppe (E), la pointe (S) et l'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp), ainsi que les régions du premier cadre de lecture ouvert [47].

- Les différents prélèvements

Les échantillons des voies respiratoires supérieures sont les principaux échantillons pour les tests RT-PCR SRAS-CoV-2. Aux États-Unis, le CDC recommande de prélever un échantillon d'écouvillon nasopharyngé [48]. Les écouvillons oropharyngés, nasaux à mi-cornets ou nasaux (des deux narines) sont des alternatives acceptables pour les patients symptomatiques si les écouvillons nasopharyngés ne sont pas disponibles.

Les expectorations doivent être prélevées chez les patients atteints de toux productive ; l'induction des expectorations n'est pas recommandée. Une aspiration des voies respiratoires inférieures ou un lavage broncho-alvéolaire doivent être prélevés chez les patients intubés.

- Interprétation

Un test positif pour le SRAS-CoV-2 confirme généralement le diagnostic de Covid-19. Cependant, les tests faussement négatifs des échantillons des voies respiratoires supérieures ont été bien documentés. Si le test initial est négatif et devant la suspicion de Covid-19, il est suggéré de refaire le test. Dans de tels cas, l'OMS recommande également de tester des échantillons des voies respiratoires inférieures, si possible [49].

Les échantillons des voies respiratoires inférieures peuvent avoir des charges virales plus élevées et être plus susceptibles de donner des tests positifs que les échantillons des voies respiratoires supérieures [50]. Dans une étude portant sur 205 patients atteints de Covid-19, des échantillons ont été prélevés à divers sites, les taux les

plus élevés de tests d'ARN viral positifs ont été signalés par lavage broncho-alvéolaire (95%, 14 sur 15 échantillons) et crachats (72%, 72 sur 104 échantillons), par rapport à un écouvillon oropharyngé (32%, 126 des 398 échantillons) [23]. Les données de cette étude suggèrent que les niveaux d'ARN viral sont plus élevés et plus fréquemment détectés dans les échantillons nasaux par rapport aux échantillons oraux.

La spécificité de ce test est de 100 % mais on ignore sa sensibilité [52], cependant tout dépend de la charge virale du prélèvement laquelle est variable selon le moment de la primo-infection et selon l'état immunitaire du sujet (risque élevé chez les sujets immunodéprimés). La RT-PCR a été largement déployée en virologie et a donné peu de résultats faussement positifs [53]. Les valeurs prédictives positive et négative ne sont pas actuellement connues avec précision, car pour les calculer il faut avoir le chiffre exact de l'incidence et de la prévalence de la maladie.

• Recherche des antigènes viraux

Ces tests donnent un résultat en 15-30 minutes, et sont basés sur la recherche d'antigènes du virus. Ils ont une sensibilité assez modeste (60,2 %), et une bonne spécificité (99,2 %). Le résultat du test ne permet donc pas d'affirmer avec une bonne fiabilité quand sortir de l'isolement (ou par anticipation d'une décision générale de confinement), sauf si le test est confirmé par des symptômes cliniques indiscutables. Le malade peut alors dans ce cas, sortir de l'isolement 25 jours après le début de la maladie. Les capacités de production des tests restent cependant faibles en comparaison aux besoins pour opérer un déconfinement de la population.

• Dosage des anticorps IgG/IgM anti-SRAS-CoV-2

Plusieurs dosages sérologiques ont été développés par les sociétés pour la détection des protéines virales et des anticorps du SRAS-CoV-2 dans le sérum ou le plasma.

- Test rapide par technique immunochromatographique

Le test rapide combiné d'anticorps IgG/IgM de SRAS-CoV-2 est un immunodosage qualitatif en flux latéral pour la détermination rapide de la présence ou de l'absence à la fois d'IgM et/ou IgG anti-SRAS-CoV-2 dans des échantillons humains (sang total, sérum et plasma). La cartouche de test possède trois bandes de détection, dont une bande de contrôle distale qui apparaît lorsque l'échantillon migre jusqu'à l'extrémité de la bande du test [54].

La cartouche de test rapide IgG/IgM SRAS-CoV-2, comme le montre la figure 1, contient deux anticorps monoclonaux de souris anti-IgG/IgM humaines déposés sur deux lignes séparées.

Un antigène de surface du virus SRAS-CoV-2 qui peut être fixé par les IgG/IgM du même virus est conjugué à des nanoparticules d'or colloïdal et pulvérisé sur des tampons de conjugaison. Le conjugué or-NP-IgG du lapin est également pulvérisé sur des tampons de conjugaison pour se lier à l'anticorps IgG anti-lapin qui est immobilisé sur la ligne de contrôle^[54] (figure).

