Évolution du SARS-CoV-2 : mise à jour septembre 2020

Hélène Banoun

▶ **To cite this version:**

Hélène Banoun. Évolution du SARS-CoV-2 : mise à jour septembre 2020. 2020. hal-02930784

HAL Id: hal-02930784
https://hal.science/hal-02930784

Preprint submitted on 4 Sep 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Public Domain

Évolution du SARS-CoV-2 : mise à jour septembre 2020

Hélène Banoun, septembre 2020

RÉSUMÉ

Dans un article datant de fin juin, j'essayais d'expliquer la perte de virulence apparente du SARS-CoV-2 par l'évolution du virus.

Je rapporte ici les nouvelles observations qui viennent confirmer l'atténuation actuelle de la virulence du SARS-CoV-2.

Je proposais que l'évolution du SARS-CoV-2 pouvait être mise en relation avec le système immunitaire de son hôte. Cette hypothèse était fondée sur l'étude comparée de l'immunité cellulaire chez les personnes malades sévères de la Covid et chez les pauci ou asypmtomatiques d'une part et d'autre part sur la mise en évidence d'une possible immunité croisée avec les HCoV (coronavirus de rhumes banals).

J'essaye ici de recenser les mutations apparues depuis le début de la pandémie : quel rôle pourraient-elles avoir joué dans l'évolution temporelle de la pandémie (que ces mutations puissent ou non être mises en rapport avec le système immunitaire de l'hôte).

Des mutations importantes du point de vue évolutif sont apparues dans les gènes codant des protéines qui interagissent avec le système immunitaire de l'hôte. Une des principales mutations (dans la polymérase virale) est logiquement associée à une plus grande fréquence de mutations dans tout le génome. Cette fréquence fluctue au fil du temps et montre un pic au moment où l'épidémie a été la plus active. Ces deux phénomènes liés pourraient donc en partie expliquer l'évolution vers un phénotype bénin du SARS-CoV-2.

Hélène Banoun, https://www.researchgate.net/profile/Helene_Banoun
PhD, Pharmacien biologiste
Ancien Chargé de Recherches INSERM
Ancien Interne des Hôpitaux de Paris

Déclin de l'épidémie

Il devient de plus en plus évident que le virus est devenu moins pathogène depuis le pic de l'épidémie, comme c'était le cas pour le le SARS-CoV-1 qui avait commencé sa course en novembre 2003 et pour lequel l'épidémie avait été déclarée terminée fin juin 2004 (avec quelques rares cas bénins retrouvés jusqu'en janvier 2004), Freymuth et al., 2009.

La comparaison des courbes de cas positifs retrouvés par PCR et les courbes d'hospitalisations et de décès dus à la Covid-19 aussi bien en France que dans les autres pays européens (courbes ci-dessous pour la France fournies par Santé Publique France, figures 1, 2 et 3) l'exprime clairement : malgré la remontée du pourcentage de cas positifs (et de leur nombre absolu), on n'observe pas de remontées des hospitalisations ni des décès.

De plus les laboratoires de biologie sont amenés à effectuer de plus en plus de cycles d'amplification pour trouver un signal positif en PCR : jusqu'à 50 cycles en août 2020, alors qu'au pic épidémique 10 à 15 cycles suffisaient (communication personnelle de biologistes hospitaliers français). Ce Ct ne détecte que des morceaux d'ARN viral non infectieux (au dessus de 35 cycles, les isolats sont incapables d'infecter des cellules en culture (Bullard et al ., 2020 ; IMEA, 2020 ; La Scola et al., 2020 ; Liu R. et al., 2020 ; Lu J. et al., 2020).

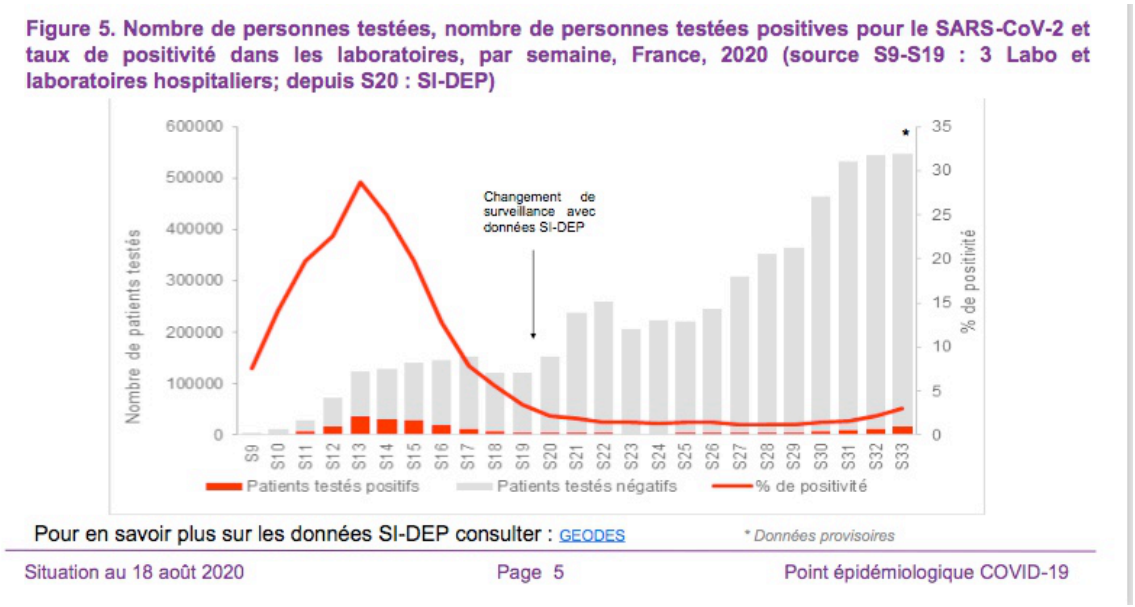

Figure 1 : Personnes testées et cas positifs en PCR (Santé Publique France, Point épidémiologique hebdomadaire du 27 août 2020)

Figure 19. Nombre journalier de cas de COVID-19 nouvellement hospitalisés et nombre d'établissements déclarant, depuis le 19 mars et depuis le 1er juin 2020, données au 18 août 2020, France (source : SI-VIC)

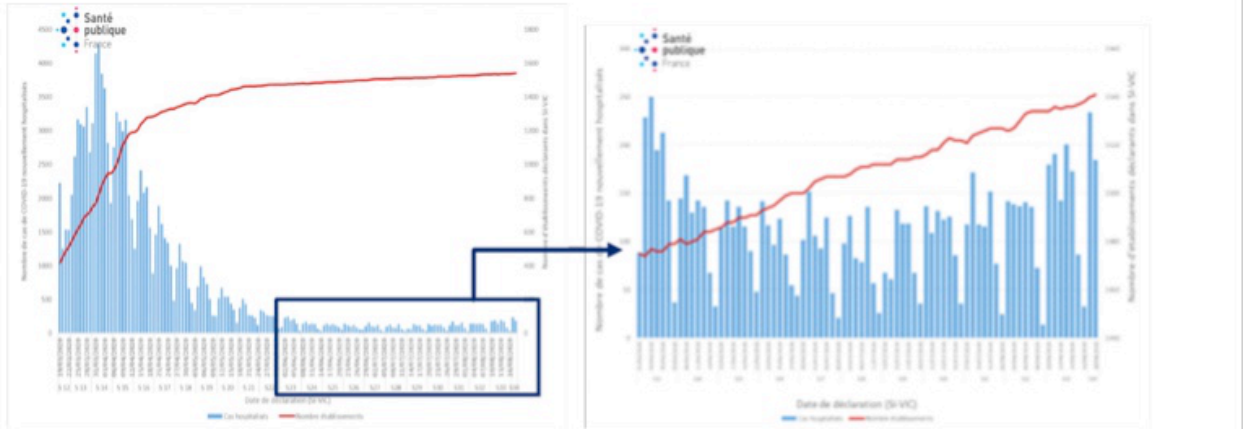

Figure 2 : Cas journaliers d'hospitalisations dues à la Covid, Point épidémiologique 27 août 2020

