

## Comment sait-on que l'on a ou que l'on a eu le SARS-CoV-2 ?

Publié le 24 avril 2020.

Collectif « Diffusons la science, pas le virus » : <http://diffusonslascience.fr/>

Equipe « *Décryptage des informations* » :

Brice Barbat, Corentin Baussier, Amandine Desorme, Yohann Duverger, Marie-Camille Pizay, Béatrice Py

Relecteur : Pierre Netter

*Professeuse émérite à Sorbonne Université et chargé de mission au CNRS*

Directeurs de publication : Târn Mignot & Yann Vacher

**A retenir :** Le principe du test RT-qPCR (ou test moléculaire) est d'amplifier une séquence d'ADN, spécifique du SARS-CoV-2, à partir de l'ARN extrait de l'échantillon prélevé sur l'individu. Les tests sérologiques permettent eux de détecter, non pas directement le SARS-CoV-2, mais les anticorps anti-SARS-CoV-2, indiquant que l'on a été en contact avec le virus. Ces tests sont complémentaires et sont utilisés à différents moments de l'infection d'un individu. Ensemble, ils devraient donc permettre une meilleure prise en charge thérapeutique et un meilleur contrôle de l'épidémie.

Savoir si on est ou a été porteur du SARS-CoV-2 est une question importante tant au niveau thérapeutique qu'au niveau de la gestion de l'épidémie et notamment après le déconfinement.

Il existe différents tests de dépistage du SARS-Cov2. Nous nous intéresserons ici à deux types de tests qui devraient pouvoir assez rapidement être réalisés à grande échelle : la RT-qPCR et le test sérologique.

### Tests par RT-qPCR

Actuellement, la méthode la plus utilisée pour détecter la présence du virus SARS-CoV-2 chez un individu est de rechercher son patrimoine génétique (ARN) dans un prélèvement naso-pharyngé. On utilise pour cela la technique de RT-qPCR (Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction). Ce test est aussi appelé test moléculaire.

#### La réalisation du prélèvement :

À l'aide d'un écouvillon, on réalise un prélèvement naso-pharyngé pour récupérer un échantillon de sécrétion des voies respiratoires hautes. Ce prélèvement est facile à réaliser, rapide et non invasif. Cependant, il doit être bien effectué afin d'éviter l'obtention d'un résultat "faux négatif", autrement dit que le test soit négatif alors que l'individu est contaminé.

#### L'extraction de l'ARN viral :

Le SARS-CoV-2 est un virus à ARN (Acide Ribonucléique), c'est-à-dire que son patrimoine génétique est contenu dans une molécule d'ARN. Ainsi, grâce à un kit de biologie moléculaire utilisé en laboratoire, l'enveloppe du virus est dénaturée afin d'obtenir l'ARN viral.

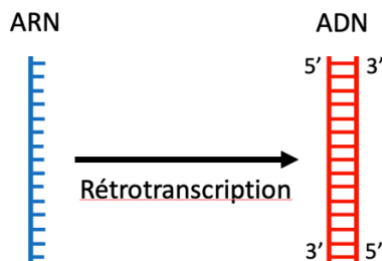
**Le principe du test RT-qPCR est d'amplifier une séquence d'ADN, spécifique du SARS-CoV-2, à partir de l'ARN extrait de l'échantillon prélevé sur l'individu.**

#### La RT-qPCR :

Que signifie cet acronyme ?

**La RT pour "Reverse Transcription"** est une technique qui consiste à obtenir une molécule d'ADNc (ADN dit complémentaire) à partir d'une molécule d'ARN. Elle est effectuée grâce à une enzyme

appelée « Reverse Transcriptase ». Cette étape de rétrotranscription est nécessaire car la technique d'amplification de l'ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction) qui ne fonctionne pas sur de l'ARN, mais sur l'ADN. Il existe de nombreux kits de biologie moléculaire utilisés en laboratoire pour effectuer cette étape. On obtient ainsi l'ADNc rétrotranscrit du SARS-CoV-2.



**Figure 1: La rétrotranscription de l'ARN simple brin en ADN complémentaire double brin.**

Une fois l'ADNc obtenu, une région spécifique de l'ADN du SARS-CoV-2 est amplifiée grâce à la réaction de PCR.