Lors du test, 10 à 15 µL d'échantillon sont ajoutés dans le port d'échantillon suivi de l'ajout de tampon de dilution d'échantillon. Le mécanisme du test est basé sur l'hydratation et le transport des réactifs lorsqu'ils interagissent avec l'échantillon à travers la bande via un flux latéral chromatographique (figure 1A). Au fur et à mesure que l'échantillon traverse le dispositif, les anticorps IgG et IgM anti-SRAS-CoV-2, s'ils sont présents dans l'échantillon,

sont liés par le réactif colorimétrique or, marqué par l'antigène SRAS-CoV-2 fixé sur le tampon conjugué.

- Interprétation

La présence d'anticorps IgG et IgM anti-SRAS-CoV-2 est indiquée par une ligne rouge/violette dans les régions spécifiques, M pour IgM et G pour IgG, indiquées sur la cartouche. Si l'échantillon ne contient pas d'anticorps anti-SRAS-CoV-2, aucun complexe marqué ne se lie à la zone d'essai et aucune ligne ne peut être observée. L'or colloïdal restant remonte la nitrocellulose vers le contrôle.

La ligne apparaîtra dans la zone de la ligne de contrôle pendant l'exécution de tous les tests valides, que l'échantillon soit positif ou négatif pour une infection par le SRAS-CoV-2.

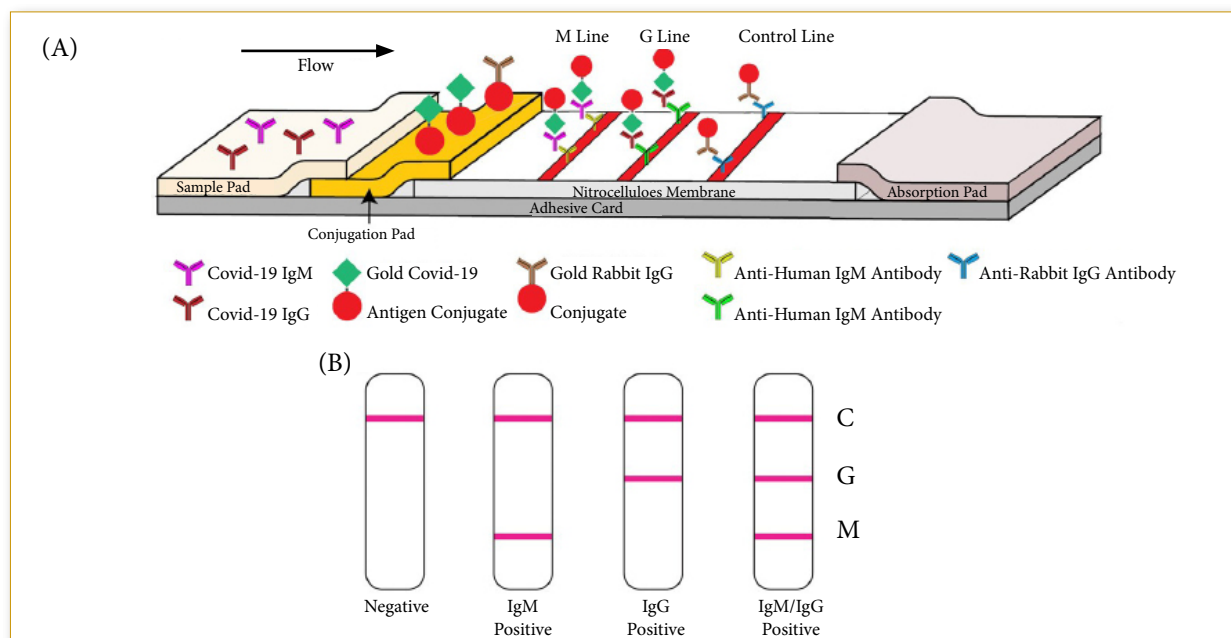


Figure 3 : Illustration schématique du test rapide IgM-IgG SRAS-CoV-2. A, schéma de principe du dispositif de détection ; B, une illustration des différents résultats des tests ; C, pour ligne de contrôle ; G, pour IgG ; M, pour IgM. SRAS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2^[54].

La figure 1B est l'illustration de différentes lectures de résultats de test pour des situations négatives, IgM positives, IgG positives et IgM/IgG positives.

Ce test nouvellement développé a une sensibilité de 88,66% et une spécificité de 90,63%^[54]. Cependant, il y avait toujours des résultats faussement positifs et faux négatifs. Les raisons du faux négatif sont peut-être, premièrement, dues aux faibles concentrations d'anticorps : lorsque les niveaux d'IgM et d'IgG sont inférieurs à la limite de détection (pas encore déterminée) de ce test rapide, les résultats du test seront négatifs. Deuxièmement, la différence dans la production individuelle

d'anticorps de réponse immunitaire pourrait être l'une des raisons des résultats faussement négatifs chez les patients Covid-19.

