

# Les infections à coronavirus humains

Nathalie Kin<sup>a,\*</sup>, Astrid Vabret<sup>b</sup>

## RÉSUMÉ

Les coronavirus humains (HCoV) sont des virus à ARN simple brin. Il existe actuellement quatre coronavirus dits « classiques » ou « nouveaux », dont la circulation est hivernale. Ils sont à l'origine d'infections respiratoires modérées dans la population générale. Cependant, les infections peuvent être plus sévères dans les populations susceptibles. Notamment, les HCoV sont impliqués dans 2 à 7 % des hospitalisations consécutives à une infection respiratoire, en particulier chez les enfants et les personnes âgées ou immunodéprimées. De ce fait, ils appartiennent au panel de virus respiratoires recherchés lors des diagnostics de routine des infections respiratoires par des outils de biologie moléculaire. Ces coronavirus dits circulants sont à distinguer des deux coronavirus émergents, le SARS-CoV et le MERS-CoV qui sont associés à des pathologies respiratoires plus sévères. Ils se distinguent des autres HCoV par leur potentiel épidémique plus élevé, leur impact sanitaire plus important et leur mode de circulation atypique. À l'instar des paramyxovirus et des virus *Influenza*, les coronavirus doivent être surveillés pour leur risque d'émergence dans la population humaine à partir d'un réservoir animal.

Coronavirus humain - diagnostic - infection respiratoire.

## 1. Introduction

Les coronavirus humains (HCoV) sont à l'origine d'infections respiratoires plus ou moins sévères selon la population étudiée. À ce jour, six coronavirus humains sont décrits. Parmi eux, deux coronavirus dits « classiques », les HCoV-OC43 et -229E ont été identifiés dans les années 1960 [1,2]. Les deux HCoV-NL63 et -HKU1, sont dits « nouveaux » car ils ont été identifiés plus récemment, au début des années 2000 [3-5]. Ces HCoV sont généralement associés à des infections respiratoires peu sévères. Ils sont à distinguer des deux HCoV émergents, le SARS-CoV (*Severe acute respiratory syndrome associated coronavirus*) et le MERS-CoV (*Middle-East respiratory syndrome coronavirus*), qui sont les seuls à être associés à un syndrome de détresse respiratoire aigu ou SDRA [6,7].

### **a** Unité de Recherche Risques Microbiens (EA4655)

Université de Caen Normandie,  
Esplanade de la Paix,  
F-14000 Caen

### **b** Laboratoire de virologie

CHU Caen,  
Avenue Georges Clemenceau,  
F-14000 Caen

\* correspondance

nathalie.kin01@gmail.com

article reçu le 30 août 2016, accepté le 30 septembre 2016.

© 2016 – Elsevier Masson SAS – Tous droits réservés.

## SUMMARY

### New therapies against HCV

Human coronaviruses (HCoV) are single strand RNA viruses. To date, there are four so-called « classical » or « novel » HCoVs, characterized by a winter circulation. These coronaviruses are responsible for mild respiratory infection in general population. However, HCoVs are associated to more severe respiratory tract infection among susceptible population. Indeed, HCoVs account for 2 to 7 % of hospitalizations due to a respiratory infection, particularly among children, immunocompromised or elderly people. Thereby, HCoVs are included in the panel of respiratory viruses detected in routine using molecular biology tools. These four circulating HCoVs have to be distinguished from the two emerging HCoVs: SARS-CoV and MERS-CoV. These later are associated to a more severe respiratory infection and differ from other HCoVs by their increased epidemic potential, their more important health impact, and their atypical circulation. Such as paramyxoviruses and Influenza viruses, coronaviruses have to be monitored due to their associated risk of emergence in human population from animal reservoirs.

Human coronavirus - diagnosis - respiratory infection.

## 2. Taxonomie et historique des coronavirus

Le terme coronavirus fait référence à la sous-famille des *Coronavirinae*, appartenant à la famille des *Coronaviridae*, elle-même faisant partie de l'ordre des *Nidovirales*. Les coronavirus infectent de nombreuses espèces mammifères et aviaires. Selon la taxonomie actuelle, les *Coronavirinae* sont subdivisés en quatre genres nommés *Alpha-*, *Beta-*, *Gamma-* et *Deltacoronavirus*. Les HCoV-229E et -NL63 appartiennent au genre *Alphacoronavirus*. Les quatre autres coronavirus humains appartiennent au genre *Betacoronavirus* qui est lui-même subdivisé en quatre clades nommés A, B, C et D [8]. Les HCoV-HKU1 et -OC43 sont inclus dans le clade A, le SARS-CoV et le MERS-CoV appartiennent aux clades B et C respectivement (*figure 1*).

Les coronavirus sont connus dans la communauté vétérinaire depuis la fin des années 1930. Lors de l'identification des premiers coronavirus humains HCoV-OC43 et -229E dans les années 1960, une vingtaine de coronavirus infectant des espèces animales aviaires (poulet) et mammifères (chien, chat, porc, bovin, etc.) étaient déjà décrits [2]. Lors de l'identification de ces premiers HCoV, les pathologies respiratoires associées étaient considérées comme trop



le terme « *corona* » signifiant « couronne » en latin. En plus de la protéine S, la particule virale est constituée par trois autres protéines structurales : la protéine de la nucléocapside N, la protéine de membrane ou matrice M et la protéine d'enveloppe E. De plus, les *Betacoronavirus* de clade A contiennent une cinquième protéine structurale, l'hémagglutinine estérase HE (*figure 2*) [10].

Les coronavirus sont caractérisés par un génome ARN positif simple brin, non segmenté et polyadénylé. Les génomes des coronavirus ont une taille avoisinant les 30 kilobases (kb). Ce sont les plus grands génomes de virus ARN répertoriés à ce jour. D'un point de vue général, les deux-tiers 5' du génome, soit environ 18 à 20 kb, sont constitués par deux cadres de lecture ouverts ou ORF (*Open Reading Frame*), nommés ORF1a et ORF1b [11]. L'ORF1ab, correspondant à la fusion des ORF1a et ORF1b, permet la traduction d'une polyprotéine nommée pp1ab grâce à un nœud de phase efficace à 25 % [12]. Cette polyprotéine est ensuite clivée par des protéases virales en 16 protéines non structurales (nsp, *non structural protein*) nommées nsp1 à nsp16. Elles sont impliquées dans le complexe de réplication et de transcription des coronavirus. Le tiers 3' du génome des coronavirus est constitué par au moins quatre cadres de lecture ouverts codant les protéines structurales S, E, M et N. Les *Betacoronavirus* de clade A (dont HCoV-OC43 et -HKU1) contiennent un cinquième gène codant une protéine structurale, l'hémagglutinine estérase (HE). De plus, les différents génomes de coronavirus se distinguent entre eux par la présence ou non d'ORF putatifs supplémentaires codant des protéines accessoires (*figure 3*) [13].