**PCR pour "Polymerase Chain Reaction"**, ou en français Réaction en Chaîne par Polymérase, est une technique couramment utilisée en laboratoire et permet d'amplifier de manière exponentielle une séquence spécifique d'ADN afin d'obtenir, au final, jusqu'à un milliard de copies. Dans notre cas on cherchera à amplifier plusieurs séquences spécifiques de l'ADN du SARS-CoV-2.

En France, sur la base du protocole développé par l'Institut Pasteur, la RT-qPCR est effectuée en amplifiant spécifiquement 3 séquences spécifiques du SARS-CoV-2.

Deux séquences sont contenues dans un gène codant pour une enzyme très importante pour le virus (l'ARN polymérase ARN-dépendante) et la troisième séquence se situe dans un gène codant pour une protéine de l'enveloppe du virus (la protéine E).

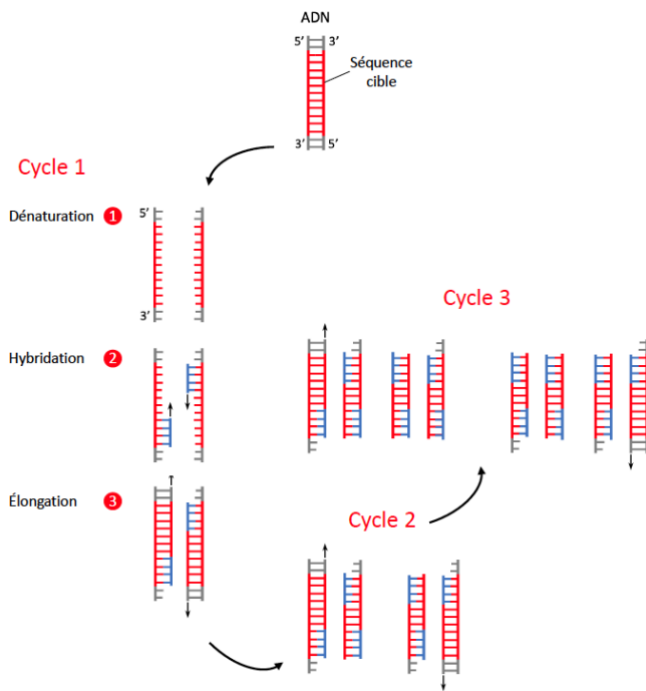
Ces 3 régions ne se retrouvent dans aucun autre virus ciblant les voies respiratoires tels que le virus de la grippe ou le MERS-CoV (influenza A(H1N1) pdm09, A(H3N2), B-Victoria, B-Yamagata; influenza C; RSV A, B; hBoV; hPIV; hMPV; HRV/enterovirus; adenovirus; hCoV (HKU1, OC43, 229E et NL63); MERS-CoV).

Les amorces d'ADN permettant d'amplifier spécifiquement ces 3 séquences de l'ADN viral ont pu être rapidement obtenues car la séquence complète du SARS-CoV-2 était disponible, dès le 11 janvier 2020, dans la database Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data (GISAID).

La PCR est caractérisée par des cycles, que l'on peut répéter 25 à 30 fois, permettant d'amplifier de façon exponentielle une séquence d'ADN. Ainsi, après 30 cycles, on peut passer de 1 copie de cette séquence à 1 milliard de copies, et ce en quelques heures seulement. Un cycle de PCR est constitué de 3 étapes distinctes : la dénaturation, l'hybridation et l'élongation.

1. La dénaturation permet, en chauffant à 95°C, d'ouvrir l'ADN double brin et de séparer les ADN simple brins.
2. L'hybridation, à 50-56°C, permet à des amorces spécifiques de s'hybrider sur l'ADN simple brin. Les amorces sont de courtes séquences d'ADN, complémentaires à la séquence à amplifier.
3. L'élongation, à 72°C, s'effectue grâce à l'ADN Taq-polymérase, une enzyme qui reconnaît les amorces fixées sur l'ADN simple brin et synthétise la séquence d'ADN spécifique contenu entre les deux amorces.