- Dosage par technique immunoenzymatique (ELISA) et chimiluminescence

Le dosage de anticorps par des méthodes d'ELISA et de chimiluminescence a l'avantage d'un échantillonnage pratique, à haut débit, à haute efficacité et quantitatif. Ces méthodes doivent être sélectionnées comme un complément efficace pour la détection d'ARN dans différentes circonstances, afin d'améliorer la sensibilité et la spécificité diagnostiques^[55].

- Cinétique

Des réponses d'anticorps primaires et secondaires typiques à une infection virale aiguë sont induites efficacement. Les IgM spécifiques du SRAS-CoV-2 apparaissent 8 à 12 jours environ après le début de l'infection et disparaissent vers la fin de la 12^{ème} semaine.

La réponse en anticorps IgG commence à apparaître peu de temps après (ou simultanément) mais persiste plus longtemps et peut être protectrice (figure 4) [56].

La plupart des données sérologiques actuellement disponibles dans la littérature se réfèrent à des patients examinés principalement dans la phase aiguë de la maladie. Par conséquent, ils sont insuffisants pour établir exactement la durabilité des titres d'anticorps de chaque pic des isotypes lorsqu'ils finissent par disparaître. Les niveaux d'anticorps IgG sériques semblent cependant

proportionnels à l'intensité de la charge virale et à la sévérité des symptômes [56].

L'efficacité des Ig spécifiques et leur rôle dans la limitation de la propagation virale peuvent être indirectement supposés par des observations démontrant que le plasma des sujets récupérés de Covid-19 a montré une efficacité thérapeutique s'il était transféré passivement aux patients. Une efficacité similaire avait déjà été démontrée pour le plasma de patients qui se sont rétablis du SRAS-CoV et du MERS-CoV [56]. Par conséquent, la perfusion de plasma d'individus convalescents à des patients Covid-19 gravement malades est une option thérapeutique qui est à l'étude.

Bien que des essais cliniques contrôlés ne soient pas encore disponibles, plusieurs articles rapportent l'efficacité de ce traitement et l'absence d'événements indésirables graves.

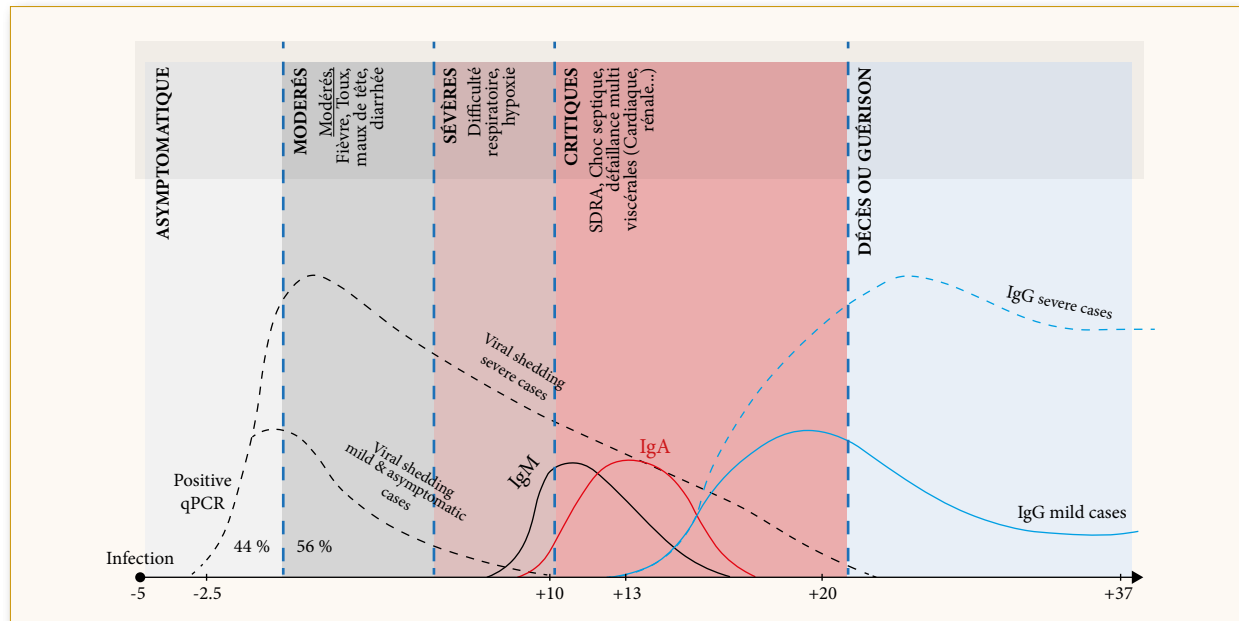


Figure 4 : Variation des signes cliniques en fonction de la réponse immunitaire adaptative et l'élimination du virus [56].

