

**MEMOIRE  
POUR LE DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES  
DE BIOLOGIE MEDICALE**

**Soutenu publiquement le 11 Avril 2022  
Par Mme Daniela LUPAU épouse CODREAN**

**Conformément aux dispositions réglementaires en vigueur tient lieu de  
THESE EN VUE DU DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

---

**Mise en place de la technique ELISpot anti-SARS-CoV-2 et suivi de  
l'immunité T spécifique des patients infectés du CHU de Lille**

---

**Membres du jury :**

**Président :** Madame le Professeur DUPONT Annabelle, PU-PH, CHU Lille

**Directeur de thèse :** Madame le Docteur DEMARET Julie, MCU-PH, CHU Lille

**Assesseurs :** Monsieur le Docteur LEFEVRE Guillaume, MCU-PH, CHU Lille  
Monsieur le Docteur MICHEL Moïse, PHC, CHU Nîmes

 <b>UFR35</b> faculté de pharmacie	 <b>Université de Lille</b>	LISTE GEREE	LG/FAC/001
FACULTE DE PHARMACIE		Enseignants et Enseignants-chercheurs 2021-2022	Version 2.0 Applicable au 02/01/2022
Document transversal			

REDACTION	VERIFICATION	APPROBATION
<b>Audrey Hennebelle</b> Assistante de direction	<b>Cyrille Porta</b> Responsable des Services	<b>Delphine Allorge</b> Doyen

### Université de Lille

Président  
Premier Vice-président  
Vice-présidente Formation  
Vice-président Recherche  
Vice-présidente Réseaux internationaux et européens  
Vice-président Ressources humaines  
Directrice Générale des Services

Régis BORDET  
Etienne PEYRAT  
Christel BEAUCOURT  
Olivier COLOT  
Kathleen O'CONNOR  
Jérôme FONCEL  
Marie-Dominique SAVINA

### UFR35

Doyen  
Premier Vice-Doyen  
Vice-Doyen Recherche  
Vice-Doyen Finances et Patrimoine  
Vice-Doyen Coordination pluriprofessionnelle et Formations sanitaires  
Vice-Doyen RH, SI et Qualité  
Vice-Doyenne Formation tout au long de la vie  
Vice-Doyen Territoires-Partenariats  
Vice-Doyenne Vie de Campus  
Vice-Doyen International et Communication  
Vice-Doyen étudiant

Dominique LACROIX  
Guillaume PENEL  
Éric BOULANGER  
Damien CUNY  
Sébastien D'HARANCY  
Hervé HUBERT  
Caroline LANIER  
Thomas MORGENROTH  
Claire PINÇON  
Vincent SOBANSKI  
Dorian QUINZAIN

### Faculté de Pharmacie

Doyen  
Premier Assesseur et Assesseur en charge des études  
Assesseur aux Ressources et Personnels  
Assesseur à la Santé et à l'Accompagnement  
Assesseur à la Vie de la Faculté  
Responsable des Services  
Représentant étudiant

Delphine ALLORGE  
Benjamin BERTIN  
Stéphanie DELBAERE  
Anne GARAT  
Emmanuelle LIPKA  
Cyrille PORTA  
Honoré GUISE

 	LISTE GEREE	LG/FAC/001
FACULTE DE PHARMACIE	Enseignants et Enseignants-chercheurs 2021-2022	Version 2.0 Applicable au 02/01/2022
Document transversal		

### Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers (PU-PH)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie et Santé publique	81
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie	82
M.	DÉCAUDIN	Bertrand	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81
M.	DINE	Thierry	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie	82
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie - Virologie	82
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
M.	ODOU	Pascal	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
Mme	POULAIN	Stéphanie	Hématologie	82
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
M.	STAELS	Bart	Biologie cellulaire	82

### Professeurs des Universités (PU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Biophysique - RMN	85
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle	85
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie	87
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	CHAVATTE	Philippe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86