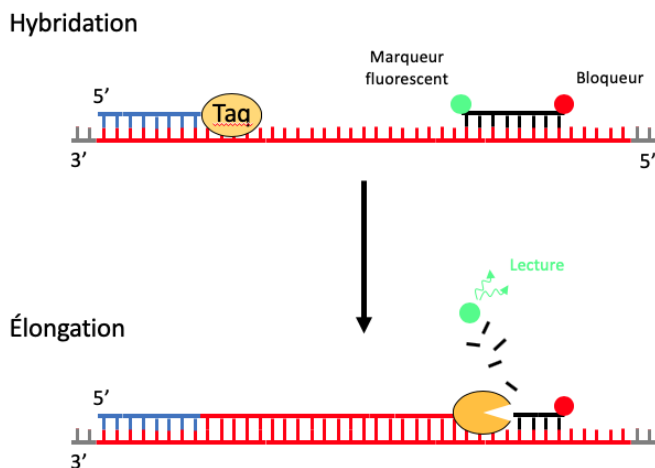
Une fois le cycle terminé, on recommence un nouveau cycle avec deux fois plus de matériel initial (ADN spécifique) que lors du cycle précédent. Ainsi, après 30 cycles on peut obtenir jusqu'à  $2^{30}$  copies de cette séquence d'ADN spécifique.



**Figure 2: Les étapes de la PCR ou Polymerase Chain Reaction.**

Enfin, on parle de **qPCR pour PCR quantitative** ou PCR en temps réel.

Le principe de la PCR quantitative est simple. C'est le même principe que l'amplification par la méthode de PCR, mais on peut visualiser l'évolution de la réaction en temps réel grâce à un appareil de PCR en temps réel muni d'une caméra ou d'un détecteur approprié. L'amplification de l'ADN est liée à la génération de fluorescence qui peut être facilement détectée par une caméra pendant chaque cycle. Ainsi, plus le nombre de copies d'ADN augmente, plus la fluorescence augmente.



**Figure 3: Exemple de sondes fluorescentes utilisées dans la RT-qPCR.**

Concernant la technique utilisée dans le protocole de l'Institut Pasteur, le marqueur fluorescent est une petite amorce spécifique de la région d'ADN que l'on cherche à amplifier qui porte un marqueur fluorescent et un bloqueur de cette fluorescence. Lorsque cette amorce est fixée sur l'ADN que l'on

cherche à amplifier, le bloqueur de fluorescence se situe à côté du marqueur fluorescent et bloque l'émission de fluorescence.

Lorsqu'à l'étape d'élongation l'ADN polymérase commence à synthétiser le nouvel ADN, elle va dégrader cette amorce, et le marqueur fluorescent va se retrouver sans le bloqueur de fluorescence, entraînant l'émission de fluorescence. Ainsi, à chaque cycle la quantité de fluorescence émise va augmenter proportionnellement avec la quantité d'ADN nouvellement formé.

Plus il y a d'ADN nouvellement fabriqué et plus la caméra va détecter en temps réel cette fluorescence. Il y aura donc proportionnalité entre la quantité de fluorescence détectée et la quantité d'ADN néo-synthétisé. Il existe une formule mathématique permettant de déterminer la quantité d'ADN initial dans l'échantillon testé.

La RT-qPCR permet ainsi de savoir à la fois si le SARS-CoV-2 est présent dans le prélèvement naso-pharyngé, mais également de savoir combien de virus étaient présents dans ce prélèvement.

#### Les résultats :

La RT-qPCR pratiquée lors de ces tests détecte, de façon très fiable, la présence de SARS-CoV-2 dans l'échantillon collecté (prélèvement naso-pharyngé). Cependant si le virus n'est pas présent dans cet échantillon, on pourra seulement conclure que le virus est absent dans ce prélèvement, mais en aucun cas que le patient n'est pas atteint par le SARS-CoV-2. En effet, le virus peut très bien se situer au niveau des bronches sans être détectable au niveau du nez et du pharynx (on sait qu'après 7-8 jours le virus descend dans les bronches et qu'il est moins, voire non détectable dans le nez).

#### Avantages des tests RT-qPCR :

Le prélèvement naso-pharyngé est facile à réaliser, rapide et non invasif.

Cette technique permet de détecter spécifiquement la présence du virus SARS-CoV-2.

Son utilisation est possible à grande échelle.

#### Limites de la RT-qPCR :

Il faut plusieurs heures avant d'obtenir un résultat et ce test nécessite d'être réalisé dans un laboratoire.