- Interprétation

La figure 5 montre l'interprétation clinique des différentes possibilités qui peuvent être rencontrées lors d'un test sérologique Covid-19 avec une RT-PCR négative.

Cet algorithme est basé sur les connaissances actuelles des anticorps IgM et IgG et la corrélation de ces

variations avec le moment initial de l'infection, l'apparition des symptômes et phase de récupération. Étant donné que le moment exact de l'infection est souvent inconnu, la combinaison des tests RT-PCR et IgM/IgG peut améliorer la précision du diagnostic Covid-19.

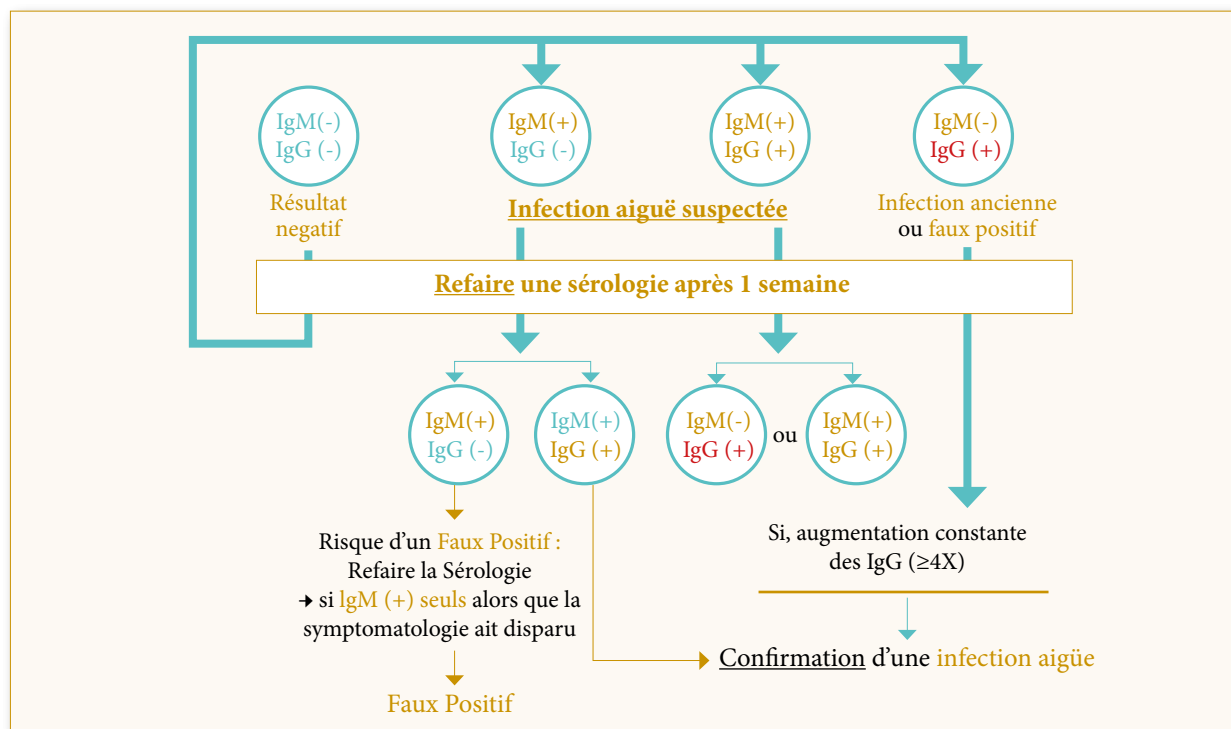


Figure 4 : Algorithme de l'interprétation de la sérologie Covid-19 [57].

b. Applications des tests moléculaires et sérologiques

Elles peuvent être résumées comme suit :

• Dépistage des populations ciblées

Une combinaison de la recherche d'ARN et des anticorps peut être appliquée pour dépister les voyageurs en provenance de pays ou de régions à forte incidence de Covid-19, les participants à des conférences ou événements importants, et la population retournant au travail ou à l'école de zones à forte incidence. Pour les personnes ayant un ARN négatif alors que la sérologie est positive, une surveillance de la quarantaine et de la santé peut également être effectuée pour identifier en temps opportun les cas potentiels et réduire le risque de transmission.

• Enquêtes épidémiologiques

1. Permet d'analyser le spectre complet de l'infection par le SRAS-CoV-2, révélant la distribution de l'infection inapparente, de l'infection atypique, de l'infection symptomatique légère à sévère et de la contribution de chaque type de l'infection à la transmission du virus et de la maladie.

2. Mener une enquête sérologique en population pour comprendre la prévalence et la pathogénicité réelles de l'infection par le SRAS-CoV-2 dans différentes régions et populations.