## 4 Manifestations cliniques des infections à coronavirus

### 4.1. Cas des coronavirus « classiques » et « nouveaux »

Les coronavirus « classiques » (HCoV-OC43 et HCoV-229E) et « nouveaux » (HCoV-HKU1 et HCoV-NL63) sont généralement associés à des infections peu sévères des voies respiratoires hautes. Les infections à coronavirus sont caractérisées par des symptômes non spécifiques et variables selon les patients. Dans la population générale, l'infection à HCoV est le plus souvent associée à une rhinite ou une rhinopharyngite plus ou moins symptomatique [14]. Lorsque l'infection est symptomatique, les signes cliniques les plus souvent décrits sont la fièvre, la toux, des myalgies et une congestion nasale. Les pathologies induites par les différents HCoV sont similaires et le tableau clinique seul ne permet pas de les distinguer entre eux ou vis-à-vis d'autres virus respiratoires, tel que les rhinovirus, les virus Influenza, les métapneumovirus, le virus syncytium respiratoire (RSV) ou les virus para influenza (PIV). Chez les personnes âgées, les jeunes enfants et les patients immunodéprimés, des infections du tractus respiratoire plus sévères voire fatales peuvent être observées [15,16]. Par exemple, le HCoV-NL63 a été associé à des bronchiolites et des broncho-trachéites, deux infections aiguës des voies respiratoires basses des nourrissons [17]. Le HCoV-HKU1 quant à

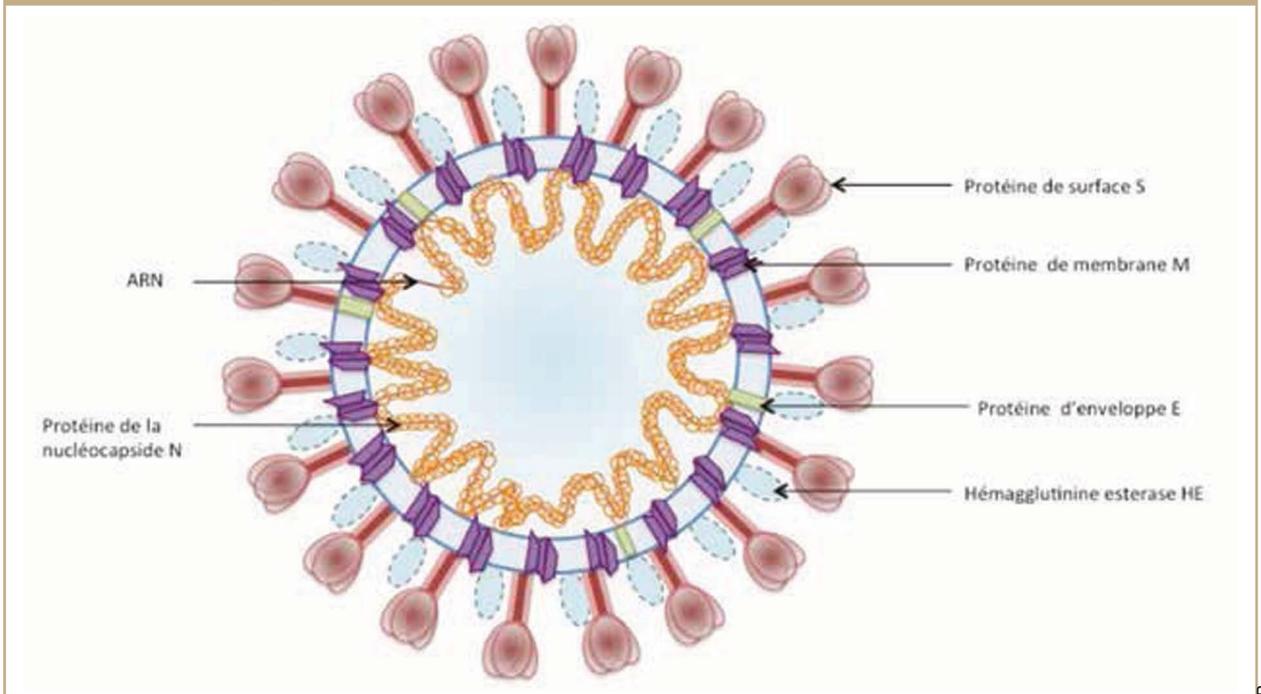
lui a été identifié pour la première fois chez un patient souffrant de pneumonie. Par la suite, il a été associé à des pneumonies communautaires majoritairement chez les personnes âgées ou présentant une pathologie sous-jacente [18].

Lors d'une infection à HCoV, une pathologie entérique modérée (gastro-entérite, diarrhée) est parfois observée en plus de la pathologie respiratoire. À ce jour, il n'est pas encore clairement défini si l'atteinte entérique est une conséquence indirecte de l'infection ou si les HCoV ont un tropisme entérique avéré [19]. Les HCoV ont à plusieurs reprises été incriminés dans des atteintes neurologiques. Plusieurs études déjà anciennes tendent notamment à les associer à la sclérose en plaque (SEP). Les premières spéculations quant à l'implication d'un coronavirus dans la SEP remontent aux années 1980. Les études se basaient alors sur l'observation de particules similaires aux coronavirus dans le cerveau de patients morts de SEP ou sur la détection d'anticorps dirigés contre les coronavirus, particulièrement HCoV-229E et HCoV-OC43 [20,21]. Plus récemment, des études moléculaires ont permis de détecter les ARN de ces coronavirus dans les fluides cérébraux-spinaux ou dans le cerveau de patients dont certains étaient atteints de SEP ou d'autres troubles neurologiques, mais également au sein d'un groupe contrôle. Ces données suggèrent un potentiel neuroinvasif de ces coronavirus, mais leur implication dans le développement de pathologies neurologiques est débattue.