La qualité du prélèvement naso-pharyngé est primordiale. Si ce dernier est mal réalisé, le risque d'obtenir des résultats faux-négatifs est grand. A ce jour, on sait en effet que le pourcentage de faux-négatifs est important (environ 30%). Ceux-ci peuvent notamment être dus à un prélèvement mal réalisé, mais également parce que le virus, après 7-8 jours d'infection, quitte les voies respiratoires hautes (nez et pharynx) pour rejoindre les voies basses (poumons, bronches). Ainsi, après la première semaine d'infection, le virus n'est plus ou très peu présent dans les sécrétions récupérées par l'écouvillon naso-pharyngé.

La RT-qPCR ne fonctionne donc que sur les personnes malades au moment du test, dans la première semaine après infection.

#### Sources :

##### Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR.

Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DKW, Bleicker T, Brünink S, Schneider J, Schmidt ML, Mulders DGJC, Haagmans BL, van der Veer B, van den Brink S, Wijsman L, Goderski G, Romette JL, Ellis J, Zambon M, Peiris M, Goossens H, Reusken C, Koopmans MPG, Drosten C.

Euro Surveill. 2020 Jan;25(3). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045.

PMID: 3192387

Protocol: Real-time RT-PCR assays for the detection of SARS-CoV-2

Institut Pasteur, Paris

## Tests sérologiques

Les tests sérologiques visent à déterminer si un individu a été en contact avec le virus. Pour cela, ils détectent les anticorps, c'est-à-dire la réponse qu'a apporté le système immunitaire pour se défendre contre le virus.

### D'où viennent les anticorps et à quoi correspondent-ils ?

Lorsque l'organisme rencontre un nouvel agent pathogène, il produit une réponse immunitaire adaptative primaire : la production d'anticorps par les lymphocytes B. Les anticorps sont des complexes protéiques, de la famille des immunoglobulines, composés de deux chaînes lourdes (H) identiques et de deux chaînes légères (L) identiques. Chaque anticorps contient des domaines constants (conservés chez tous les anticorps d'un même organisme) et des domaines variables. Ces derniers permettent la reconnaissance de corps étranger *via* leur liaison à des fragments protéiques spécifiques de l'agent pathogène appelés antigènes.

Lors des premiers jours d'une infection, les lymphocytes B vont produire des immunoglobulines M (IgM), peu spécifiques du virus. Au fur et à mesure de la progression de l'infection, un processus de maturation des anticorps va permettre la production d'immunoglobulines de haute-affinité : les IgG. Les IgG sont plus spécifiques du pathogène causant l'infection que les IgM, ce qui permet une meilleure défense de l'organisme. De plus, les IgG sont conservées au sein de lymphocytes B mémoires qui permettent la mise en place d'une immunité à long terme en absence de mutation du pathogène.

Dans le cas du Covid-19, il semble que les IgM sont détectables environ 7 jours après le début des symptômes du Covid-19, et les IgG apparaissent plus tardivement, vraisemblablement dès 14 jours.

Leur présence permet donc d'attester d'une infection passée, cependant leur pérennité dans l'organisme est pour le moment inconnue. Elle est estimée à plusieurs mois par analogie avec d'autres types de coronavirus.

En général, dans le cas d'une seconde infection par le même pathogène, les IgG conservés dans la mémoire immunitaire permettent la défense rapide de l'organisme : c'est la réponse immunitaire adaptative secondaire.

La reconnaissance antigène/anticorps est au cœur de tous les tests de dépistage sérologiques.

Les tests sérologiques, peuvent être classés en deux grands groupes, ceux qui utilisent l'immunochromatographie, comme les tests de détection rapide (**TDR**), et ceux basés sur la méthode immuno-enzymatique **ELISA** (de l'anglais *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Il existe une troisième catégorie de tests, dits « tests de neutralisation », qui permettent de mesurer la capacité des anticorps d'un patient à neutraliser le virus. Ce dernier type de tests est celui qui est le moins fréquemment utilisé lors des dépistages à grande échelle - et ne sera pas détaillé ici - mais qui permet de déterminer les anticorps présents sont capables de neutraliser SARS-CoV-2.