Figure 22. Nombre journalier de nouveaux décès survenus au cours d'une hospitalisation pour COVID-19, depuis le 19 mars et depuis le 1er juin 2020, France, données au 18 août 2020 (source : SI-VIC)

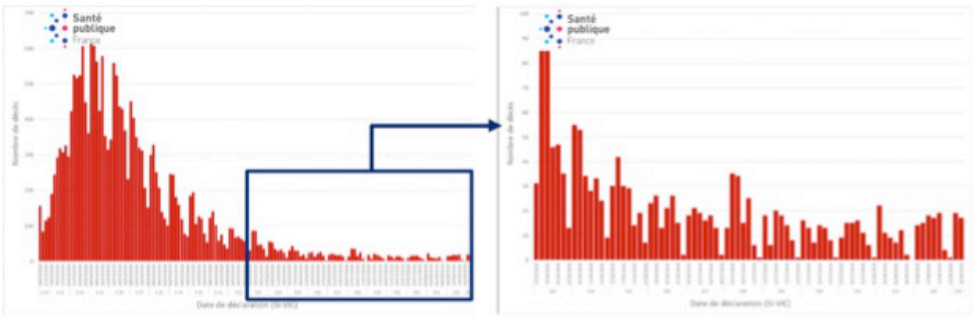

Figure 3 : Décès journaliers dus à la Covid, 27 août 2020

De nombreuses voix de médecins ayant soigné les Covid sont venues s'ajouter à celles citées fin juin pour réaffirmer que le virus semblait avoir beaucoup perdu de son pouvoir pathogène (Remuzzi G., 2020, Tarro G, 2020; Vernazza P., 2020, Lass Y., 2020, Freund Y., 2020, Parola B., 2020, Toussaint JF, 2020, De Benito L., 2020).

Comme proposé dans la conclusion de l'article précédent, les virologistes allemands Ulf Dittmer et Christian Drosten pensent que le SARS-CoV-2 pourrait se transformer en virus de rhume banal (Dittmer et Drosten, 2020).

IMMUNITÉ CROISÉE ENTRE SARS-CoV-2 ET HCoVs

Depuis la parution de mon article début juillet sur l'évolution du SARS-CoV-2 face au système immunitaire de son hôte (Banoun,2020), de nombreuses études ont été publiées concernant l'évolution du virus. J'essaye ici d'en faire une recension en abordant aussi l'évolution non guidée apparemment par le système immunitaire.

L'existence d'une immunité croisée entre rhumes banals et Covid-19 est maintenant établie (pour une revue voir Banoun, 2020-2). Cette immunité est dirigée logiquement contre des antigènes communs à tous les coronavirus et non contre les antigènes spécifiques du SARS-CoV-2. Ces antigènes communs sont retrouvés sur les protéines structurales N, M et Spike et aussi sur les protéines non structurales (dont les enzymes de réplication de l'ARN viral). Je n'ai pas assez insisté

précédemment sur les différences observées dans l'immunité cellulaire développée par les malades sévères de la Covid et celle opérant certainement par immunité croisée chez les personnes non exposées (et chez les asymptomatiques). Par exemple, Grifoni et al . trouvent des spécificités différentes entre exposés et non exposés pour les épitopes de réactivité du SARS2 : les non exposés ont préférentiellement (par rapport aux exposés) des réactivités envers les protéines d'ORF1 (open reading frame = zone du génome qui code pour de nombreuses protéines se chevauchant) alors que les exposés reconnaissent les protéines structurales ; Mateus et al., de la même équipe, confirment ces travaux : les épitopes de M (la protéine de membrane) ne sont pas reconnus par les non exposés, alors qu'ils le sont de façon robuste chez les cas de Covid (CD4+). Li et al ., en 2008, n'avait pas retrouvé non plus le même type de réponse cellulaire selon la gravité de la maladie (SARS).

Les protéines non structurales (NSP) sont très conservées parmi les coronavirus. Pour Le Bert et al.(Singapour), les individus exposés mais non infectés développeraient une immunité cellulaire envers les NSP (protéines non structurales intervenant dans la réplication de l'ARN viral), en particulier la NSP1 (codée par la région *Orf1*). En effet cette protéine est indispensable à la réplication du virus, elle est donc exprimée en premier. Par conséquent, les cellules T spécifiques de l'ORF1 pourraient hypothétiquement interrompre la production virale en lysant les cellules infectées par le SRAS-CoV-2 avant la formation de virions matures. La Nsp1 (codée par l'*Orf1*) intervient dans l'évasion au système immunitaire de l'hôte (elle bloque l'immunité innée et la synthèse des interférons), Thoms M. et al., 2020.

En revanche, chez les patients atteints de COVID-19 et de SRAS1, la protéine NP (de nucléocapside), qui est produite en abondance dans les cellules sécrétant des virions matures, devrait entraîner une stimulation préférentielle des cellules T spécifiques de la NP.

ÉVOLUTION DU VIRUS

Comme discuté il y a deux mois, il semble que l'émergence du virus date de la fin de l'été 2019 en Chine et que celui-ci ait pénétré dès octobre 2019 (ou plus tôt?) en Occident. Des syndromes évoquant la Covid seraient apparus en Chine dès l'été 2019 et en Europe dès l'automne 2019. Ceci est à nouveau suggéré par Li Y. et al., 2020, qui se fondent sur l'analyse des mutations ; ils affirment en outre que l'évolution du virus peut rendre compte de l'évolution dans la transmissibilité et l'effet pathogène et que les virus des différents pays sont en constante mutation. Comme déjà noté, Van Dorf et al. indiquent que la maladie s'est répandue dans le monde entier probablement dès le début de la pandémie (Van Dorf et al., 2020). Chaw et al., 2020, pensent également que le SARS-CoV-2 a circulé de façon cryptique bien avant la flambée épidémique de fin 2019 en Chine, Gambaro F et al. disent la même chose pour la France. Nous avons vu que les Jeux Militaires de Wuhan en octobre 2019 (Gouv.fr) ont pu favoriser la diffusion mondiale du virus de même que les Jeux Olympiques de la Jeunesse de Lausanne en janvier 2020. Des médecins ont repéré à l'automne 2019 des pneumonies atypiques qui pourraient évoquer des Covid précoces (Dr Michel Schmitt, Colmar par exemple, Schmitt M., 2020).

Une hypothèse sur l'origine du SARS-CoV-2 propose qu'il dérive d'un virus apparu dans une mine en Chine en 2012, recueilli en laboratoire et qui pourrait s'en être échappé lors de manipulations en 2018 ou 2019 (Latham and Wilson, 2020). Cette hypothèse pourrait rendre compte de cette circulation du virus avant toute détection d'épidémie, pendant cette période précoce le virus aurait pu subir des mutations non détectées.