### 4.2. Le Syndrome Respiratoire Aigu Sévère ou SRAS

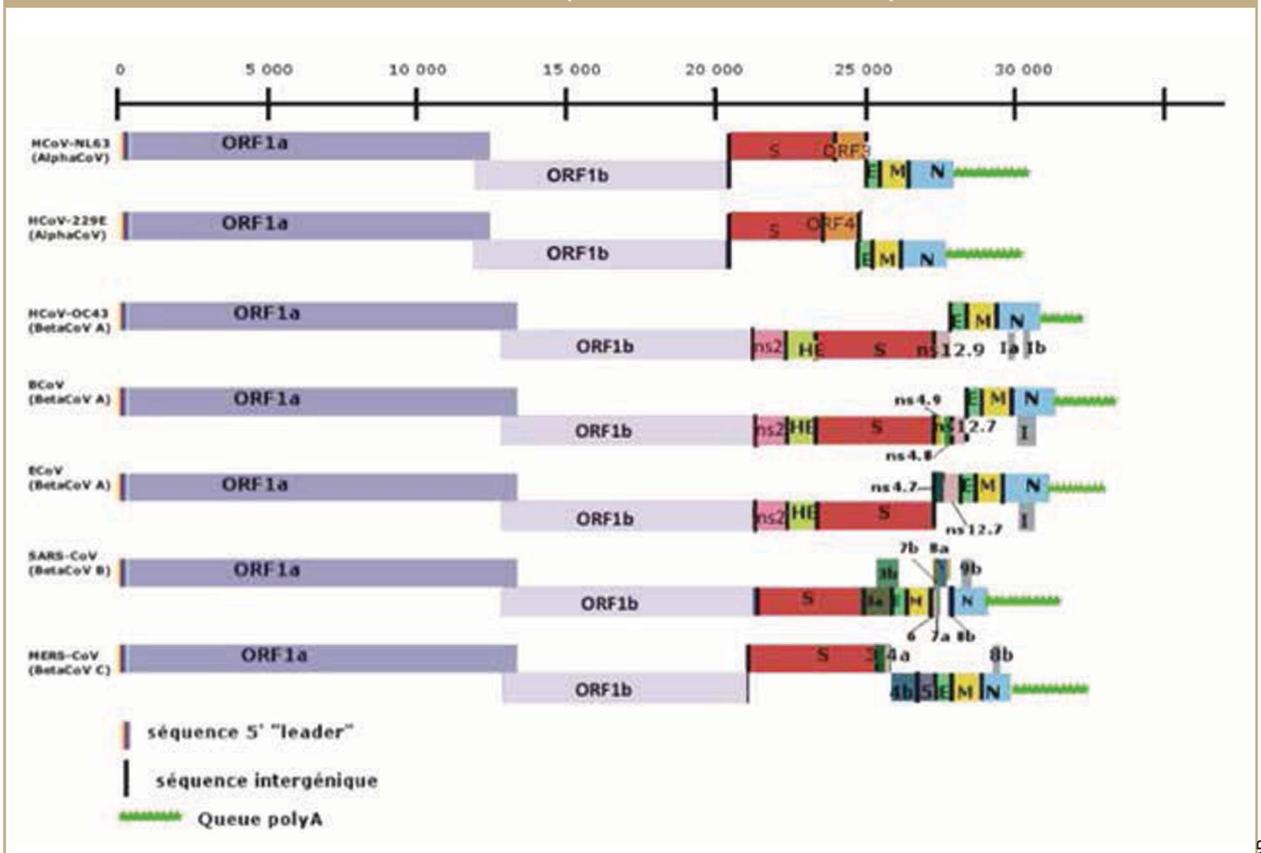
Le terme SRAS désigne la pathologie induite par le SARS-CoV. Celui-ci est un coronavirus qui a émergé en novembre 2002 et qui a circulé de manière pandémique jusqu'à juillet 2003. Le SARS-CoV est caractérisé par une période d'incubation de 2 à 14 jours. Les premiers symptômes observés sont une forte fièvre, supérieure à 38 °C, ainsi qu'un syndrome respiratoire modéré. Des toux, des maux de tête ou de gorge et un état de fatigue général ont également été rapportés chez certains patients. En quelques jours, les symptômes évoluent, provoquant un syndrome de détresse respiratoire aiguë pouvant nécessiter une aide respiratoire chez les patients les plus susceptibles. Lors de l'infection par le SARS-CoV, les leucocytes neutrophiles et les macrophages s'infiltrent dans les poumons et initient une réponse inflammatoire. Le niveau de cytokines pro-inflammatoires augmente, tandis qu'une lymphopénie est observée. Ces phénomènes sont à l'origine des altérations qui se produisent dans les poumons, notamment, d'un dommage alvéolaire diffus (DAD). Parallèlement, une formation de membranes hyalines et d'œdèmes est observée. Ces altérations morphologiques ont pour conséquence une hypoxie. Dans un second temps, le DAD est associé à une hyperplasie des pneumocytes de type II et à une métaplasie squameuse, ces deux caractéristiques étant révélatrices d'un processus de cicatrisation des poumons. L'aggravation de ces altérations histologiques peut entraîner une pneumonie sévère et le décès du patient. À la radiographie, une condensation uni- ou bilatérale des poumons est observée.

Figure 2 – Schéma de la structure d'un *Betacoronavirus* de clade A.



La protéine S forme de larges projections à la surface. La protéine HE, exclusive des *Betacoronavirus* de clade A, forme une seconde rangée de projection à la surface du virion. Les protéines M et E sont les constituant de l'enveloppe. La protéine N forme une nucléocapside hélicoïdale en interaction avec l'ARN.

Figure 3 – Comparaison de l'organisation génomique du HCoV-NL63 (*Alphacoronavirus*), du HCoV-OC43 (*Betacoronavirus* de clade A), du SARS-CoV (*Betacoronavirus* de clade B) et du MERS-CoV (*Betacoronavirus* de clade C).



La transmission du SARS-CoV se fait principalement via les sécrétions respiratoires émises par une personne infectée [22]. Quelques cas d'infections asymptomatiques et de pathologies respiratoires hautes peu sévères associées au SARS-CoV ont été détectés. Chez de nombreux patients infectés par le SARS-CoV, des troubles digestifs caractérisés le plus souvent par une diarrhée liquide ont été décrits. La présence de SARS-CoV au niveau de l'épithélium intestinal a d'ailleurs été mise en évidence. Cependant, l'observation des tissus intestinaux à partir de coloscopies et de nécropsies n'a pas révélé d'altérations morphologiques consécutives à la réplication virale du SARS-CoV dans l'intestin. La plus forte proportion de troubles digestifs associés au SARS-CoV a été observée à Hong-Kong, lors d'une épidémie communautaire qui s'est déclarée dans le complexe résidentiel de l'Amoy Gardens. Au cours de cette épidémie 73 % des 321 patients infectés ont développé des troubles digestifs en plus de la symptomatologie respiratoire. Cette épidémie aurait eu pour origine un défaut dans le système de gestion des eaux usées au sein de la résidence, conduisant à l'émission d'aérosols contaminés via les canalisations [23,24]. Le SARS-CoV est détecté dans le sang très précocement après le début des symptômes [25]. Cette virémie peut expliquer la présence de SARS-CoV dans l'intestin et dans les selles, mais la déglutition pourrait également y jouer un rôle. Le SARS-CoV est excrété dans les selles jusqu'à environ 20 jours après le début des symptômes. La présence de SARS-CoV dans les selles constitue l'un des meilleurs marqueurs de l'infection. Cependant, les tentatives d'isolement du SARS-CoV à partir de prélèvements de selles n'ont jamais abouti.

### 4.3. Manifestations cliniques du MERS-CoV

Le MERS-CoV est à l'origine d'une pathologie respiratoire sévère. Les premiers symptômes observés sont un état pseudo-grippal accompagné de fièvre et d'une toux non productive. L'aggravation des symptômes entraîne un syndrome de détresse respiratoire aiguë et une hypoxie, nécessitant souvent une assistance respiratoire. Les patients âgés, immunodéprimés ou présentant une comorbidité (diabète de type 2, hypertension artérielle, insuffisance rénale chronique, obésité, etc.) sont plus susceptibles de développer une pathologie respiratoire sévère et de succomber à l'infection par le MERS-CoV. Le décès fait suite à une insuffisance respiratoire pouvant être associée à une défaillance multi-organe. Des cas de défaillances rénales associées à la défaillance respiratoire ont été décrits. Quelques cas de troubles digestifs ont également été rapportés [7,26]. En France, deux cas de MERS-CoV ont été décrits en avril-mai 2013, dont un cas fatal [27].

Le MERS-CoV est caractérisé par une période d'incubation de 2 à 13 jours. Une plus grande charge virale est observée dans les prélèvements respiratoires bas que dans les prélèvements respiratoires hauts, ce qui peut expliquer le faible potentiel de transmission de personne à personne. Les mécanismes de la pathogénèse sont encore mal connus. Cependant, il semble que les pneumocytes constituent une cible importante du MERS-CoV [28].