### Comment fonctionnent les tests sérologiques rapides ?

C'est un test qualitatif basé sur le principe de l'immunochromatographie, c'est à dire la migration par diffusion des anticorps. Ces tests permettent la détection des IgG et des IgM dans le sang d'un individu, et cela en quelques minutes. Ils sont petits et portables et peuvent se présenter sous la même forme qu'un test de grossesse, en ce sens que des lignes colorées vont indiquer le résultat à l'utilisateur.

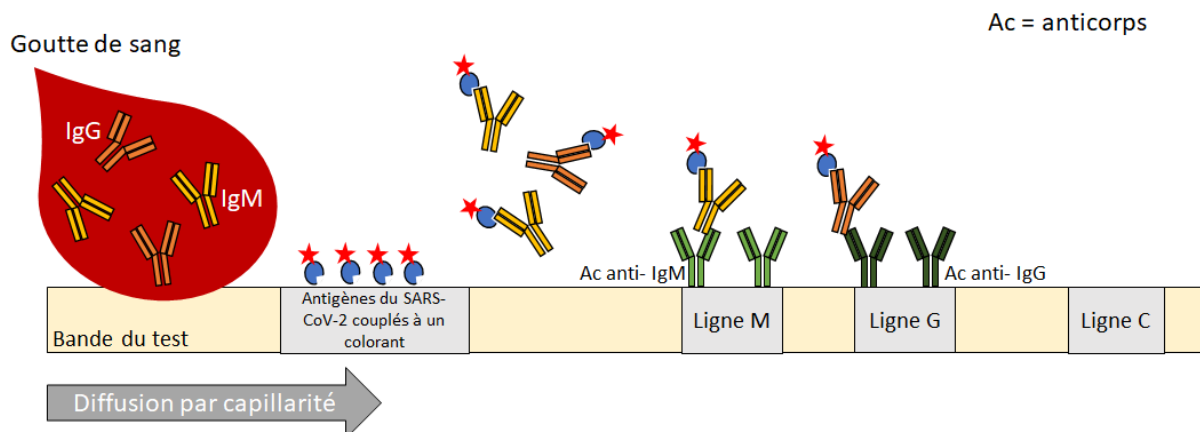
La cartouche de test est composée de trois bandes de détection (**Figure 4**) : une bande correspondant à la détection des IgM (ligne M), une autre pour la détection des IgG (ligne G), et enfin une bande de contrôle située à l'extrémité du test. Cette dernière apparaît uniquement si la migration de l'échantillon a bien eu lieu et permet d'attester du bon fonctionnement du test.

Dans le cas du SARS-CoV-2, un antigène du virus est couplé à un réactif coloré et déposé sur la première zone du test. Des anticorps anti-IgM humains et anti-IgG humains sont fixés respectivement sur les lignes M et G.

Après avoir été déposé sur le test, l'échantillon de sang migre par capillarité sur la bandelette. Au fur et à mesure que l'échantillon migre, les anticorps IgG et IgM anti SARS-CoV-2 (s'ils sont présents chez l'individu testé) se lient spécifiquement à l'antigène du SARS-CoV-2 marqué.

Les anticorps IgM anti-SARS-CoV-2 sont finalement immobilisés sur la ligne M en raison de la reconnaissance avec les anticorps anti-IgM humains (anticorps reconnaissant la partie non variable des IgM). Grâce au fait que l'antigène du SARS-CoV-2 est couplé à un élément qui permet la détection/visualisation il y a apparition d'une bande si dans l'échantillon sanguin il y a des IgM anti-SARS-CoV-2. Il en est de même pour les IgG anti-SARS-CoV-2 sur la ligne G.

Rappelons que les IgM sont produites peu de temps après le début de l'infection, et que les IgG apparaissent plus tardivement. Ainsi, l'apparition d'une bande M sur le test sera représentative d'une infection récente, tandis que l'apparition des bandes M et G signifiera une infection plus antérieure. Si l'échantillon du patient ne contient pas d'anticorps anti-SARS-CoV-2, aucune ligne n'apparaît sur le test (hormis la ligne C de contrôle).



**Figure 4 : Représentation d'un test sérologique, basé sur la détection des anticorps IgG et IgM.**

### Comment fonctionnent les tests ELISA ?

Ce test peut être qualitatif ou quantitatif et est généralement effectué dans un laboratoire. Ces tests utilisent des échantillons de sang total, de plasma ou de sérum de patients. Il existe plusieurs protocoles et variantes d'un même protocoles, ici nous détaillerons brièvement un exemple un de tests ELISA indirects.