3. Recueillir des séries d'échantillons de cas suspects ou confirmés et tester des indicateurs sérologiques, des indicateurs d'acide nucléique et d'autres indicateurs de laboratoire, pour analyser leur dynamique, ainsi améliorer la stratégie de diagnostic et de traitement du Covid-19 ;

4. Analyser le taux d'anticorps et le spectre des épitopes d'anticorps chez les patients convalescents Covid-19, afin de fournir des preuves scientifiques pour la conception et l'évaluation des vaccins et des anticorps thérapeutiques à l'avenir,

5. Soutenir la recherche d'hôtes animaux potentiels du SRAS-CoV-2.

c. Marqueurs biologiques pronostiques

• Marqueurs de la réponse immunitaire

- Cytokines

Des recherches axées sur les marqueurs de l'inflammation ont été réalisées chez des patients présentant des symptômes allant de légers à graves, voire critiques, pour pouvoir distinguer rapidement ceux dont la pneumopathie pourrait évoluer vers une forme sévère ou mortelle. Les critères associés à la gravité de la maladie étaient l'âge, le récepteur soluble de l'interleukine 2 (IL-2R soluble), de l'IL-6, de l'IL-8, de l'IL-10, le facteur

de nécrose tumorale α (TNF- α), la protéine C réactive (CRP), la ferritine, la procalcitonine, les taux des lymphocytes, des neutrophiles et des éosinophiles [58], avec en conclusion un risque maximal pour les plus de 67 ans, avec un taux d'IL-2R soluble supérieure à 793,5 U/ml, de CRP supérieure à 30,7 ng/mL, de ferritinémie supérieure à 2252 $\mu\text{g/L}$, une leucocytose supérieure à $95 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ ou un nombre de neutrophiles dépassant $7.305 \times 10^6 \text{ L}^{-1}$.

Un taux élevé d'IL-6 à l'admission serait associé à une manifestation clinique sévère. La diminution de l'IL-6 semble indiquer l'efficacité du traitement, tandis que son augmentation indique une progression de la maladie. L'évolution du niveau d'IL-6 est donc un marqueur utile pour la surveillance de la maladie chez les patients atteints de Covid-19 sévère [59].

Une étude montre que la charge virale est directement corrélée avec le taux sanguin d'IL-6, ce qui fait de cette molécule un marqueur pronostique important [60].

Cette augmentation associée à un taux de fer sanguin élevé doit faire rechercher un syndrome d'activation macrophagique secondaire. Cependant, le taux de CRP semble être en rapport avec une réaction inflammatoire inappropriée du foie [61].

- Lymphocyte

Le taux de lymphocytes est un moyen efficace et un indicateur fiable pour la classification et le pronostic de la maladie : durant le passage d'une forme bénigne vers une forme grave, le taux de lymphocytes sanguins diminue et reste bas. Au moment où l'état du malade s'améliore, le taux de lymphocytes sanguins remonte vers des taux normaux.

Les patients ayant moins de 5 % de lymphocytes par rapport aux normes, avaient souvent un mauvais pronostic. Une étude confirme l'existence d'une corrélation élevée entre le taux des lymphocytes sanguins et la progression de la maladie. Pour les auteurs de cette étude, le lymphocyte est la cellule clé de la pathologie du SRAS-Cov-2 [62].

• Marqueurs de la coagulation

- D-dimères

L'augmentation des D-dimères est un signe de gravité ainsi que l'augmentation de la créatinémie [63]. Le D-dimère supérieur 2,0 $\mu\text{g/ml}$ à l'admission pourrait effectivement prédire la mortalité à l'hôpital chez les patients atteints de Covid-19, ce qui indiquait que le D-dimère pourrait être un marqueur précoce et utile pour améliorer la prise en charge des patients de Covid-19.

Conclusion

En décembre 2019, un nouveau coronavirus a été identifié en Chine, le SRAS-Cov-2 responsable de la maladie à coronavirus 2019 (Covid-19).

Une compréhension approfondie de la transmission virale et du mécanisme immunopathologique de l'infection permettra une maîtrise de la pandémie.

La réaction en chaîne par polymérase en temps réel de la transcriptase inverse (RT-PCR) à la recherche de l'ARN viral reste le test de référence pour le diagnostic précoce du Covid-19. Cependant, Les tests sérologiques tels que les tests ELISA, la chimiluminescence et les tests rapides à flux latéral, qui détectent les anticorps IgM et IgG produites chez les personnes en réponse à une infection par le SRAS-CoV-2, gardent tout leur intérêt dans le dépistage des populations ciblées et dans les enquêtes épidémiologiques.

L'analyse des marqueurs de l'inflammation ; tels que la CRP et l'IL-6, ainsi que le taux des lymphocytes circulants durant l'évolution de la maladie, peuvent aider à prédire l'évolution vers les formes sévères et de ce fait, les prendre en charge rapidement.