M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences végétales et fongiques	87
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques	87
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Biophysique - RMN	85
Mme	DEPREZ	Rebecca	Chimie thérapeutique	86
M.	DEPREZ	Benoît	Chimie bioinorganique	85
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences végétales et fongiques	87
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie	86
M.	ELATI	Mohamed	Biomathématiques	27
M.	FOLIGNÉ	Benoît	Bactériologie - Virologie	87
Mme	FOULON	Catherine	Chimie analytique	85
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie et Santé publique	86
M.	GOOSSENS	Jean-François	Chimie analytique	85
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie	86
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie thérapeutique	86
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques	26
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie cellulaire	87
Mme	LESTRELIN	Réjane	Biologie cellulaire	87
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie physique	85
M.	MILLET	Régis	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
Mme	MUHR-TAILLEUX	Anne	Biochimie	87
Mme	PERROY	Anne-Catherine	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	ROMOND	Marie-Bénédicte	Bactériologie - Virologie	87
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie	86
M.	SERGHÉRAERT	Éric	Droit et Economie pharmaceutique	86
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie industrielle	85
M.	WILLAND	Nicolas	Chimie organique	86

 	LISTE GEREE	LG/FAC/001
FACULTE DE PHARMACIE	Enseignants et Enseignants-chercheurs 2021-2022	Version 2.0 Applicable au 02/01/2022
Document transversal		

### Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers (MCU-PH)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	BLONDIAUX	Nicolas	Bactériologie - Virologie	82
Mme	DEMARET	Julie	Immunologie	82
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie et Santé publique	81
Mme	GENAY	Stéphanie	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81
M.	LANNOY	Damien	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
Mme	ODOU	Marie-Françoise	Bactériologie - Virologie	82

### Maîtres de Conférences des Universités (MCU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	AGOURIDAS	Laurence	Chimie thérapeutique	85
Mme	ALIOUAT	Cécile-Marie	Parasitologie - Biologie animale	87
M.	ANTHÉRIEU	Sébastien	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie	87
M.	BANTUBUNGI-BLUM	Kadiombo	Biologie cellulaire	87
Mme	BARTHELEMY	Christine	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	85
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie - Virologie	87
M.	BELARBI	Karim-Ali	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	BERTHET	Jérôme	Biophysique - RMN	85
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie	87
M.	BOCHU	Christophe	Biophysique - RMN	85
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie	86

M.	BOSC	Damien	Chimie thérapeutique	86
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie	87
Mme	CARON-HOUDE	Sandrine	Biologie cellulaire	87
Mme	CARRIÉ	Hélène	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	CHARTON	Julie	Chimie organique	86
M.	CHEVALIER	Dany	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	DANEL	Cécile	Chimie analytique	85
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques	85
M.	DHIFLI	Wajdi	Biomathématiques	27
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire	87
M.	EL BAKALI	Jamal	Chimie thérapeutique	86
M.	FARCE	Amaury	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	FLIPO	Marion	Chimie organique	86
M.	FURMAN	Christophe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie	87
Mme	GOOSSENS	Laurence	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie	87
M.	HAMONIER	Julien	Biomathématiques	26
Mme	HAMOUDI-BEN YELLES	Chérifa-Mounira	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie	86
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie	87
M.	KAMBIA KPAKPAGA	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	KARROUT	Younes	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie	87

Mme	LECOEUR	Marie	Chimie analytique	85
Mme	LEHMANN	Hélène	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	LELEU	Natascha	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie analytique	85
Mme	LOINGEVILLE	Florence	Biomathématiques	26
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie	86
M.	MOREAU	Pierre-Arthur	Sciences végétales et fongiques	87
M.	MORGENROTH	Thomas	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques	85
M.	PIVA	Frank	Biochimie	85
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie et Santé publique	86
M.	POURCET	Benoît	Biochimie	87
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques / Innovations pédagogiques	85
Mme	RAVEZ	Séverine	Chimie thérapeutique	86
Mme	RIVIÈRE	Céline	Pharmacognosie	86
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie	86
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie	87
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie - Virologie	87
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie - Biologie animale	87
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie	87
M.	VILLEMAGNE	Baptiste	Chimie organique	86
M.	WELTI	Stéphane	Sciences végétales et fongiques	87
M.	YOUS	Saïd	Chimie thérapeutique	86
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques	85