Pourquoi le pic visible s'est-il étalé seulement de décembre à février en Chine et de début mars à fin avril en France? Par exemple, l'IHU de Marseille qui a commencé à tester en masse fin janvier n'a observé les premiers cas positifs que fin février 2020 (IHU, 2020). Les mesures sanitaires de confinement prises bien après ces dates ne peuvent donc expliquer l'évolution de la pandémie (fin janvier en Chine et mi-mars en Europe) ; l'épidémie a commencé fin février en

France, le pic a été atteint fin mars et son déclin date de fin avril. On manquerait donc d'archives de la période précoce de la pandémie et les mutations apparues pendant cette période sont passées inaperçues. De plus, seules quelques dizaines de milliers de séquences ont été analysées sur les 25 millions de cas supposés de Covid-19. Sur les presque 100 000 séquences publiées (Gisaid) une minorité a été analysée du point de vue de leur signification biologique et évolutive. Ces séquences analysées ont été collectées en majorité pendant le pic épidémique (entre décembre 2019 et mars 2020) . Il faudra donc suivre dans les mois qui viennent les publications sur les séquences isolées en phase tardive et plus particulièrement à la fin de l'été où on note une augmentation des « cas positifs » par PCR : pourra-t-on extraire quelques séquences de ces patients asymptomatiques avec des PCR positives au dessus de 35 cycles ? Pourra-t-on y caractériser des mutations spécifiques de cette phase bénigne ?

Les mutations sont étudiées sur les séquence extraites des malades sévères à l'hôpital dans leur immense majorité (Gambaro F et al., 2020), d'ailleurs en ce moment, où ces malades deviennent rares, presque plus de séquences ne sont analysées (Covid-19 Galaxy Project : la courbe en fonction du temps montre que le nombre des séquences étudiées d'un point de vue évolutionniste diminue rapidement après le pic épidémique). Une publication chinoise montre que chez les personnes jeunes testées à nouveau positives après avoir été guéries, il a été impossible d'extraire une séquence complète de virus ou d'infecter des cellules en culture. Ceci suggère que l'ARN retrouvé par PCR est fortement dégradé, ces personnes avaient des symptômes modérés lorsqu'elles ont été re-testées positives. L'épidémie de cas positifs en cette fin d'été pourrait donc être due à la présence chez des jeunes d'ARN dégradé toujours présent après une infection ancienne (Lu J. et al., 2020). Ces formes atténuées du virus n'ont pas été séquencées car non isolées, ceci peut expliquer qu'on passe à côté de la caractérisation des mutations responsables de l'atténuation.

Quelles sont les principales mutations retrouvées sur le SARS-CoV-2 par rapport à la première séquence chinoise publiée datant de décembre 2019 ? Les séquences du virus établies par les laboratoires de recherche du monde entier sont déposées dans la base de données GISAID du John Hopkins Institut et sont en accès libre pour les chercheurs. Fin août 2020, plus de 92 000 séquences ont été déposées, toutes ne sont pas exploitables car soit non complètes soit incohérentes:il semblent que 25 à 30 000 séquences soient exploitables.

Délétions

En avril 2020 , une équipe en Arizona (Holland et al., mai 2020) a retrouvé une délétion dans la région *Orf7* par rapport aux séquences décryptées au début de l'épidémie à Wuhan. Cette délétion a été retrouvée à partir d'un pool de séquences prélevées en phase tardive en Arizona. Elle concerne 81 nucléotides et 27 aminés correspondants dans une région qui pourrait être importante pour l'adaptation du virus à l'homme (car proche de la région *Orf8* repérée en 2003 pour le SARS-CoV-1, équipe de Drosten, Muth D et al., 2018)

À nouveau en avril 2020, une équipe de Singapour a retrouvé en phase tardive de l'épidémie une délétion de 382 nucléotides dans la région *Orf8* (cette délétion a été retrouvée fin février 2020 à Singapour ce qui correspond à la phase tardive pour l'Asie) (Young BE et al., 2020). Les auteurs suggèrent également que la délétion majeure révélée dans cette étude pourrait conduire à un phénotype atténué du SRAS-CoV-2. Cette mutation a ensuite disparu après mars 2020. Les patients hospitalisés porteurs de cette mutation ont eu des Covid moins sévères que les autres ne la portant pas. Le relargage de cytokines était moins important chez eux. La région *Orf8* interviendrait dans l'évasion immunitaire en régulant à la baisse les molécules du CMH-I.

Les patients porteurs de cette délétion dans le virus ont des réponses cellulaires T meilleures et une production plus importante d'interféron gamma. Les protéines produites par *Orf8* sont très fortement

immunogènes et induisent la synthèse précoce d'anticorps pendant la maladie. L'absence de ces protéines chez les patients porteurs de la mutation pourrait expliquer la moindre réaction inflammatoire.

Il n'est pas apparu clairement si ce variant modifie ou non la capacité de réplication du virus. Cette délétion n'est pas reliée au clade contenant la mutation D614G de la protéine spike de surface, qui pourrait être responsable d'une plus grande transmissibilité.

Ce type de mutation délétère pour le virus pourrait être dû à un effet de bottleneck (goulet d'étranglement) comme le suggèrent Wang D. et al. La comparaison de 66 variants intra-hôte identifiés a montré une faible distance génétique virale entre les patients d'un même foyer et un goulot d'étranglement étroit de la transmission. Malgré la coexistence de virus génétiquement distincts au sein d'un même hôte, la plupart des variantes mineures intra-hôte n'étaient pas partagées entre les paires de transmission, ce qui suggère un rôle dominant de la dynamique stochastique dans les évolutions à la fois inter-hôte et intra-hôte. (Wang D., 2020). Mais cette délétion pourrait aussi avoir été sélectionnée par la pression du système immunitaire de l'hôte comme proposé plus haut (Muth D. et al. avaient déjà proposé cela pour une délétion dans l'*Orf8* trouvée sur une souche de SARS-CoV-1 (Muth D. et al., 2018).

Mutations observées

La mutation D614G sur la Spike protéine

Cette mutation a été largement relayée par la presse grand public, elle aboutit au remplacement d'une asparagine par une glycine sur la partie C-terminale de la protéine spike de surface (par mutation au niveau du nucléotide 23403).
Il n'est pas certain que cette mutation augmente l'infectivité mais il est maintenant montré qu'elle n'augmente pas la sévérité de la maladie. (Grubaugh et al., 2020 ; Volz et al., 2020 ; Korber et al., 2020). Il est important de noter que cette mutation n'apparaît jamais seule mais que D614G fait partie d'un haplotype de 4 mutations (y compris celles qui altèrent la NSP12, la 5' UTR, et silencieusement la NSP3), qui constituent le clade G originaire de Chine et établi en Europe (Tomaszewski et al., 2020)

Classement des mutations par leur intérêt évolutif

Covid Galaxy Project étudie les mutations en fonction de leur intérêt évolutif : les mutations RdRp 323 (RdRp = polymérase ARN dépendante du virus) et Q57h sur *Orf3a* sont les 2 mutations ayant le plus d'intérêt du point de vue de la sélection naturelle positive c'est à dire favorable au virus selon cette étude (la D614G de la spike protéine n'est pas cité dans les premières) viennent ensuite les mutations suivantes : *Orf 8/84* site 28143-28145 substitution L vers S (L84S, S vers L aux USA ; L vers S avec réversion vers L en Chine ; L en Europe sauf Espagne S vers L). Cette mutation L84S est citée dans Eskier et al. (aout20) comme étant la 3ème mutation non synonyme la plus fréquente après la D614G et la RdRp 323.
Wu et al. 2020, montrent que quatre types de mutations pouvaient provoquer des changements spectaculaires dans les structures protéiques à savoir Q57H et G251V dans les cadres de lecture ouverts (*ORF3a*), S194L et R203K/G204R dans la nucléocapside (N). En outre, ces mutations étaient largement répandues dans le monde entier, et leur fréquence fluctuait au fil du temps.