Date de soumission

13 Mai 2020.

Liens d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

Références

- Cui J, Li F, Shi Z-L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol* 2019;17:181-92.
- Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, Zaki SR, Peret T, Emery S, et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med*. 2003;348(20):1953-1966.
- Wong G, Liu W, Liu Y, Zhou B, Bi Y, Gao GF. MERS, SRAS, and Ebola: The role of super spreaders in infectious disease. *Cell Host Microbe*. 2015;18(4):398-401.
- Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med*. 2020;382(8):727-733.
- Li Q, Guan X, Wu P, Wang X, Zhou L, Tong Y, et al. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia. *N Engl J Med*. 2020;382(13):1199-1207.
- Okada P, Buathong R, Phuygun S, Thanadachakul T, Parnmen S, Wongboot W, et al. Early transmission patterns of coronavirus disease 2019 (Covid-19) in travellers from Wuhan to Thailand, January 2020. *Euro Surveill*. 2020;25(8):2000097.
- Chen N, Zhou M, Dong X, Qu J, Gong F, Han Y, et al. (15 February 2020). «Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study». *The Lancet*. 395 (10223): 507-513.
- Wu C, Liu Y, Yang Y, Zhang P, Zhong W, Wang Y, et al. (February 2020). «Analysis of therapeutic targets for SRAS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods». *Acta Pharmaceutica Sinica B*.
- Xu X, Chen P, Wang J, Feng J, Zhou H, Li X, et al. (March 2020). «Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modelling of its spike protein for risk of human transmission». *Science China Life Sciences*. 63 (3): 457-460.
- «Getting your workplace ready for Covid-19» (PDF). World Health Organization. 27 February 2020.
- Van Doremalen N, Bushmaker T, Morris DH, Holbrook MG, Gamble A, Williamson BN, et al. (17 March 2020). «Correspondence: Aerosol and Surface Stability of SRAS-