### Professeurs certifiés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement
Mme	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	HUGES	Dominique	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

### Professeurs Associés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	DAO PHAN	Haï Pascal	Chimie thérapeutique	86
M.	DHANANI	Alban	Droit et Economie pharmaceutique	86

### Maîtres de Conférences Associés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	CUCCHI	Malgorzata	Biomathématiques	85
M.	DUFOSSEZ	François	Biomathématiques	85
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	85
M.	GILLOT	François	Droit et Economie pharmaceutique	86
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	MITOUMBA	Fabrice	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	86
M.	PELLETIER	Franck	Droit et Economie pharmaceutique	86
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques	85

### Assistants Hospitalo-Universitaire (AHU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	CUVELIER	Élodie	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
M.	GRZYCH	Guillaume	Biochimie	82
Mme	LENSKI	Marie	Toxicologie et Santé publique	81
Mme	HENRY	Héloïse	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
Mme	MASSE	Morgane	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81

### Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche (ATER)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	GEORGE	Fanny	Bactériologie - Virologie / Immunologie	87
Mme	N'GUESSAN	Cécilia	Parasitologie - Biologie animale	87
M.	RUEZ	Richard	Hématologie	87
M.	SAIED	Tarak	Biophysique - RMN	85
M.	SIEROCKI	Pierre	Chimie bioinorganique	85

### Enseignant contractuel

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement
M.	MARTIN MENA	Anthony	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière

### CYCLE DE VIE DU DOCUMENT

Version	Modifié par	Date	Principales modifications
1.0		20/02/2020	Création
2.0		02/01/2022	Mise à jour

## ***Faculté de Pharmacie de Lille***

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX  
Tel. : 03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64  
<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

**L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.**

# Liste des Figures

---

<b>Figure 1</b> : Place du SARS-CoV-2 dans la classification taxonomique des coronavirus responsables d'infections humaines, selon l'ICTV. ....	19
<b>Figure 2</b> : Représentation schématique de trois coronavirus humains (SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 et MERS-CoV) et la transmission à l'Homme à partir de la chauve-souris, via des hôtes intermédiaires. ....	21
<b>Figure 3</b> : Représentation schématique de la structure du SARS-CoV-2 .....	22
<b>Figure 4</b> : Organisation du génome du SARS-CoV-2, issue du site Viral Zone de l'Institut Suisse de Bioinformatique (SIB) .....	23
<b>Figure 5</b> : Schéma simplifié représentatif de la structure de la protéine Spike et sa liaison au récepteur ACE2 via le domaine RBD .....	24
<b>Figure 6</b> : Structure du domaine de liaison RBD (ruban bleu) et du motif de liaison RBM (ruban vert) de la protéine Spike du SARS-CoV-2 au récepteur ACE2 de la cellule hôte (ruban rouge). Site actif du récepteur ACE2 (en jaune) permettant l'interaction RBD-ACE2.....	25
<b>Figure 7</b> : Schéma représentant les différentes protéines structurales du SARS-CoV-2 et leurs interactions.....	26
<b>Figure 8</b> : Schéma répertoriant les mutations les plus fréquentes (en rouge) dans la protéine S du SARS-CoV2 déterminées par des méthodes de regroupement et d'alignement.....	28
<b>Figure 9</b> : Représentation schématique du cycle de réplication du SARS-CoV-2 .....	34
<b>Figure 10</b> : Incidence des infections COVID-19 en France (haut). Nombre de décès liés aux infections COVID-19 en France (bas) entre le 29 février 2020 et le 7 février 2022.....	36
<b>Figure 11</b> : Schéma représentatif de la période d'incubation du SARS-CoV-2 et l'apparition des symptômes .....	38
<b>Figure 12</b> : Représentation schématique des mécanismes de la réponse du système immunitaire suite à une exposition au SARS-CoV-2 .....	41
<b>Figure 13</b> : Représentation schématique de la mise en place de l'immunité innée suite à une infection virale.....	43
<b>Figure 14</b> : Schéma représentant la cascade de signalisation des interférons dans l'infection par le SARS-CoV-2 .....	45
<b>Figure 15</b> : Distribution des cellules immunitaires et expression des cytokines et chimiokines chez les patients COVID-19.....	48
<b>Figure 16</b> : Voies d'activation du système du complément.....	53
<b>Figure 17</b> : Boucle d'inflammation médiée par l'activation exacerbée du complément par le SARS-CoV-2 .....	55
<b>Figure 18</b> : Fonctions des lymphocytes T CD4+ dans le COVID-19.....	57
<b>Figure 19</b> : Réponse immunitaire aberrante et inefficace chez les patients atteints d'une infection sévère au COVID-19 .....	59
<b>Figure 20</b> : Analyse d'homologie de séquence du domaine RBD de la protéine Spike du SARS-CoV-2 par rapport aux autres coronavirus humains .....	61
<b>Figure 21</b> : Cinétique de la réponse immunitaire adaptative lors d'une infection à SARS-CoV-2 .....	62
<b>Figure 22</b> : Schéma représentatif de l'action des anticorps neutralisants.....	63
<b>Figure 23</b> : Schéma représentant la place actuelle des tests diagnostiques biologiques de l'infection au SARS-CoV-2 .....	65