Les délétions ne sont pas examinées d'un point de vue évolutif par Covid-Galaxy.

Parmi les responsables de Covid-Galaxy, Jaroszewski et al., 2020 ont publié sur les contraintes évolutives.

Un excès de mutations dans les protéines Nsp1, Nsp2 (de fonctions inconnues), dans les *Orf3a, Orf8b, Orf14* (impliquées dans interactions virus-hôte) a été retrouvé par rapport aux autres sites. La spike, la protéine M de membrane et RdRp (Nsp12) montrent un taux inférieur de mutations faux-sens par rapport aux autres : ceci serait dû à l'effet de sélection purificatrice de part

l'importance de la RdRp pour la biologie du SARS-CoV-2.
Selon une communication personnelle de l'auteur senior de cette publication : « Dans l'ensemble, tout cela s'inscrit dans le tableau de l'évolution virale façonnée par la dérive génomique et la sélection négative, plutôt que par l'adaptation et la sélection positive. Certains sites individuels semblent faire l'objet d'une sélection positive, mais les arguments en ce sens sont plutôt douteux - la collection de génomes dont nous disposons n'est pas systématique et non représentative et ces résultats apparaissent et disparaissent si nous modifions nos critères de sélection. Il se peut qu'il y ait une sélection positive et une adaptation en cours, mais nous ne le voyons pas encore, du moins pas de façon certaine. »

Mutations en rapport avec le système immunitaire de l' hôte

L'étude de l'évolution de la séquence du SARS-CoV en 2003-2004 avait déjà suggéré que des mutations apparues au cours de l'épidémie pouvaient expliquer son histoire (Drösten, 2018), une délétion était apparue dans la région *Orf8* provoquant une réplication moins active et une atténuation de la virulence. Pour Hartenian et al., les mutations dans les régions *Orf3a* et *Orf8* de SARS-CoV-1 pourraient jouer un rôle vis à vis de la réponse immunitaire (*Orf8*) et plus précisément inflammatoire (interaction avec l'inflammasome pour *Orf3a*)

La protéine Nsp1 permet l'évasion immunitaire du virus (Thoms), une mutation dans cet endroit peut rendre le virus vulnérable à la clairance immunitaire. La Nsp1 joue un rôle dans l'inhibition de l'expression de l'ARN de l'hôte (Schmidtke P, 2020). Jazroszewski et al. montrent un excès de mutations dans la protéine NSP1. Wen F et al., 2020, trouvent un excès de mutations sur la séquence (entre autres) codant pour NSP1. Nous avons vu que les individus exposés et non exposés ont une réaction cellulaire T différente par rapport à la protéine NSP1 (Le Bert).

La NSP3 pourrait être impliquée dans l'inflammation avec relargage de cytokines observée dans les Covid graves ; cette protéine interagirait avec l'inflammasome (complexe protéique impliqués dans l'inflammation et l'immunité innée) et en particulier grâce à sa partie hypervariable (sujette aux mutations). L'expression de la protéine Nsp3 dans les macrophages activés par l'IFN favoriserait indirectement une expression prolongée pro-inflammatoire des gènes stimulés par l'interféron. Cela participerait à la tempête de cytokines caractéristique des cas graves de COVID-19. (Claverie JM, 2020). Tomaszewski et al., trouvent une mutation significative dans la Nsp3, toujours associée aux mutations principales (retrouvées toujours ensemble), la D614G de la spike et la RdRp323 (Eskier et al., juillet 2020).

Guan et al ., montrent que les mutations dans les régions en interaction avec le système immunitaire de l' hôte (facilitant l'évasion du virus) sont observées avec une fréquence moindre que celle attendue ; mais cette étude s'arrête en mars 2020, il n'est pas étudié ce qui se passe après, lorsque l'épidémie commence à décliner.

La mutation 25563G>T-(Q57H) se trouve sur la partie *Orf3a* (Wang R et al., 28 juillet 2020) . Elle a été trouvée pour la première fois à Singapour le 16 février 2020. Wu et al. 2020, montrent que quatre types de mutations pouvaient provoquer des changements spectaculaires dans les structures protéiques à savoir Q57H et G251V dans les cadres de lecture ouverts (*Orf3a*), S194L et R203K/G204R dans la nucléocapside (N). En outre, ces mutations étaient largement répandues dans le monde entier, et leur fréquence fluctuait au fil du temps. D'après Tomaszewski, la mutation Q57H a une forte signification évolutive.

Les protéines ORF3a participent à l'apoptose et activent l'inflammasome du récepteur de signalisation immunitaire inné NLRP3. Les mécanismes proposés sont la redistribution des ions et la perturbation lysosomale, qui provoquent l'inflammation des tissus pendant une maladie respiratoire et la production de cytokines inflammatoires. Les modifications de la stabilité du pliage négatif entraînées par la mutation Q57H révèlent que la protéine codée par l'*Orf3a* devient instable suite à la mutation Q57H, ce qui peut nuire à la fonction de l'ORF3a dans l'apoptose et augmenter la

charge virale dans la cellule hôte. L'évolution temporelle de cette mutation qui n'a jamais été majoritaire ne peut à elle seule expliquer le moindre pouvoir inflammatoire du virus en été 2020. Cependant Issa E et al., 2020 montrent que cette mutation Q57H est souvent associée à d'autres mutations sur le même domaine *Orf3a* : il faudrait étudier l'évolution temporelle de toutes ces mutations pour conclure.

Selon Chaw et al .; 2020, la mutation L84S apparue très tôt en Chine dans *Orf8* pourrait être le signe d'un avantage sélectif car sa fréquence a augmenté rapidement en quelques jours. Les mutations dans l'*Orf8* lors du SARS1 étaient aussi impliquées dans l'adaptation à l'hôte. Il en est de même pour l'*Orf3* qui est requis pour une réplication et une virulence optimale : il est confirmé ici que la mutation G215V dans l'*Orf3a* a accru rapidement sa fréquence en Chine. Comme déjà vu, l'ORF3 intervient dans les interactions avec l'inflammasome (un complexe protéique impliqué dans l'inflammation).

Wang R et al. (Wang R et al., 20 aout 2020) montrent par l'étude des mutations C>T dans le génome viral que celles-ci sont imposées par la réponse immunitaire de l'hôte : les génomes des virus évoluent grâce à l'édition des gènes imposée par la réponse immunitaire innée de l'hôte (C>T), et aux mutations réversibles défectueuses installées par le mécanisme de protection du virus, T>C. Ce ratio C>T augmente avec l'âge (les personnes âgées sont plus touchées) et peut également expliquer les différences d'atteinte des populations (Africains et Océaniens sont moins touchés par cette mutation et l'épidémie dans leur zone géographique a été moins sévère qu'ailleurs). Ceci nous amène au prochain paragraphe qui concerne l'évolution spatiotemporelle des mutations.

Evolution temporelle des mutations corrélée à l'évolution de l'épidémie, différences géographiques

Différentes équipes ont analysé les mutations dans les séquences déposées dans la base de données GISAID selon leurs différences spatiotemporelles et retrouvent les mêmes données. Selon Wang R et al. (Wang Rui ; et al., 2020 28 juillet), les 8 principales mutations peuvent être regroupées en deux groupes essentiellement déconnectés.
Le premier groupe comprend 5 mutations 1059C>T-(T85I), 14408C>T-(P323L), 23403A>G-(D614G), 25563G>T-(Q57H), et 27964C>T-(S24L) qui sont fortement corrélées, bien qu'ayant une large gamme de fréquences.
Les trois autres mutations, 17747C>T-(P504L), 17858A>G-(Y541C) – codant pour la Nsp13- , et 28144T>C-(L84S) dans *Orf8*, se produisent pour la plupart ensemble et ont un nombre similaire de fréquences.