## 5. Circulation

### 5.1. Les coronavirus classiques et nouveaux

Depuis l'émergence du SARS-CoV en 2002-2003, de nombreuses études épidémiologiques des HCoV ont été réalisées, utilisant des outils sérologiques et moléculaires de plus en plus performants et sensibles. Dans les dernières études épidémiologiques menées dans différents pays d'Afrique, d'Asie, d'Amérique du Nord et du Sud, d'Europe et d'Australie entre 2001 et 2014, un HCoV a été détecté dans 2,1 à 12 % des prélèvements respiratoires soumis à un diagnostic moléculaire respiratoire. Les HCoV sont à l'origine de 2 à 7 % des hospitalisations consécutives à une infection aiguë du tractus respiratoire, notamment chez les enfants et les personnes âgées ou immunodéprimées. Ces études mettent en avant une circulation saisonnière en automne et en hiver dans les régions tempérées, où l'année est divisée en quatre saisons distinctes. Il semble également y avoir une variation cyclique tous les deux à trois ans des différents HCoV [14,29]. Globalement, HCoV-OC43 et HCoV-NL63 sont les coronavirus les plus souvent détectés. Cette tendance peut être associée à une éventuelle protection immunitaire de HCoV-NL63 vis-à-vis de HCoV-229E d'une part et HCoV-OC43 vis-à-vis de HCoV-HKU1 d'autre part, du fait de leur appartenant au même genre (*Alphacoronavirus* et *Betacoronavirus* respectivement). HCoV-NL63 et HCoV-OC43 sont les coronavirus rencontrés le plus tôt dans l'enfance. La séroconversion vis-à-vis de ces coronavirus a lieu avant l'âge de 3 ans chez la plupart des enfants. Les individus chez lesquels ces virus sont le plus couramment détectés sont les jeunes enfants, les personnes âgées et le personnel soignant. Cependant la pathologie induite étant majoritairement bénigne, chaque individu est susceptible de rencontrer l'un de ces virus sans qu'il ne fasse l'objet d'un diagnostic viral [19,30]. En effet, en 2008, Severance *et al.* ont mis en évidence que plus de 90 % d'un groupe de 196 adultes représentatifs de la population général a été exposé aux HCoV-OC43, -229E et -NL63, alors qu'une proportion plus faible de 59,2 % a été exposée à HCoV-HKU1 [31].

### 5.2. L'histoire du SARS-CoV

La pandémie de SARS-CoV a débuté en novembre 2002 dans le delta de la rivière Pearl (Guangdong, Sud de la Chine) par une vague de pneumonies atypiques non épidémiologiquement liées, touchant au moins 11 personnes. Cette première vague fut à l'origine d'au moins deux *clusters* épidémiques dans cette même région de Guangdong au cours de l'hiver 2002-2003. En février 2003, un médecin ayant soigné des patients infectés par le SARS-CoV à l'hôpital de Zhongshan a propagé l'infection à 15 clients de l'Hôtel Metropole de Hong-Kong où il séjournait. Cet événement fut probablement à l'origine de la propagation de l'épidémie à l'échelle mondiale lorsque les cas secondaires infectés, en transfert vers leur destination finale, ont permis la diffusion du SARS-CoV à différents pays dont le Vietnam, le Canada et les USA [22]. Il s'en est suivi une pandémie d'une durée de 144 jours qui a atteint 32 pays. En mars 2003, l'OMS a déclenché une alerte mondiale. Alors que le SARS-CoV se propageait dans le

monde entier, la période de mars-avril 2003 a été marquée par deux épidémies majeures de SARS-CoV à Hong-Kong. La première épidémie s'est manifestée à l'Hôpital Prince of Wales de Hong-Kong, occasionnant 153 cas. Au cours de la seconde épidémie, 321 résidents d'un complexe d'appartement, l'Amoy Gardens, ont été contaminés par le SARS-CoV à partir d'un seul cas index, un patient suivi à l'Hôpital Prince of Wales [24,32]. La fin de la pandémie a été déclarée par l'OMS en juin 2003. Plus de 8 000 personnes auraient été infectées au cours de cette pandémie associée à un taux de mortalité global de 10 % et de plus de 50 % chez les seniors. En 2003-2004, quelques cas de SARS-CoV non épidémiologiquement liés ont été détectés en Chine, dans le delta de la rivière Pearl (Guangdong), mais n'ont eu aucun impact épidémique par la suite. Ce furent les derniers cas de SARS-CoV identifiés. Le contrôle de l'épidémie de SARS-CoV n'a été possible que par la mise en place de mesures sanitaires drastiques dont la fermeture des frontières. Ces mesures ont eu pour conséquence une perte économique importante notamment pour l'Asie. Le coût de la gestion de cette pandémie a été estimé entre 30 et 60 milliards de dollars.

### 5.3. L'émergence du MERS-CoV

Le MERS-CoV, a été identifié, en septembre 2012, soit 10 ans après le SARS-CoV. Le prélèvement source a été collecté chez un patient âgé de 60 ans, atteint d'une pneumonie et hospitalisé à l'hôpital de Jeddah (Arabie Saoudite). Un second cas a ensuite été détecté aux Royaume-Uni, chez un patient originaire du Qatar et sans lien épidémiologique avec le premier patient [7,33]. Une étude rétrospective a permis d'associer le MERS-CoV à une épidémie qui est survenue en avril 2012 au sein de l'hôpital de Zarqua en Jordanie [34]. En date du 21 mars 2016, 1 694 cas de MERS-CoV ont été notifiés à l'OMS dont 605 mortels [35]. À ce jour, la plupart des cas sont restreints à la péninsule Arabique, notamment l'Arabie Saoudite et le Qatar. Le MERS-CoV a cependant été identifié dans 26 pays d'Afrique, d'Europe, d'Amérique du Nord et d'Asie. La plupart de ces cas sont épidémiologiquement liés à l'épidémie du Moyen-Orient. Au début du mois de juin 2015, le premier cas de MERS-CoV en Corée du Sud a été détecté. Il constitue la première introduction du MERS-CoV en Asie. Le patient index, de retour d'un voyage en Arabie Saoudite, a fréquenté trois centres de soins différents avant que le diagnostic de MERS-CoV n'ait été établi. Ce seul cas index fut à l'origine d'une épidémie majeure en Corée du sud. En effet, en moins de deux mois, 166 personnes furent infectées dont 30 cas furent fatals [36].