<b>Figure 24</b> : Schéma résumé de la technique de RT-PCR à partir d'un échantillon naso ou oropharyngé.....	66
<b>Figure 25</b> : Schéma de la réalisation du test de détection rapide d'antigènes du SARS-CoV-2, adapté de Diagnostics Roche.....	68
<b>Figure 26</b> : Schéma représentant le principe des tests sérologiques les plus utilisés pour la détection des anticorps spécifiques du SRAS-CoV-2.....	70
<b>Figure 27</b> : Schéma représentant le principe des tests sérologiques de détection rapide à flux latéral (LFIA) des anticorps spécifiques du SARS-CoV-2.....	72
<b>Figure 28</b> : Affiche des consignes des gestes barrières du ministère des Solidarités et de la Santé publique en France .....	80
<b>Figure 29</b> : Principe des vaccins basés sur l'ARNm de la protéine Spike porté par des microparticules lipidiques .....	81
<b>Figure 30</b> : Principe des vaccins basés sur l'ADN de la protéine Spike porté par les adénovirus .....	82
<b>Figure 31</b> : Schéma représentant le contenu d'un puits lors de la technique ELISpot COVID..	85
<b>Figure 32</b> : Schéma de plaque de microtitration 96 puits utilisé pour le test ELISpot COVID maison .....	88
<b>Figure 33</b> : Photographie du lecteur CTL Reader série 6 (ImmunoSpot®) du laboratoire .....	89
<b>Figure 34</b> : Exemple de lecture d'un puits par le lecteur CTL Reader série 6 (ImmunoSpot®)	89
<b>Figure 35</b> : Algorithme d'interprétation du test ELISpot COVID maison .....	91
<b>Figure 36</b> : Détection automatisée des spots IFN $\gamma$ dans les puits après 16 à 20h de stimulation. Illustration de trois schémas représentatifs de réponse.....	95
<b>Figure 37</b> : Comparaison du nombre de spots IFN $\gamma$ -SFCs ( <i>Spot Forming Cells</i> ) détectés selon l'antigène (pools de peptide M, N, S ou mix MNS) testé.....	96
<b>Figure 38</b> : Nombre de spots détectés par le test ELISpot COVID maison en réponse au mix MNS, chez les patients SARS-CoV-2 confirmés et les contrôles (témoins négatifs).....	97
<b>Figure 39</b> : Courbe ROC du test ELISpot COVID maison utilisant le mix MNS .....	97
<b>Figure 40</b> : Algorithme d'interprétation du test ELISpot COVID maison. ....	98
<b>Figure 41</b> : Organigramme de l'inclusion des patients dans l'étude IMMUNOCOV.....	99
<b>Figure 42</b> : Répartition des patients selon le sexe.....	100
<b>Figure 43</b> : Répartition des patients selon la forme clinique (légère, modérée ou sévère)....	101
<b>Figure 44</b> : Répartition des hommes et des femmes dans chaque groupe clinique .....	101
<b>Figure 45</b> : Distribution graphique du nombre de spots avec l'Ag M, l'Ag S et le mix MNS selon les visites (V0, V1, V2).....	104
<b>Figure 46</b> : Distribution du nombre de spots en réponse à l'Ag M selon la forme clinique par visite .....	106
<b>Figure 47</b> : Distribution du nombre de spots en réponse à l'Ag S selon la forme clinique par visite .....	107
<b>Figure 48</b> : Distribution du nombre de spots en réponse au mix MNS selon la forme clinique par visite .....	108