Les mutations 14408C>T-(P323L) -dans la RdRp- et 23403A>G-(D614G) -dans la protéine spike- apparaissent simultanément et ont donc une trajectoire identique des mutations apparues presque exclusivement aux USA pourraient expliquer l'épidémiologie spécifique de ce pays : ce sont des mutations à haute fréquence sur la Nsp13 (hélicase qui participe au complexe protéique de réplication virale) et dans les protéines codées par *Orf8*. Elles pourraient avoir déstabilisé ces protéines. Trois mutations simultanées ont tendance à s'estomper, tandis que les cinq autres mutations simultanées peuvent renforcer la capacité d'infection du SARS-CoV-2. Certaines de ces mutations n'apparaissent jamais avec la D614G dans plus d'un millier de variantes, ce qui fournit une preuve secondaire que ces deux mutations peuvent inhiber la contagiosité du virus. Les résultats révèlent que globalement, la fréquence des mutations renforçant l'infectivité sur la protéine S est plus élevée que celle des mutations affaiblissant l'infectivité, ce qui explique la rapidité de la transmission de personne à personne aux États-Unis.

L'existence de deux mutations à haute fréquence sur la NSP13 est très inhabituelle, plus de 87% d'entre elles ont été détectées aux États-Unis. Début mars, le ratio des deux mutations commence à diminuer et approche de zéro après le 19 mai 2020, ce qui suggère que les mutations 17858A>G-(Y541C) et 17747C>T-(P504L) pourraient entraver la transmission du SARS-CoV-2, les mutations Y541C et P504L empêchent le SARS-CoV-2 d'interagir efficacement avec les

molécules de signalisation de l'interféron de l'hôte et empêchent la NSP13 de participer efficacement au processus de réplication/transcription.

De même, Banerjee et al., 2020 et Pachetti M. et al., 2020 retrouvent quasiment les mêmes variations spatiotemporelles ainsi que Zhao et al., 2020 pour qui, l'analyse temporelle et spatiale de ces mutations potentiellement adaptatives a révélé que l'incidence de certains de ces sites diminuait après avoir atteint un pic (souvent local). Ceci pourrait indiquer un signal potentiel de sélection positive dans les gènes codant pour l'ORF1ab et les protéines de structure. Les mutations dans NSP6, NSP13, ORF3a et ORF8 présentent des pics de haute fréquence au début de l'épidémie et seulement dans certaines régions, mais ont ensuite connu une forte baisse et sont maintenant peu abondantes (c'est le cas de la Nsp13 (Y541C) et de la Orf8 (L84S) aux USA, de Nsp6 (L37F) en Asie et de l'Orf3a (G251V) en Europe ; voir sur la figure 4)
En revanche, la fréquence des mutations dans Nsp2, Nsp12, ORF3a 57, N et S a augmenté depuis leur introduction dans le génome viral. Elles sont présentes en grande abondance dans la seconde moitié du mois de mars, soit au niveau mondial (S -D614G, Nsp12-RdRp323, >68%), soit dans certains continents (N en Europe et en Asie, ~25%, Nsp2 et ORF3a en Amérique du Nord, >60%).

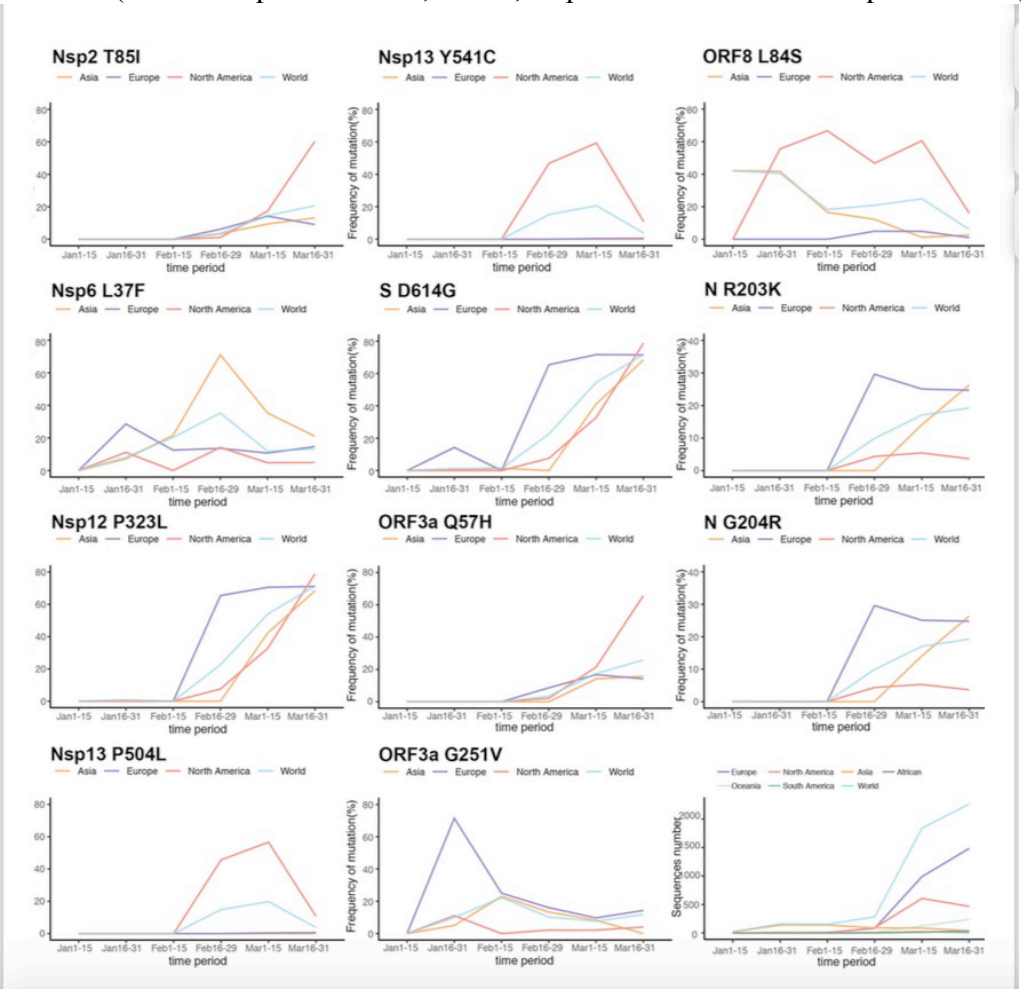

Figure 4 extraite de Zhao et al ;, 2020 : évolution spatiotemporelle des principales mutations

Le rôle prépondérant des mutations dans la polymérase du virus (l'enzyme virale qui permet la réplication de son matériel génomique)

Ces travaux de Wang R., Zhao et Pachetti sont confirmés et approfondis par ceux d'une équipe turque (Eskier D; et al., 2020-1-2-3). Cette équipe retrouve les mêmes mutations principales que les autres équipes : la principale mutation non synonyme est la mutation 23403A>G responsable de la substitution D614G dans la protéine spike, suivie par la mutation 14408C>T dans

la région *Nsp12* du gène *Orf1ab*, entraînant la substitution P323L dans la protéine RdRp, et la mutation 28144C>T, responsable de la substitution L84S dans la protéine ORF8.