Les dernières études épidémiologiques semblent indiquer que le MERS-CoV circule sous la forme de *clusters* nosocomiaux ou familiaux au sein desquels les MERS-CoV qui les composent sont épidémiologiquement liés, alors que chaque cluster semble provenir d'une source d'infection différente. Ces données suggèrent que le MERS-CoV, dont le  $R_0$  est inférieur à 1, n'est pas totalement adapté à l'Homme et que l'épidémie actuelle serait la conséquence d'une source d'infection mobile d'origine animale. Le réservoir animal suggéré est le dromadaire. En effet, dans la péninsule Arabique, une prévalence importante d'anticorps neutralisants anti-MERS-CoV a été observée parmi les populations

de dromadaires. Notamment, à Oman, ces anticorps neutralisants anti-MERS-CoV ont été détectés chez l'ensemble des dromadaires testés en 2012-2013. Parallèlement, dans les îles Canaries (Espagne) les anticorps neutralisants anti-MERS-CoV ont été détectés chez moins de 10 % des dromadaires testés sur la même période et dans les mêmes conditions [37]. La recherche rétrospective d'anticorps neutralisants anti-MERS-CoV a permis leur détection dans des populations de dromadaires depuis 1993 en Arabie Saoudite et depuis 2003 aux Émirats Arabes Unis [38,39]. Des études de séroprévalence chez les dromadaires ont également été réalisées en Afrique de l'Est, qui exporte des dromadaires vers la péninsule Arabique. Des anticorps neutralisant anti-MERS-CoV ont notamment été trouvés parmi les populations de dromadaires de Somalie depuis 1983, du Soudan depuis 1984, du Kenya depuis 1992 et d'Égypte depuis 1997. À noter que le Soudan est le pays dont la population de dromadaires est la plus importante. À ce jour, aucun cas de MERS-CoV autochtone chez l'Homme n'a été rapporté dans ces pays d'Afrique. Cependant, la situation géopolitique actuelle de ces pays, notamment les guerres civiles au Soudan et en Somalie, pourrait avoir contribué à ce que d'éventuelles infections à MERS-CoV dans la population humaine passent inaperçues [38-40].

## 6. Diagnostic de l'infection par les coronavirus

### 6.1. Détection des coronavirus «classiques» et «nouveaux»

En clinique, le diagnostic des infections à coronavirus met en jeu des techniques de diagnostic directe, c'est-à-dire permettant la mise en évidence de l'agent pathogène et non de la réponse de l'hôte à cet agent par la production d'anticorps. En effet, ces virus sont responsables d'infections respiratoires aiguës pour lesquelles la sérologie n'est pas pertinente. Cependant, les techniques de sérologies sont largement utilisées en épidémiologie et pour étudier l'impact et la diffusion de ces virus, c'est pourquoi il est opportun de demander un tube de sang dans le contexte du diagnostic des infections respiratoires. Le diagnostic des infections à coronavirus est réalisé par des techniques de RT-PCR. Les coronavirus humains étant caractérisés par un tropisme respiratoire, la technique de RT-PCR est réalisée sur des prélèvements respiratoires. Le développement des premières techniques de détection des HCoV par RT-PCR remonte aux années 1990. Elles étaient cependant peu utilisées en diagnostic du fait de leur coût élevé. Les coronavirus n'étaient de plus pas recherchés en routine lors des tests de diagnostic des infections respiratoires car leur impact était considéré comme négligeable. Les premières techniques de détection des coronavirus par PCR nichée ou RT-PCR ont vu le jour en 1994 et 1995. Le gène N était alors la cible privilégiée, du fait de son caractère conservé au sein d'une même espèce de coronavirus et parce qu'il est exprimé en abondance dans la cellule infectée [41]. Cependant, d'autres RT-PCR plus récentes ciblent le gène M pour les mêmes raisons [42,43]. Ces techniques moléculaires se sont avérées plus rapides, plus sensibles et plus spécifiques que les autres techniques de détection

d'anticorps ou d'antigène, directes ou indirectes, utilisées jusqu'alors [44,45]. Signalons que pour HCoV-OC43 et -229E, l'obtention d'isolats cliniques par culture cellulaire était alors et reste aujourd'hui difficile voire impossible. Ceci est également vrai pour les HCoV-NL63 et -HKU1 découverts plus récemment, qui ont de ce fait bénéficié des outils moléculaires dès leur identification.

La détection des coronavirus par RT-PCR a été incluse dans le diagnostic de routine des infections à virus respiratoires après l'émergence du SARS-CoV en 2002-2003, quand il s'est avéré que les HCoV pouvaient être à l'origine d'infections respiratoires sévères. Les RT-PCR en temps-réel et les PCR multiplex, permettant la détection simultanée des quatre HCoV-OC43, -NL63, -HKU1 et -229E, sont de plus en plus répandues [29]. Les HCoV appartiennent au panel de pathogènes respiratoires recherchés lors du diagnostic de routine des infections respiratoires, qui inclut également les virus influenza A et B, les virus respiratoires syncytial, les rhinovirus, les adénovirus, le metapneumovirus humain et les virus parainfluenza pour n'en citer que quelques-uns. Le diagnostic de routine de ces infections respiratoires est facilité par la mise à disposition de trousse commerciales permettant une standardisation et une automatisation des procédures. De nombreuses trousse de diagnostic basées sur le multiplexage de PCR et RT-PCR existent à ce jour. Celles-ci sont régulièrement optimisées de manière à inclure de nouvelles cibles virales et bactériennes. Le **tableau 1** liste les principales trousse de détection des virus respiratoires qui incluent les coronavirus humains.

## 6.2. Détection des coronavirus émergents

Pour les coronavirus émergents, les enjeux du diagnostic moléculaire sont particulièrement importants. Les techniques de RT-PCR sont faciles à développer dès lors que les premières données génomiques sont disponibles. Ces techniques peuvent alors être implémentées dès les phases précoces de l'épidémie. Lors de l'élaboration de la technique, il est important de choisir des régions permettant une amplification spécifique et sensible. Dans le cas du SARS-CoV, les RT-PCR de première génération, élaborées au sein des laboratoires susceptibles de recevoir des échantillons à tester, se basaient exclusivement sur l'amplification d'un segment du premier cadre de lecture codant le complexe de réplication (ORF1ab). Ces techniques de première génération, ont permis de démontrer que les prélèvements respiratoires hauts (prélèvements de gorge et aspirations nasales) étaient associés à un taux de détection plus important que les prélèvements fécaux et les urines [46–49]. Dès avril 2003, des RT-PCR de seconde génération, ciblant un fragment de l'ORF1b, ont été mises au point et commercialisées, tels que la trousse RealArt HPA coronavirus LC (Artus, Hambourg, Allemagne) et la trousse LightCycler SARS-CoV quantification (Roche, Penzberg, Allemagne). Ces deux trousse, d'efficacité équivalente, permettent un taux de détection, tout type d'échantillon confondu, d'environ 70 %. Les prélèvements respiratoires bas permettent d'obtenir le meilleur taux de détection par rapport aux autres types d'échantillons testés (prélèvements respiratoires haut et selles). Cependant, la procédure de collecte des prélèvements respiratoires bas est délicate et constitue souvent un acte invasif augmentant le risque

d'infections nosocomiales. De ce fait, les prélèvements fécaux constituent une bonne alternative, en dépit d'un taux de détection légèrement inférieur à celui observé avec les prélèvements respiratoires bas. À noter que l'excrétion du virus dans les selles peut perdurer jusqu'à 4 semaines après le début des symptômes, ce qui constitue un atout supplémentaire pour ce type de prélèvement [50].