# Liste des Tableaux

---

<b>Tableau 1 :</b> Variants préoccupants du SARS-CoV-2 répertoriés par l’OMS au 15/03/2022.....	30
<b>Tableau 2:</b> Recommandations d'utilisation des anticorps monoclonaux disponibles en France à la date du 11 janvier 2022 (mise à jour du DGS-Urgent du 4 janvier 2022) .....	78
<b>Tableau 3:</b> Principales caractéristiques des patients inclus lors de la réalisation du test ELISpot COVID.....	94
<b>Tableau 4:</b> Principales caractéristiques cliniques des patients inclus dans IMMUNOCOV....	103
<b>Tableau 5:</b> Distribution des délais de prélèvements des patients IMMUNOCOV en fonction des visites .....	103
<b>Tableau 6:</b> Caractéristiques de la distribution du nombre de spots selon l’Ag utilisé pour la stimulation et les visites, et selon la forme clinique. ....	105

# Liste des abréviations

---

<b>AA</b> : acide aminé	<b>ELISpot</b> : <i>Enzyme-linked immunospot</i>
<b>AAP</b> : Autorisation d'accès précoce	<b>EMA</b> : <i>European Medicines Agency</i>
<b>Ac</b> : Anticorps	<b>Fc</b> : Fraction cristallisable
<b>ACE2</b> : Enzyme de conversion de l'angiotensine 2	<b>G-CSF</b> : <i>Granulocyte colony stimulating factor</i>
<b>ADE</b> : <i>Antibody-dependant enhancement</i>	<b>GISAID</b> : <i>Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data</i>
<b>ADN</b> : Acide désoxyribonucléique	<b>GM-CSF</b> : <i>Granulocyte macrophage colony stimulating factor</i>
<b>ADNc</b> : ADN complémentaire	<b>HAS</b> : Haute Autorité de Santé
<b>Ag</b> : Antigène	<b>HCoV</b> : <i>Human Coronavirus</i>
<b>AMM</b> : Autorisation de mise sur le marché	<b>HLA-DR</b> : <i>Human Leukocyte Antigen – DR isotype</i>
<b>ARN</b> : Acide ribonucléique	<b>ICTV</b> : <i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
<b>ARNm</b> : ARN messenger	<b>IFN</b> : Interféron
<b>AuNP</b> : Nanoparticules d'or colloïdal	<b>IFNAR</b> : <i>Interferon <math>\alpha/\beta</math> receptor</i>
<b>AVC</b> : Accident vasculaire cérébral	<b>IFN<math>\alpha</math></b> : Interféron alpha
<b>BCR</b> : <i>B-cell receptor</i>	<b>IFN<math>\beta</math></b> : Interféron bêta
<b>CAM</b> : Complexe d'attaque membranaire	<b>IFN<math>\gamma</math></b> : Interféron gamma
<b>CD</b> : Cluster de différenciation	<b>IgA</b> : Immunoglobuline A
<b>cDC</b> : Cellule dendritique conventionnelle	<b>IgG</b> : Immunoglobuline G
<b>CHU</b> : Centre Hospitalier Universitaire	<b>IgM</b> : Immunoglobuline M
<b>CIVD</b> : Coagulation intravasculaire disséminée	<b>IGRAs</b> : <i>Interferon gamma release assays</i>
<b>CCL</b> : <i>Chemokines ligand</i>	<b>IL</b> : Interleukine