Dans les puits de plaques en plastique, l'antigène du SARS-CoV-2 est fixé. Les échantillons des patients sont ensuite incubés avec l'antigène, et si le patient a des anticorps contre cet antigène, ils se lient ensemble. Le complexe anticorps-antigène peut ensuite être détecté avec un anticorps reconnaissant la partie non variable des IgM humains. Ce dernier anticorps étant lié à une enzyme capable de convertir son substrat en un produit coloré, on pourra relier l'activité enzymatique avec la présence d'anticorps anti-SARS-CoV-2

### Les avantages et les limites des tests sérologiques

Les tests sérologiques rapides sont simples à mettre en œuvre. Ils permettent de détecter les personnes immunisées contre le virus, ayant ou non développées les symptômes liés au Covid-19. Cependant, comme les anticorps peuvent apparaître tardivement selon les individus, ce type de test ne permet pas de détecter la maladie dès le début de l'infection. Ce test reste donc complémentaire à la RT-qPCR.

Lorsqu'ils fonctionnent, les tests sérologiques sont rapides et permettent de détecter les personnes ayant été infectées par le virus, qu'elles aient ou non développées les symptômes liés au Covid-19. Cependant, il y a plusieurs limitations :

- Comme les anticorps apparaissent en général quelques jours après infection, les tests sérologiques ne permettent pas de détecter la maladie au début de l'infection.
- La spécificité du test vis-à-vis du SARS-CoV-2 doit être bien assurée. En effet, il existe de nombreux coronavirus responsables des rhumes dont chacun d'entre nous peut être atteint chaque année. Il importe donc que le fragment du SARS-CoV-2 utilisé comme antigène soit bien spécifique, et en particulier le distingue des autres coronavirus afin d'éviter les "faux-positifs".

Ainsi, la mise au point pour le SARS-CoV-2 de tests sérologiques fiables et leur validation est une étape capitale (voir les liens pour le cahier des charges de la haute autorité de santé, et l'étude de l'Institut Pasteur). Plusieurs d'entre eux sont à l'heure actuelle encore dans cette phase de développement.

Il reste qu'on manque encore de connaissances à propos de la réponse immunitaire déclenchée face au SARS-CoV-2. La persistance des anticorps anti-SARS-CoV-2 chez les individus, et donc la durée de l'immunité face à ce virus, restent à caractériser.

Enfin, la nature exacte de la réponse immunitaire au SARS-CoV-2 n'est pas encore bien connue, et l'on ne peut encore prévoir avec certitude si la réponse détectée par les tests traduit une immunité c'est-à-dire la protection via le pouvoir neutralisant des anticorps.

Sources :

[https://www.has-sante.fr/icms/p\\_3179992/fr/cahier-des-charges-definissant-les-modalites-d-evaluation-des-performances-des-tests-serologiques-detectant-les-anticorps-diriges-contre-le-sars-cov-2](https://www.has-sante.fr/icms/p_3179992/fr/cahier-des-charges-definissant-les-modalites-d-evaluation-des-performances-des-tests-serologiques-detectant-les-anticorps-diriges-contre-le-sars-cov-2)

<https://www.pasteur.fr/fr/espace-presse/documents-presse/developpement-evaluation-quatre-tests-serologiques-detection-anticorps-anti-sars-cov-2-deux-tests>

<https://www.centerforhealthsecurity.org/resources/COVID-19/serology/Serology-based-tests-for-COVID-19.html#sec1>

Zhengtu L *et al.* 2020. Development and Clinical Application of A Rapid IgM-IgG Combined Antibody Test for SARS-CoV-2 Infection Diagnosis. *J Med Virol.* doi: 10.1002/jmv.25727.

Tang YW, Schmitz JE, Persing DH, Stratton CW. 2020. The Laboratory Diagnosis of COVID-19 Infection: Current Issues and Challenges. *J Clin Microbiol.* doi:10.1128/JCM.00512-20

Haveri A *et al.* 2020. Serological and molecular findings during SARS-CoV-2 infection: the first case study in Finland, January to February 2020. *Euro Surveill.* doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.11.2000266

Wölfel, R., Corman, V.M., Guggemos, W. *et al.* Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature* (2020). <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2196-x>