Trois mutations ont co-évolué et sont toujours observées en même temps : contrairement à l'Europe, l'Amérique du Nord et du Sud, où la RdRp-323 est devenu la forme dominante avec ses co-mutations (D614G de la spike et 3037C>T : F106F une mutation synonyme dans la Nsp3, nous avons vu que la Nsp3 interagirait avec l'inflammasome), la RdRp323 et ses co-mutations sont restés la forme mineure en Asie, ceci pouvant expliquer les différences épidémiologiques entre ces continents.

Pour déterminer comment les mutations de la RdRp affectent le taux de mutation du génome du SARS-CoV-2, les auteurs ont examiné les relations des mutations RdRp avec celles que l'on trouve dans les protéines M (membrane) ou E (enveloppe) (ci-après dénommées MoE), en termes de temps et de lieu. Leurs résultats suggèrent que les génomes du SARS-CoV-2 avec la mutation RdRp 323 sont 1,5 fois plus susceptibles d'avoir des MoE.

Les mutations de la RdRp contribuent donc de manière significative à l'évolution du génome du SARS-CoV-2. Une RdRp mutante plus sujette à l'erreur devrait augmenter la diversité génétique virale et permettre au virus de se propager sous différentes pressions sélectives, telles que la propagation à différentes populations. Comme une moindre fidélité est également associée à une vitesse plus élevée, de telles mutations pourraient donner des concentrations plus élevées de virus dans les cellules hôtes.

La mutation RdRp323 pourrait donc coopérer avec les deux autres mutations. Par ailleurs, un taux de mutation altéré pourrait être un sous-produit et les mutations RdRp pourraient agir en accélérant ou en ralentissant le processus de réplication, ce qui affecterait à son tour la charge virale et la virulence. (Eskier et al. , juillet 2020, 2020-3)

Ensuite en août 2020 (Eskier, 2020-2) cette équipe suggère que les mutations de la NSP14, une protéine exonucléase à correction d'erreurs (Ferron F et al., 2018), sont les plus fortement associées à une charge de mutation accrue dans les deux régions sans pression sélective et dans tout le génome. Ils proposent la NSP14 comme cible de recherche prioritaire pour comprendre le taux de variance génomique dans les isolats de SARS-CoV-2, et les mutations *Nsp14* comme prédictrices potentielles de souches à forte mutabilité.

Enfin à nouveau en août (Eskier, 2020-1), cette équipe montre une relation entre les densités de mutation du SARS-CoV-2 et la dynamique de la transmission virale au niveau des populations humaines. Alors que les densités moyennes de mutation ont augmenté régulièrement au fil du temps pendant la période de propagation rapide de la COVID-19 aux USA et Royaume Uni, cette tendance s'est terminée vers le jour 100 (2 avril 2020), lorsque le nombre de nouveaux cas quotidiens a commencé à atteindre un plateau. Le jour 1 correspond au jour où la première séquence du virus a été isolée.

Il semble toutefois que toutes les souches de SARS-CoV-2 ne soient pas affectées de la même manière par les facteurs épidémiologiques (c'est-à-dire les contre-mesures qui ont conduit à une réduction du nombre quotidien de nouveaux cas au Royaume-Uni et aux États-Unis, les facteurs d'hôte, les traitements, etc) en termes de densité de mutations.

La souche du SARS-CoV-2 avec les deux mutations RdRp323 et S-D614G, qui est devenue dominante en Europe et aux États-Unis en premier lieu, a différé et a continué à accumuler des mutations synonymes et non synonymes après le 100e jour, en particulier dans les gènes *S* et *Orf1a*. Les auteurs notent également que la densité de mutations des génomes des souches mutantes a commencé à montrer des signes de déclin après le jour 130 (2 mai 2020), bien qu'aucun changement évident dans les données épidémiologiques ne soit observé autour de cette date.

Hypothèses explicatives

L'évolution des virus émergents résulte de pressions sélectives (adaptation au système immunitaire de l'hôte par exemple) mais la plupart des mutations sont sélectivement neutres ou

légèrement délétères (Frost SDW et al., 2018). L'évolution peut découler également de goulets d'étranglement qui peuvent réduire considérablement la variation génétique : le passage d'un petit nombre de virions peut provoquer une infection (Wang D., 2020), c'est l'effet fondateur dû aux petites populations.

Brewer WH et al., 2011, ont proposé que l'accumulation de mutations est un facteur majeur dans l'atténuation naturelle des souches pathogènes de virus à ARN, et que cela peut contribuer à la disparition des anciennes souches pathogènes et à la cessation naturelle des pandémies.
Des travaux expérimentaux sont venus confirmer cette hypothèse : pour Carter et Sanford, 2012, bien qu'il y ait eu de nombreuses adaptations au sein du génome H1N1 (variant du virus de la grippe), la plupart des changements génétiques semblent être non adaptatifs, et une grande partie de ces changements semblent être dégénératifs. Les auteurs suggèrent que le H1N1 a subi une atténuation génétique naturelle, et qu'une atténuation significative pourrait même se produire au cours d'une seule pandémie.
Ce processus peut jouer un rôle dans l'arrêt naturel de la pandémie et a apparemment contribué à la baisse exponentielle des taux de mortalité au fil du temps, comme on l'a vu pour toutes les principales souches de grippe humaine.

L'hypothèse du cliquet de Muller pourrait expliquer ce phénomène (Banerjee et al., 2020). Elle aboutirait au déclin de l'épidémie, le virus disparaissant. La mutation D614G de la spike est toujours associée à la mutation P323L de la RdRp, cette dernière est associée à l'évolution du virus : elle est associée à une densité plus forte de mutations dans tout le génome et corrélée à la courbe épidémique

En général, les mutations génétiques qui offrent des avantages adaptatifs sont fixées dans la population par sélection naturelle, tandis que les mutations délétères sont éliminées de la population. Cependant, un taux de mutation accéléré exerce une pression mutationnelle énorme, et la sélection naturelle est incapable d'éliminer ces mutations délétères, retenant les variantes nouvellement formées au sein de la population et conduisant ainsi à leur fixation. Ce mécanisme évolutif irrécupérable est appelé le "cliquet de Muller" par les biologistes évolutionnistes. Lorsque de plus en plus de mutations délétères s'accumulent et deviennent permanentes dans la population, il en résulte un "effondrement mutationnel" ou la perte définitive de la population. La phylodynamique du SRAS-CoV- 2 en Inde indien indique-t-elle une action naissante du cliquet de Muller où les mutations autrement délétères ont tendance à se fixer dans la population car la sélection naturelle reste incapable de les purger en raison de pressions mutationnelles excessives ?

J'ajouterai que par définition les malades sévères luttent inefficacement contre le virus par contre les personnes exposées mais non malades ont détruit la plus grande quantité de virus infectant et ont pu sélectionner les formes moins virulentes (se répliquant moins efficacement) non atteintes par les défenses immunitaires. En effet, les phénomènes immunopathologiques semblent responsables de la gravité de la maladie (pour le SARS1 :Cameron, 2007 et pour le SARS-2 Vabret, 2020, King, 2020. Grifoni et al., 2020. ; pour une synthèse Banoun, 2020-2). Les virions qui stimulent moins ces phénomènes, en interagissant moins avec les cellules immunitaires, seraient sélectionnés et le virus évoluerait vers un phénotype bénin.