- CoV-2 as Compared with SRAS-CoV-1». *The New England Journal of Medicine*. 382 (16): 1564–1567.
12. Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. (February 2020). «A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin». *Nature*. 579 (7798): 270–273.
13. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. (15 February 2020). «Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China». *The Lancet*. 395 (10223): 497–506.
14. Cohen J (January 2020). «Wuhan seafood market may not be source of novel virus spreading globally». *Science*. doi:10.1126/science.abb0611.
15. Benvenuto D, Giovanetti M, Ciccozzi A, Spoto S, Angeletti S, Ciccozzi M (April 2020). «The 2019-new coronavirus epidemic: Evidence for virus evolution». *Journal of Medical Virology*. 92 (4): 455–459.
16. Zhang T, Wu Q, Zhang Z (19 March 2020). «Probable Pangolin Origin of SRAS-CoV-2 Associated with the Covid-19 Outbreak». *Current Biology*. 30 (7): 1346–1351.e2.
17. Cyranoski D (7 February 2020). «Did pangolins spread the China coronavirus to people?». *Nature*. doi:10.1038/d41586-020-00364-2
18. Xiao K, Zhai J, Feng Y (February 2020). «Isolation and Characterization of 2019-nCoV-like Coronavirus from Malayan Pangolins». *bioRxiv* (preprint). doi:10.1101/2020.02.17.951335.
19. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. (February 2020). «A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019». *The New England Journal of Medicine*. 382 (8): 727–733.
20. Wong AC, Li X, Lau SK, Woo PC (February 2019). «Global Epidemiology of Bat Coronaviruses». *Viruses*. 11 (2): 174.
21. Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Veesler D (9 March 2020). «Structure, function and antigenicity of the SRAS-CoV-2 spike glycoprotein». *Cell*. 181 (2): 281–292.e6.
22. Gorbalenya AE, Baker SC, Baric RS, de Groot RJ, Drosten C, Gulyaeva AA, et al. (March 2020). «The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SRAS-CoV-2». *Nature Microbiology*. 5 (4): 536–544.
23. Muhammad Adnan Shereen et al, Covid-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses, *Journal of Advanced Research* 24 (2020) 91–98.
24. F. Wu, S. Zhao, B. Yu, et al., A new coronavirus associated with human respiratory disease in China, *Nature* (2020), <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2008-3>.
25. G. Simmons, J.D. Reeves, A.J. Rennekamp, et al., Characterization of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SRAS-CoV) spike glycoprotein-mediated viral entry, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (2004) 4240e4245, <https://doi.org/10.1073/pnas.0306446101>.
26. S. Perlman, J. Netland Coronaviruses post-SRAS: update on replication and pathogenesis, *Nat. Rev. Microbiol.* 7 (2009) 439e450, <https://doi.org/10.1038/nrmicro2147>.
27. E. de Wit, N. van Doremalen, D. Falzarano, et al., SRAS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses, *Nat. Rev. Microbiol.* 14 (2016) 523e534, <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.81>.
28. De Wit E, van Doremalen N, Falzarano D, Munster VJ. SRAS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. *Nat Rev Microbiol*. 2016;14: 523-34.
29. J. Liu, P. Wu, F. Gao, et al., Novel immunodominant peptide presentation strategy: a featured HLA-A*2402-restricted cytotoxic T-lymphocyte epitope stabilized by intrachain hydrogen bonds from severe acute respiratory syndrome coronavirus nucleocapsid protein, *J. Virol.* 84 (2010) 11849e11857, <https://doi.org/10.1128/JVI.101464-10>.
30. N. Keicho, S. Itoyama, K. Kashiwase, et al., Association of human leukocyte antigen class II alleles with severe acute respiratory syndrome in the Vietnamese population, *Hum. Immunol.* 70 (2009) 527e531, <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2009.05.006>.
31. Y.M. Chen, S.Y. Liang, Y.P. Shih, et al., Epidemiological and genetic correlates of severe acute respiratory syndrome coronavirus infection in the hospital with the highest nosocomial infection rate in Taiwan in 2003, *J. Clin. Microbiol.* 44 (2006) 359e365, <https://doi.org/10.1128/JCM.44.2.359-365.2006>.
32. S.F. Wang, K.H. Chen, M. Chen, et al., Human-leukocyte antigen class I Cw 1502 and class II DR 0301 genotypes are associated with resistance to severe acute respiratory syndrome (SRAS) infection, *Viral Immunol.* 24 (2011) 421e426, <https://doi.org/10.1089/vim.2011.0024>.
33. A.H. Hajeer, H. Balkhy, S. Johani, et al., Association of human leukocyte antigen class II alleles with severe Middle East respiratory syndrome-coronavirus infection, *Ann. Thorac. Med.* 11 (2016) 211e213, <https://doi.org/10.4103/1817-1737.185756>.
34. G. Li, X. Chen, A. Xu, Profile of specific antibodies to the SRAS-associated coronavirus, *N. Engl. J. Med.* 349 (2003) 508e509, <https://doi.org/10.1056/NEJM200307313490520>.
35. Z. Xu, L. Shi, Y. Wang, et al., Pathological findings of Covid-19 associated with acute respiratory distress syndrome, *Lancet Resp. Med.* (2020), [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30076-X](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30076-X).
36. Y.Y. Fan, Z.T. Huang, L. Li, et al., Characterization of SRAS-CoV-specific memory T cells from recovered individuals 4 years after infection, *Arch. Virol.* 154 (2009) 1093e1099, <https://doi.org/10.1007/s00705-009-0409-6>.
37. A.E. Williams, R.C. Chambers, The mercurial nature of neutrophils: still an enigma in ARDS? *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 306 (2014) L217eL230, <https://doi.org/10.1152/ajplung.00311.2013>.
38. C.K. Min, S. Cheon, N.Y. Ha, et al., Comparative and kinetic analysis of viral shedding and immunological responses in MERS patients representing a broad spectrum of disease severity, *Sci. Rep.* 6 (2016) 25359, <https://doi.org/10.1038/srep25359>.