Le MERS-CoV, a été identifié grâce à une RT-PCR consensus ciblant l'ORF1ab réalisée sur un surnageant de culture [51]. Le séquençage du génome complet du MERS-CoV, moins d'un mois après son identification en 2012, a permis la mise en place très rapide des premiers tests moléculaires [52]. Des RT-PCR en temps-réel spécifiques du MERS-CoV ont notamment été élaborées et publiées en septembre 2012. La détection du MERS-CoV fait alors intervenir deux RT-PCR en temps réel, l'une ciblant une région génomique en amont du gène E (*upE*) et l'autre une région génomique localisée dans l'ORF1b. La région de l'ORF1b choisie est spécifique et ne recouvre pas la région de ce gène qui est ciblée par les RT-PCR consensus.

L'OMS préconise l'utilisation de la RT-PCR *upE* en première intention car elle est plus sensible que la RT-PCR ORF1b. Celle-ci peut cependant être utilisée pour confirmation d'un résultat positif avec la RT-PCR *upE*. D'autres techniques de confirmation peuvent être associées à cette technique, notamment une RT-PCR ciblant une région de l'ORF1a. Celle-ci, en plus d'être spécifique, a montré une sensibilité similaire à la RT-PCR en temps réel *upE*. Enfin, dans le but d'apporter des données génomiques, deux RT-PCR de séquençage d'un fragment de l'ORF1ab et d'un fragment du gène N ont également été mises au point. La RT-PCR de séquençage N est plus spécifique. La RT-PCR de séquençage de l'ORF1ab l'est moins car elle a été spécialement conçue pour cibler d'autre *Betacoronavirus* de clade C. Une trousse commerciale a été développée en 2013, la trousse RealStar MERS-CoV RT-PCR kit 1.0, distribuée

**Tableau 1 – Trousse commerciales permettant la détection par PCR de pathogènes respiratoires, incluant les HCoV classiques et nouveaux.**

Nom de la trousse	Fabricant
<b>Easyplex Respiratory Pathogen 12</b>	Ausdiagnostics, Sydney, Australia
<b>FilmArray RP</b>	BioMérieux, France
<b>MultiCode®-PLx</b>	EraGen Biosciences, Madison, WI, US
<b>Fast Track Diagnostics Respiratory Pathogen 33</b>	Fast Track Diagnostics, Luxembourg
<b>eSensor RVP XT-8 / ePlex</b>	GenMark Diagnostics, Carlsbad, CA, US
<b>CLART PneumoVir 2</b>	Genomica, Coslada, Spain
<b>AdvanSure™ RV</b>	LG life science, Seoul, Korea
<b>xTAG® Respiratory Viral Panel fast</b>	Luminex Molecular Diagnostics, Toronto, Canada
<b>RespiFinder® SMART 22</b>	Pathofinder, Maastricht, Netherlands
<b>ResPlex II Panel v2.0</b>	Qiagen, Germany
<b>Magicplex™ RV Panel Real-time Test</b>	Seegene Inc., Seoul, Korea
<b>Anyplex II RV16</b>	Seegene, Seoul, Korea

par Altona Diagnostics. Celle-ci est basée sur la détection de régions *upE* et ORF1a précédemment décrites [53]. Pour la détection du MERS-CoV, les prélèvements respiratoires bas sont les prélèvements de choix car la réplication virale est localisée dans les voies respiratoires basses où la charge virale est de fait plus élevée [52,54]. Depuis le mois de décembre 2014, suite à la classification du MERS-CoV virus comme Micro-organisme et Toxine hautement pathogène (MOT), le diagnostic de l'infection à MERS-CoV et la prise en charge des cas possibles sont soumis à une réglementation sous la tutelle de l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM). L'ANSM a mis en place diverses autorisations permettant la détention, la cession, le transport, la mise en œuvre (extraction d'acide nucléique, production, culture, etc.), l'importation et l'exportation du MERS-CoV. Seuls les organismes détenteur de l'une ou plusieurs de ces autorisations sont habilités à réaliser le diagnostic de l'infection à MERS-CoV ou des activités de recherches sur cet agent pathogène. Il existe de plus une procédure de prise en charge des cas possibles dans tous les établissements de santé et les laboratoires d'analyses, décrivant le protocole de prise en charge conformément aux réglementations en vigueur. Cette procédure est régulièrement activée en octobre, au moment du Hadj en Arabie Saoudite, le pays dans lequel l'impact du MERS-CoV est le plus important [55].

Au cours de ces procédures, il est important de bénéficier de techniques de détection multiplexées pour permettre la réalisation d'un diagnostic différentiel.

## 7. Conclusion

Les coronavirus, comme les autres virus respiratoires, sont des agents pathogènes dont l'impact est à prendre en compte en santé publique. Leur surveillance est particulièrement nécessaire parmi les populations les plus susceptibles telles que les personnes âgées, les enfants et les personnes immunodéprimées car les conséquences d'une infection à HCoV y sont plus importantes, voire fatales. De plus, les coronavirus sont caractérisés par un potentiel évolutif élevé et par un risque d'émergence dans la population humaine à partir d'un réservoir qui n'est pas négligeable. Au moins deux des coronavirus «circulants», le HCoV-OC43 et le HCoV-NL63, semblent avoir une origine zoonotique [56,57]. C'est également le cas des SARS-CoV et MERS-CoV dont les émergences successives dans la population humaine à partir de réservoirs animaux au cours des 15 dernières années tendent à confirmer le risque permanent que représentent les *Coronavirinae* [58,59].

Liens d'intérêts: les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts avec le contenu de cet article.