Selon Pachetti, en Europe, les mutations sur la RdRp semblent se situer sur des zones codant pour des protéines de régulation de la RdRp et sur des protéines capables de réparer les erreurs de copie. Donc pour des raisons inconnues, en Europe, le virus aurait eu plus tendance qu'ailleurs à muter sur les zones de régulation de la RdRp : ceci aurait pu affecter la virulence dans un sens ou dans l'autre.
Ici les séquences ont été recueillies certainement sur des malades sévères puisque la collecte a eu lieu de décembre à mars 2020, donc on peut supposer que la RdRp était plus efficace. On peut supposer aussi que chez les asymptomatiques (qui ont représenté la majorité des personnes

infectées), les mutations sur la RdRp allaient plutôt vers moins de virulence et se sont alors répandues facilement en étant sélectionnées car le virus muté stimulait moins le système immunitaire des infectés.

Les travaux de l'équipe turque (Eskier et al.) tendraient à montrer que les mutations favorisant le virus (mutation rendant la RdRp plus efficace, plus rapide) peuvent aussi le défavoriser : la RdRp fait plus d'erreurs lorsqu'elle est plus rapide. Si ces mutations sont associées à des mutations sur la Nsp14 qui répare ces erreurs, il peut s'accumuler des mutations dans les protéines structurales qui pourraient expliquer aussi le déclin de l'épidémie. Ces travaux ont également montré que la souche porteuse des deux mutations RdRp323 et S-D614G, qui est devenue dominante en Europe et aux États-Unis en premier lieu, a différé et a continué à accumuler des mutations synonymes et non synonymes après le 100e jour, en particulier dans les gènes S et Orf1a. Eskier et al. notent aussi que « la densité de mutations des génomes des souches mutantes a commencé à montrer des signes de déclin après le jour 130 (2 mai 2020), bien qu'aucun changement évident dans les données épidémiologiques ne soit observé autour de cette date. » On peut s'étonner de cette affirmation puisque l'épidémie semblerait s'être considérablement amoindrie fin mai (comme vu plus haut le pouvoir pathogène du virus semble s'être amoindri).

« Les pressions de sélection qui réduisent la charge virale favorisent les mutants les plus lents. Inversement, l'absence de pression de sélection, qui permet les charges virales élevées, favorise les mutants les plus rapides. Il faut ajouter que les populations virales sont toujours des mélanges de virus pas nécessairement homogènes, dont les proportions dépendent de l'environnement du virus : force de l'immunité et facilité de contagion. Exemple : quand l'immunité de la population augmente et que les barrières de transmission sont en place, les virus doivent survivre "sur place" (chez la même personne) et cela impose que le virus se cache et ralentisse. Les mutations de "ralentissement" sont favorisées » (Sonigo P. , 2020-2)

Chez les malades sévères de la Covid, qui n'ont donc pas réussi à combattre efficacement le virus au début de l'infection, les virus très agressifs ne sont pas contre sélectionnés et sont excrétés et transmis. C'est sur ces malades qu'ont été réalisées la majorité des séquences disponibles et donc qu'on a retrouvé le plus grand nombre de mutations. On a donc trouvé des génomes de virus "rapides"

Chez les asymptomatiques (la majorité des personnes infectées), où l'immunité combat activement les virus agressifs au début de l'infection, ceux-ci sont éliminés et les virus peu agressifs sont sélectionnés (ceux dont la RdRp est plus lente), on isole peu de séquences complètes de ces personnes et donc on connaît mal les mutations responsables de cette atténuation. Mais on peut supposer que ce sont ces virus "lents" qui circulent finalement le plus en population générale maintenant jusqu'à supplanter complètement les plus "rapides" malgré leur avantage sélectif?

S'il se confirme que le virus est bien apparu en Europe en automne 2019 apporté par les athlètes des Jeux Militaires, il a d'abord touché une population jeune et en bonne santé, et a donc été confronté à une forte réponse immunitaire. Il a donc pu rester assez bénin (RdRp peu rapide) pour échapper à ce système immunitaire. Ensuite il a pu évoluer vers un phénotype plus agressif au contact d'une population moins résistante (la population générale puis les personnes âgées en maison de retraite). Et à nouveau, à la fin de l'été 2020, le virus semble atteindre plutôt les jeunes et présenter un phénotype bénin.

La mutation D614G sur la protéine spike, parmi d'autres, aurait pu augmenter la contagiosité du virus .

CONCLUSION

Il n'est pas impossible que tous les coronavirus des rhumes banals, lorsque qu'ils ont sauté de l'animal à l'homme (ils sont tous à l'origine responsables de zoonoses), aient commencé leur

course évolutive comme le SARS-CoV-2 avec une pandémie comme pour la Covid-19.
Mais à l'époque les moyens d'investigations en virologie et en biologie moléculaire n'existaient pas et on ne les a pas repérés.

On connaît les autres coronavirus des rhumes comme des virus banals; les virologistes allemands Ulf Dittmer et Christian Drosten pensent que le SARS-CoV-2 pourrait se transformer en virus de rhume banal (Dittmer et Drosten, 2020).

Cette évolution semble commune aux virus émergents (atténuation virale). Des mutations importantes du point de vue évolutif sont apparues dans les gènes codant des protéines qui interagissent avec le système immunitaire de l'hôte. Une des principales mutations (dans la polymérase virale) est logiquement associée à une plus grande fréquence de mutations dans tout le génome. Cette fréquence fluctue au fil du temps et montre un pic au moment où l'épidémie a été la plus active. Ces deux phénomènes liés pourraient donc expliquer l'évolution vers un phénotype bénin du SARS-CoV-2.

La grande implication de la communauté scientifique à propos de cette épidémie pourra certainement faire beaucoup avancer les connaissances dans le domaine de l'évolution des virus émergents. Il faut donc suivre avec attention les prochaines publications qui étudieront les mutations apparues ou non dans la phase tardive de l'épidémie.

Il faut espérer également que la recherche fondamentale et l'épidémiologie ne se focalisent pas uniquement sur le SARS-CoV-2 mais continuent à étudier les virus émergents et l'épidémiologie des virus respiratoires en général. La transmission des virus respiratoires est en effet encore trop mal connue ainsi que les moyens de réduire la contagion en période pandémique.

Index des mutations importantes

Rappel : les gènes sont notés en italique et en minuscule (sauf la première lettre), les protéines en majuscules
Séquences codant pour la NSP13 (NSP = protéine non structurale impliquée dans le complexe de réplication) : 17858A>G-(Y541C) et 17747C>T-(P504L)
Séquences codant pour la RdRp (polymérase du virus, NSP12) : 14408C>T-(P323L)
Séquence codant pour la protéine de surface Spike (impliquée dans la pénétration du virus dans ses cellules cibles) : 23403A>G-(D614G)
Séquence *Orf8* codant pour des protéines impliquées dans l'interaction avec le système immunitaire de l'hôte : L84S
Séquence *Orf3a* codant pour des protéines impliquées dans l'inflammasome : G251V et Q57H

RÉFÉRENCES

Banerjee R. et al., 2020 **https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.08.18.255570v1.full.pdf**
Banoun, 2020, https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-02886806, **http://ssrn.com/abstract=3637909**
Banoun, 2020-2, https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-02914300, http://ssrn.com/abstract=3654264
Braun et al., 2020-1, https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.04.17.20061440v1.full.pdf
Bullard J. et al., 2020,https://covidaba.com/wp-content/uploads/2020/05/Predicting-infectious-SARS-CoV-2-from-diagnostic-samples.pdf
Brewer WH et al ., 2011, *https://www.worldscientific.com/doi/pdf/10.1142/9789814508728_0015*
Cameron, 2007 https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17537853/
Carter et Sanford, 2012 , https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3507676/
Chaw et al., 2020, https://jbiomedsci.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s12929-020-00665-8
Claverie JM, 2020, *https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32549200/*