39. E.J. Snijder, Y. van der Meer, J. Zevenhoven-Dobbe, et al., Ultrastructure and origin of membrane vesicles associated with the severe acute respiratory syndrome coronavirus replication complex, *J. Virol.* 80 (2006) 5927e5940, <https://doi.org/10.1128/JVI.02501-05>.
40. R. Channappanavar, A.R. Fehr, R. Vijay, et al., Dysregulated type I interferon and inflammatory monocyte-macrophage responses cause lethal pneumonia in SRAS-CoV-infected mice, *Cell Host Microbe* 19 (2016) 181e193, <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.01.007>.
41. R. Channappanavar, A.R. Fehr, J. Zheng, et al., IFN-I response timing relative to virus replication determines MERS coronavirus infection outcomes, *J. Clin. Invest.* 130 (2019) 3625e3639, <https://doi.org/10.1172/JCI126363>.
42. D. Niemeyer, T. Zillinger, D. Muth, et al., Middle East respiratory syndrome coronavirus accessory protein 4a is a type I interferon antagonist, *J. Virol.* 87 (2013) 12489e12495, <https://doi.org/10.1128/JVI.01845-13>.
43. Y. Yang, L. Zhang, H. Geng, et al., The structural and accessory proteins M, ORF 4a, ORF 4b, and ORF 5 of Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) are potent interferon antagonists, *Protein Cell* 4 (2013) 951e961, <https://doi.org/10.1007/s13238-013-3096-8>.
44. V.D. Menachery, A. Schafer, K.E. Burnum-Johnson, et al., MERS-CoV and H5N1 influenza virus antagonize antigen presentation by altering the epigenetic landscape, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115 (2018) E1012eE1021, <https://doi.org/10.1073/pnas.1706928115>.
45. Xiaowei Li and al, Molecular immune pathogenesis and diagnosis of Covid-19, *Journal of Pharmaceutical Analysis* 10 (2020) 102e108, <https://doi.org/10.1016/j.jpaa.2020.03.001>.
46. Patel A, Jernigan DB, 2019-nCoV CDC Response Team. Initial Public Health Response and Interim Clinical Guidance for the 2019 Novel Coronavirus Outbreak - United States, December 31, 2019-February 4, 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2020; 69:140.
47. World Health Organization. Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases. <https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117>.
48. Centers for Disease Control and Prevention. Interim Guidelines for Collecting, Handling, and Testing Clinical Specimens from Persons Under Investigation (PUIs) for Coronavirus Disease 2019 (Covid-19). <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/lab/guidelines-clinical-specimens.html>.
49. World Health Organization. Coronavirus disease (Covid-19) technical guidance: Surveillance and case definitions. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/surveillance-and-case-definitions>.
50. Yu F, Yan L, Wang N, et al. Quantitative Detection and Viral Load Analysis of SRAS-CoV-2 in Infected Patients. *Clin Infect Dis* 2020.
51. Wang W, Xu Y, Gao R, et al. Detection of SRAS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. *JAMA* 2020.
52. Yan Liu, Guofeng Liu, Hongjiang Wu et Weiyang Jian, « Sex differences in non-communicable disease prevalence in China: a cross-sectional analysis of the China Health and Retirement Longitudinal Study in 2011 », *BMJ Open*, vol. 7, no 12, 1er December 2017, e017450 (ISSN 2044-6055 et 2044-6055, PMID 29247088, PMCID PMC5736028, DOI10.1136/bmjopen-2017-017450).
53. Mutsuo Yamaya and al, « Inhibitory effects of glycopyrronium, formoterol, and budesonide on coronavirus HCoV-229E replication and cytokine production by primary cultures of human nasal and tracheal epithelial cells », *Respiratory Investigation*, février 2020, S2212534520300058, DOI 10.1016/j.resinv.2019.12.005,
54. Zhengtu Li and al, Development and clinical application of a rapid IgM-IgG combined antibody test for SRAS-CoV-2 infection diagnosis, *J Med Virol.* 2020;1-7. DOI: 10.1002/jmv.25727
55. Xingwang Jia, Pengjun Zhang, Yaping Tian et Junli Wang, « Clinical significance of IgM and IgG test for diagnosis of highly suspected Covid-19 infection », *medRxiv*, 3 mars 2020, p. 2020.02.28.20029025, DOI 10.1101/2020.02.28.20029025.
56. Paolo Maria Matricardi, Roberto Walter Dal Negro, Roberto Nisini, The First, Comprehensive Immunological Model of Covid-19: Implications for Prevention, Diagnosis, and Public Health Measures.
57. Application of antibody assays in Covid-19 diagnosis. National centre for clinical laboratories, distributed on march 13, 2020.
58. Xiaobo Yang, Yuan Yu, Jiqian Xu et Huaqing Shu, « Clinical course and outcomes of critically ill patients with SRAS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centred, retrospective, observational study », *The Lancet Respiratory Medicine*. DOI 10.1016/S2213-2600(20)30079-5.
59. Themoula Charalampous, Gemma L. Kay, Hollian Richardson et Alp Aydin, « Nanopore metagenomics enables rapid clinical diagnosis of bacterial lower respiratory infection », *Nature Biotechnology*, vol.37, p.783–792, DOI 10.1038/s41587-019-0156-5.
60. Xiaohua Chen, Binghong Zhao, Yueming Qu et Yurou Chen, « Detectable serum SRAS-CoV-2 viral load (RNAemia) is closely associated with drastically elevated interleukin 6 (IL-6) level in critically ill Covid-19 patients », *medRxiv*, p. 2020.02.29.20029520. DOI 10.1101/2020.02.29.20029520.
61. Jiang Gu, Encong Gong, Bo Zhang et Jie Zheng, « Multiple organ infection and the pathogenesis of SRAS », *Journal of Experimental Medicine*, vol. 202, p. 415–424, DOI 10.1084/jem.20050828
62. Chu H., Zhou J., Wong B. H. et al., « Middle East respiratory syndrome coronavirus efficiently infects human primary T lymphocytes and activates the extrinsic and intrinsic apoptosis pathways. », *The Journal of Infectious Diseases*, no 213, 2016, p. 904-914
63. Giuseppe Lippi, Emmanuel J. Favaloro, D-dimer is Associated with Severity of Coronavirus Disease 2019: A Pooled Analysis. ISSN 0340-6245. DOI <https://doi.org/10.1055/s-0040-1709650>.