## Références

- [1] Hamre D, Kindig DA, Mann J. Growth and Intracellular Development of a New Respiratory Virus. *J Virol* 1967;1:810-6.
- [2] McIntosh K, Dees JH, Becker WB, Kapikian AZ, Chanock RM. Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1967;57:933-40.
- [3] van der Hoek L, Pyrc K, Jebbink MF, Vermeulen-Oost W, Berkhout RJM, Wolthers KC, et al. Identification of a new human coronavirus. *Nat Med* 2004;10:368-73. doi:10.1038/nm1024.
- [4] Fouchier RAM, Hartwig NG, Bestebroer TM, Niemeyer B, Jong JC de, Simon JH, et al. A previously undescribed coronavirus associated with respiratory disease in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:6212-6. doi:10.1073/pnas.0400762101.
- [5] Woo PCY, Lau SKP, Chu C, Chan K, Tsoi H, Huang Y, et al. Characterization and Complete Genome Sequence of a Novel Coronavirus, Coronavirus HKU1, from Patients with Pneumonia. *J Virol* 2005;79:884-95. doi:10.1128/JVI.79.2.884-895.2005.
- [6] Peiris JSM, Guan Y, Yuen KY. Severe acute respiratory syndrome. *Nat Med* 2004;10:S88-97. doi:10.1038/nm1143.
- [7] Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus ADME, Fouchier RAM. Isolation of a Novel Coronavirus from a Man with Pneumonia in Saudi Arabia. *N Engl J Med* 2012;367:1814-20. doi:10.1056/NEJMoa1211721.
- [8] Woo PCY, Lau SKP, Lam CSF, Lau CCY, Tsang AKL, Lau JHN, et al. Discovery of Seven Novel Mammalian and Avian Coronaviruses in the Genus Deltacoronavirus Supports Bat Coronaviruses as the Gene Source of Alphacoronavirus and Betacoronavirus and Avian Coronaviruses as the Gene Source of Gammacoronavirus and Deltacoronavirus. *J Virol* 2012;86:3995-4008. doi:10.1128/JVI.06540-11.
- [9] Drosten C, Günther S, Preiser W, van der Werf S, Brodt H-R, Becker S, et al. Identification of a Novel Coronavirus in Patients with Severe Acute Respiratory Syndrome. *N Engl J Med* 2003;348:1967-76. doi:10.1056/NEJMoa030747.
- [10] Siddell S, Wege H, ter Meulen V. The structure and replication of coronaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 1982;99:131-63.
- [11] Siddell S, Wege H, ter Meulen V. The structure and replication of coronaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 1982;99:131-63.
- [12] Brierley I, Bourns ME, Binns MM, Bilimoria B, Blok VC, Brown TD, et al. An efficient ribosomal frame-shifting signal in the polymerase-encoding region of the coronavirus IBV. *EMBO J* 1987;6:3779-85.
- [13] Siddell S. The coronaviridae. Plenum press. 1995.
- [14] Walsh EE, Shin JH, Fausey AR. Clinical Impact of Human Coronaviruses 229E and OC43 Infection in Diverse Adult Populations. *J Infect Dis* 2013;208:1634-42. doi:10.1093/infdis/jit393.
- [15] Jean A, Quach C, Yung A, Semret M. Severity and Outcome Associated With Human Coronavirus OC43 Infections Among Children. *Pediatr Infect Dis J* 2013;32:325-9. doi:10.1097/INF.0b013e3182812787.
- [16] Gerna G, Percivalle E, Sarasini A, Campanini G, Piralla A, Rovida F, et al. Human respiratory coronavirus HKU1 versus other coronavirus infections in Italian hospitalised patients. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol* 2007;38:244-50. doi:10.1016/j.jcv.2006.12.008.
- [17] Ebihara T, Endo R, Ma X, Ishiguro N, Kikuta H. Detection of human coronavirus NL63 in young children with bronchiolitis. *J Med Virol* 2005;75:463-5. doi:10.1002/jmv.20289.
- [18] Woo PCY, Lau SKP, Tsoi H, Huang Y, Poon RWS, Chu C, et al. Clinical and Molecular Epidemiological Features of Coronavirus HKU1-Associated Community-Acquired Pneumonia. *J Infect Dis* 2005;192:1898-907. doi:10.1086/497151.
- [19] Cabeça TK, Granato C, Bellei N. Epidemiological and clinical features of human coronavirus infections among different subsets of patients. *Influenza Other Respir Viruses* 2013;7:1040-7. doi:10.1111/irv.12101.
- [20] Salmi A, Ziola B, Hovi T, Reunanen M. Antibodies to coronaviruses OC43 and 229E in multiple sclerosis patients. *Neurology* 1982;32:292-5.
- [21] Tanaka R, Iwasaki Y, Koprowski H. Intracisternal virus-like particles in brain of multiple sclerosis patient. *J Neurol Sci* 1976;28:121-6.
- [22] Zhong N, Zheng B, Li Y, Poon L, Xie Z, Chan K, et al. Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People's Republic of China, in February, 2003. *The Lancet* 2003;362:1353-8. doi:10.1016/S0140-6736(03)14630-2.
- [23] Leung WK, To K, Chan PKS, Chan HLY, Wu AKL, Lee N, et al. Enteric involvement of severe acute respiratory syndrome-associated corona-