Covid-19 Galaxy Project, https://covid19.galaxyproject.org/evolution/
De Benito L., , hôpital Escurial, Madridhttps://elcorreodeespana.com/salud/163860083/Luis-de-Benito-otro-medico-honrado-dinamita-en-TVE-la-farsa-de-la-segunda-ola-Por-Luys-Coleto.html et video https://youtu.be/W8sJ1nklVpA
Dittmer et Drosten, 2020, https://www.n-tv.de/wissen/Coronavirus-zeigt-Anzeichen-der-Schwaeche-article21981505.html
https://pledgetimes.com/coronavirus-mutation-with-serious-consequences-virologist-sees-clear-clue-in-many-countries/
Drosten, 2018 https://www.nature.com/articles/s41598-018-33487-8
Ferron F et al., 2018 https://www.pnas.org/content/115/2/E162
Eskier D. et al., 2020-1 https://peerj.com/articles/9703/
Eskier D. et al., 2020-2 https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.08.12.248732v1
Eskier D; et al., 2020-3 https://peerj.com/articles/9587/
Freund Y., 2020, https://jdmichel.blog.tdg.ch/archive/2020/07/19/deuxieme-vague-c-est-difficile-de-rester-silencieux-307633.html
https://covidinfos.net/covid19/on-est-a-des-kilometres-dune-nouvelle-vague-estime-le-dr-freund/1210/
Freymuth et al., 2009 https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7125620/
Frost SDW et al., 2018, **https://academic.oup.com/mbe/article/35/6/1348/4983910**
Gambaro F et al., 2020, https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.04.24.059576v2.full
Gaunt, 2010, https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20554810/
Gioia, 2004, https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/039463200501800312
Gisaid https://www.gisaid.org
Gouv.fr, octobre 2019, **https://www.defense.gouv.fr/terre/actu-terre/jeux-mondiaux-militaire-d-ete-de-wuhan**
Grifoni et al., 2020 https://www.cell.com/cell/pdf/S0092-8674(20)30610-3.pdf
Grubaugh ND et al., 2020, https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867420308175
Guan Q et al., 2020, https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.04.21.054221v1
Hartenian E et al., 2020, https://www.researchgate.net/publication/342922262
Holland et al., mai 2020, https://jvi.asm.org/content/early/2020/04/30/JVI.00711-20
IHU, 2020, https://www.mediterranee-infection.com/covid-19/
IMEA, 2020, http://imea.fr/les-test-de-depistage-des-infections-par-sars-cov-2
Issa E et al., 2020, *https://msystems.asm.org/content/5/3/e00266-20*
Jaroszewski L ; et al., *https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7430578/*
JO Jeunesse Lausanne, 2020, https://www.olympic.org/fr/news/lausanne-2020-en-chiffres-1
Korber B. et al., Cell 20 aout 2020 https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.06.043
La Scola et al., 2020, *https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32342252/*
Lass Y., 2020, https://youtu.be/fdmeujz5jcg
https://www.israelnationalnews.com/News/News.aspx/282879
Latham and Wilson, 2020, *https://www.independentsciencenews.org/commentaries/a-proposed-origin-for-sars-cov-2-and-the-covid-19-pandemic/* discuté par Sallard et al., 2020, *https://doi.org/10.1051/medsci/2020123*
Le Bert et al;, 2020
https://www.biorxiv.org/content/biorxiv/early/2020/05/27/2020.05.26.115832.full.pdf
Li et al., 2008, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2683413/
Li Y. et al, 2020 , https://poseidon01.ssrn.com/delivery.php?ID=369003066078011065104087084122074127055013014086045010029076082078091103029080122010106030013042057038011014118124068105067088105016075093037078126119111021026067111038006071094095071105102093100029096087024019089127100115108011104087016

065118121117112&EXT=pdf
Liu R. et al., 2020, **https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7094385/**
Lu J. et al., 2020 https://www.thelancet.com/journals/ebiom/article/PIIS2352-3964(20)30336-4/fulltext
Mateus, et al., 2020, https://science.sciencemag.org/content/early/2020/08/04/science.abd3871/tab-pdf
Muth D. et al., 2018, https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30310104/
Ng et al., 2016, https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26954467/
Pachetti M. et al., 2020, https://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12967-020-02344-6,
Parola B., 2020,
https://www.facebook.com/cat.sunska/timeline?lst=100004448388151%3A100047856725067%3A1597301626
Remuzzi G., 2020, https://www.corriere.it/cronache/20_giugno_19/coronavirus-remuzzi-nuovi-positivi-non-sono-contagiosi-stop-paura-bf24c59c-b199-11ea-842e-6a88f68d3e0a.shtml
https://www.lequotidiendumedecin.fr/specialites/infectiologie/covid-19-selon-des-membres-de-la-communaute-scientifique-italienne-le-virus-est-sur-le-point-de
http://informaresenzacensure.blogspot.com/2020/06/coronavirus-basta-catastrofismo-10.html
https://www.npr.org/2020/03/19/817974987/every-single-individual-must-stay-home-italy-s-coronavirus-deaths-pass-china-s
Schmidtke P, 2020, *https://www.discngine.com/blog/2020/3/29/sars-cov-2-3-nsp1-a-detailed-analysis*
Schmitt M., 2020, https://www.huffingtonpost.fr/entry/coronavirus-alsace-cas-suspect-novembre_fr_5eb3c29ac5b6526942a22e08
Sonigo P. , 2020-2
https://www.linkedin.com/posts/bernard-dugu%C3%A9-014907167_la-th%C3%A8se-des-deux-types-de-contamination-activity-6702143867023589377-JgvU
Su et al., mars 2020 https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.03.11.987222v1
Tarro G, 2020. https://www.tuttosanita.com/coronavirus-la-parola-a-giulio-tarro/
Thoms M. et al., 2020, https://science.sciencemag.org/content/early/2020/07/16/science.abc8665
Tomaszewski T et al., https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.07.31.231472v1
Vabret, 2020, https://umfcs.u-bordeaux.fr/documents/informations-covid-19/publications-scientifiques/1-s2.0-S1074761320301837-main.pdf
Van Dorp et al., sept 2020, https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134820301829
Vernazza P., 2020, https://covidinfos.net/covid19/pour-le-pr-vernazza-la-plupart-des-personnes-figurant-dans-les-statistiques-sur-le-coronavirus-ne-sont-pas-mortes-de-la-maladie-covid-19/1066/
https://covidinfos.net/covid19/pour-le-dr-vernazza-lepidemie-etait-deja-sous-controle-avant-le-confinement/417/
https://corona-transition.org/der-infektiologe-prof-pietro-vernazza-sieht-covid-19-im-bereich-einer
https://www.medinside.ch/de/post/chefarzt-vernazza-erzaehlt-stuss
Volz E.M. Et al., 2020 https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.07.31.20166082v1
Wang D., 2020, https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.06.26.173203v1
Wang Rui ; et al., 2020 28 juillet *https://arxiv.org/pdf/2007.12692.pdf*
Wang R et al., 20 aout 2020, *https://arxiv.org/pdf/2008.07488.pdf*
Wen F et al., 2020, *https://www.journalofinfection.com/article/S0163-4453(20)30108-0/fulltext*
Wu S. et al., 2020 https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.08.15.241349v1
Young B.E. Et al., 2020 https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(20)31757-8/fulltext
Zhao J., et al ., 2020 (*https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.07.04.187435v1*)