- virus infection. *Gastroenterology* 2003;125:1011–7. doi:10.1016/j.gastro.2003.08.001.
- [24] Lee N, Hui D, Wu A, Chan P, Cameron P, Joynt GM, et al. A Major Outbreak of Severe Acute Respiratory Syndrome in Hong Kong. *N Engl J Med* 2003;348:1986–94. doi:10.1056/NEJMoa030685.
- [25] Gaunt ER, Hardie A, Claas ECJ, Simmonds P, Templeton KE. Epidemiology and Clinical Presentations of the Four Human Coronaviruses 229E, HKU1, NL63, and OC43 Detected over 3 Years Using a Novel Multiplex Real-Time PCR Method. *J Clin Microbiol* 2010;48:2940–7. doi:10.1128/JCM.00636-10.
- [26] Drosten C, Seilmaier M, Corman VM, Hartmann W, Scheible G, Sack S, et al. Clinical features and virological analysis of a case of Middle East respiratory syndrome coronavirus infection. *Lancet Infect Dis* 2013;13:745–51. doi:10.1016/S1473-3099(13)70154-3.
- [27] Guery B, Poissy J, el Mansouf L, Séjourné C, Ettahar N, Lemaire X, et al. Clinical features and viral diagnosis of two cases of infection with Middle East Respiratory Syndrome coronavirus: a report of nosocomial transmission. *The Lancet* 2013;381:2265–72. doi:10.1016/S0140-6736(13)60982-4.
- [28] Ng DL, Hosani FA, Keating MK, Gerber SI, Jones TL, Metcalfe MG, et al. Clinicopathologic, Immunohistochemical, and Ultrastructural Findings of a Fatal Case of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Infection in the United Arab Emirates, April 2014. *Am J Pathol* 2016;186:652–8. doi:10.1016/j.ajpath.2015.10.024.
- [29] Gaunt ER, Hardie A, Claas ECJ, Simmonds P, Templeton KE. Epidemiology and Clinical Presentations of the Four Human Coronaviruses 229E, HKU1, NL63, and OC43 Detected over 3 Years Using a Novel Multiplex Real-Time PCR Method. *J Clin Microbiol* 2010;48:2940–7. doi:10.1128/JCM.00636-10.
- [30] Dijkman R, Jebbink MF, Idrissi NBE, Pyrc K, Müller MA, Kuijpers TW, et al. Human Coronavirus NL63 and 229E Seroconversion in Children. *J Clin Microbiol* 2008;46:2368–73. doi:10.1128/JCM.00533-08.
- [31] Severance EG, Bossis I, Dickerson FB, Stallings CR, Origeni AE, Sullens A, et al. Development of a Nucleocapsid-Based Human Coronavirus Immunoassay and Estimates of Individuals Exposed to Coronavirus in a U.S. Metropolitan Population. *Clin Vaccine Immunol* 2008;15:1805–10. doi:10.1128/CVI.00124-08.
- [32] McKinney KR, Gong YY, Lewis TG. Environmental transmission of SARS at Amoy Gardens. *J Environ Health* 2006;68:26–30–52.
- [33] Bermingham A, Chand MA, Brown CS, Aarons E, Tong C, Langrish C, et al. Severe respiratory illness caused by a novel coronavirus, in a patient transferred to the United Kingdom from the Middle East, September 2012. *Euro Surveill* 2012;17.
- [34] Hijawi B, Abdallat M, Sayaydeh A, Alqasrawi S, Haddadin A, Jaarour N, et al. Novel coronavirus infections in Jordan, April 2012: epidemiological findings from a retrospective investigation. *East Mediterr Health J Rev Santé Méditerranée Orient Al-Majallah Al-Sihhiyah Li-Sharq Al-Mutawassit* 2013;19 Suppl 1:S12–18.
- [35] OMS | Coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient (MERS-CoV) – Arabie saoudite. WHO n.d. <http://www.who.int/csr/don/21-march-2016-mers-saudi-arabia/fr/> (accessed April 5, 2016).
- [36] Cowling B, Park M, Fang V, Wu P, Leung G, Wu J. Preliminary epidemiological assessment of MERS-CoV outbreak in South Korea, May to June 2015. *Eurosurveillance* 2015;20:21163. doi:10.2807/1560-7917.ES2015.20.25.21163.
- [37] Meyer B, Müller MA, Corman VM, Reusken CBEM, Ritz D, Godeke G-J, et al. Antibodies against MERS coronavirus in dromedary camels, United Arab Emirates, 2003 and 2013. *Emerg Infect Dis* 2014;20:552–9. doi:10.3201/eid2004.131746.
- [38] Perera RA, Wang P, Goma MR, El-Shesheny R, Kandeil A, Bagato O, et al. Seroepidemiology for MERS coronavirus using microneutralisation and pseudoparticle virus neutralisation assays reveal a high prevalence of antibody in dromedary camels in Egypt, June 2013. *Euro Surveill* 2013;18:20574.
- [39] Corman VM, Jores J, Meyer B, Younan M, Liljander A, Said MY, et al. Antibodies against MERS Coronavirus in Dromedary Camels, Kenya, 1992–2013. *Emerg Infect Dis* 2014;20. doi:10.3201/eid2008.140596.
- [40] Müller MA, Corman VM, Jores J, Meyer B, Younan M, Liljander A, et al. MERS Coronavirus Neutralizing Antibodies in Camels, Eastern Africa, 1983–1997. *Emerg Infect Dis* 2014;20. doi:10.3201/eid2012.141026.
- [41] Hiscox JA, Wurm T, Wilson L, Britton P, Cavanagh D, Brooks G. The Coronavirus Infectious Bronchitis Virus Nucleoprotein Localizes to the Nucleolus. *J Virol* 2001;75:506–12. doi:10.1128/JVI.75.1.506-512.2001.
- [42] Vijgen L, Keyaerts E, Moës E, Maes P, Duson G, Ranst MV. Development of One-Step, Real-Time, Quantitative Reverse Transcriptase PCR Assays for Absolute Quantitation of Human Coronaviruses OC43 and 229E. *J Clin Microbiol* 2005;43:5452–6. doi:10.1128/JCM.43.11.5452-5456.2005.
- [43] Vabret A, Mouthon F, Mourez T, Gouarin S, Petitjean J, Freymuth F. Direct diagnosis of human respiratory coronaviruses 229E and OC43 by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 2001;97:59–66. doi:10.1016/S0166-0934(01)00343-3.
- [44] Myint S, Johnston S, Sanderson G, Simpson H. Evaluation of nested polymerase chain methods for the detection of human coronaviruses 229E and OC43. *Mol Cell Probes* 1994;8:357–64. doi:10.1006/mcpr.1994.1052.
- [45] Sizon J, Arbour N, Talbot PJ. Comparison of immunofluorescence with monoclonal antibodies and RT-PCR for the detection of human coronaviruses 229E and OC43 in cell culture. *J Virol Methods* 1998;72:145–52. doi:10.1016/S0166-0934(98)00013-5.
- [46] Emery SL, Erdman DD, Bowen MD, Newton BR, Winchell JM, Meyer RF, et al. Real-Time Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction Assay for SARS-associated Coronavirus. *Emerg Infect Dis* 2004;10:311–6. doi:10.3201/eid1002.030759.
- [47] Poon LLM, Wong OK, Luk W, Yuen KY, Peiris JSM, Guan Y. Rapid Diagnosis of a Coronavirus Associated with Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS). *Clin Chem* 2003;49:953–5. doi:10.1373/49.6.953.
- [48] Peiris J, Chu C, Cheng V, Chan K, Hung I, Poon L, et al. Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia: a prospective study. *The Lancet* 2003;361:1767–72. doi:10.1016/S0140-6736(03)13412-5.
- [49] Chan KH, Poon LLM, Cheng VCC, Guan Y, Hung IFN, Kong J, et al. Detection of SARS Coronavirus in Patients with Suspected SARS. *Emerg Infect Dis* 2004;10:294–9. doi:10.3201/eid1002.030610.
- [50] Drosten C, Chiu L-L, Panning M, Leong HN, Preiser W, Tam JS, et al. Evaluation of Advanced Reverse Transcription-PCR Assays and an Alternative PCR Target Region for Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome-Associated Coronavirus. *J Clin Microbiol* 2004;42:2043–7. doi:10.1128/JCM.42.5.2043-2047.2004.
- [51] van Boheemen S, de Graaf M, Lauber C, Bestebroer TM, Raj VS, Zaki AM, et al. Genomic characterization of a newly discovered coronavirus associated with acute respiratory distress syndrome in humans. *mBio* 2012;3. doi:10.1128/mBio.00473-12.
- [52] Corman VM, Eckerle I, Bleicker T, Zaki A, Landt O, Eschbach-Bludau M, et al. Detection of a novel human coronavirus by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Middle East Respir Syndr Coronavirus MERS-CoV* 2013;12:30.
- [53] Corman VM, Ölschläger S, Wendtner C-M, Drexler JF, Hess M, Drosten C. Performance and clinical validation of the RealStar® MERS-CoV Kit for detection of Middle East respiratory syndrome coronavirus RNA. *J Clin Virol* 2014;60:168–71. doi:10.1016/j.jcv.2014.03.012.
- [54] Memish ZA, Assiri AM, Al-Tawfiq JA. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) viral shedding in the respiratory tract: an observational analysis with infection control implications. *Int J Infect Dis* 2014;29:307–8. doi:10.1016/j.ijid.2014.10.002.
- [55] Micro-organismes et toxines hautement pathogènes (MOT) - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé n.d. [http://ansm.sante.fr/Dossiers/Micro-organismes-et-toxines-hautement-pathogenes-MOT/Micro-organismes-et-toxines-hautement-pathogenes-MOT\(offset\)/0](http://ansm.sante.fr/Dossiers/Micro-organismes-et-toxines-hautement-pathogenes-MOT/Micro-organismes-et-toxines-hautement-pathogenes-MOT(offset)/0) (accessed June 14, 2016).
- [56] Huynh J, Li S, Yount B, Smith A, Sturges L, Olsen JC, et al. Evidence Supporting a Zoonotic Origin of Human Coronavirus Strain NL63. *J Virol* 2012;86:12816–25. doi:10.1128/JVI.00906-12.
- [57] Vijgen L, Keyaerts E, Lemey P, Maes P, Reeth KV, Nauwynck H, et al. Evolutionary History of the Closely Related Group 2 Coronaviruses: Porcine Hemagglutinating Encephalomyelitis Virus, Bovine Coronavirus, and Human Coronavirus OC43. *J Virol* 2006;80:7270–4. doi:10.1128/JVI.02675-05.
- [58] Wang M, Yan M, Xu H, Liang W, Kan B, Zheng B, et al. SARS-CoV Infection in a Restaurant from Palm Civet. *Emerg Infect Dis* 2005;11:1860–5. doi:10.3201/eid1112.041293.
- [59] Ferguson NM, Van Kerkhove MD. Identification of MERS-CoV in dromedary camels. *Lancet Infect Dis* 2014;14:93–4. doi:10.1016/S1473-3099(13)70691-1.