<b>CLIA</b> : <i>Chemiluminescent immunoassay</i>	<b>IMC</b> : Indice de Masse Corporelle
<b>CLR</b> : <i>C-like receptor</i>	<b>IQR</b> : Intervalle interquartile
<b>CMH</b> : Complexe majeur d'histocompatibilité	<b>IRF</b> : <i>Interferon regulatory factor</i>
<b>COVID-19</b> : <i>Coronavirus Disease 2019</i>	<b>ISG</b> : <i>IFN-stimulated genes</i>
<b>CPA</b> : Cellule présentatrice d'antigène	<b>KIR</b> : <i>Killer-cell immunoglobuline-like receptor</i>
<b>CRF</b> : <i>Case Report Form</i>	<b>LB</b> : Lymphocyte B
<b>CTL</b> : Lymphocytes T cytotoxiques	<b>LBA</b> : Liquide broncho-alvéolaire
<b>CXCL</b> : <i>Chemokines ligand</i>	<b>LFIA</b> : <i>Lateral Flow Immunochromatographic Assay</i>
<b>DCs</b> : Dendritic cells (cellules dendritiques)	<b>LICORNE</b> : Lille CORonavirus NEtwork
<b>DO</b> : Densité Optique	
<b>ECMO</b> : <i>Extracorporeal membrane oxygenation</i>	
<b>ELISA</b> : <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>	

**LT** : Lymphocyte T

**MDA5**: *Melanoma differentiation-associated 5*

**MERS-CoV** : *Middle East Respiratory Syndrome-related Coronavirus*

**MVAS** : *Mitochondrial antiviral signaling protein*

**MyD88** : *Myeloid differentiation 88*

**NABM** : Nomenclature des actes de biologie médicale

**NETs** : *Neutrophil extracellular traps*

**NFκB** : *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer*

**NK** : Natural Killer

**NLR** : *NOD-like receptor*

**Nsp** : *Non-structural proteins*

**NTD** : *N-terminal domain*

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

**ORF** : *Open reading frame*

**PAMPs** : *Pathogene-associated molecular patterns*

**PBMC** : *Peripheral blood mononuclear cell*

**PCR** : Réaction en chaîne par polymérase

**pDC** : Cellules dendritiques plasmacytoïdes

**PDGF** : *Platelet Derived Growth Factor*

**PD-L1** : *Programmed Death-Ligand 1*

**PHA** : Phytohématagglutinine

**PNN** : Polynucléaires neutrophiles

**PRR** : *Pattern Recognition Receptor*

**RBD** : *Receptor-binding domain*

**RBM** : *Receptor-binding motif*

**RCP** : Résumé des caractéristiques du produit

**RdRp** : RNA dependent RNA polymerase

**RE** : Réticulum endoplasmique

**RLR** : *RIG-I like receptor*

**ROS** : *Reactive oxygen species*

**RTC** : *replication/transcription complex*

**RT-LAMP** : *Retro Transcription Loop-mediated isothermal amplification*

**RT-PCR** : *Retro Transcription-Polymerase Chain Reaction*

**SARS-CoV-1** : *Severe Acute Respiratory Syndrome-related Coronavirus 1*

**SARS-CoV-2** : *Severe Acute Respiratory Syndrome-related Coronavirus 2*

**SDRA** : Syndrome de détresse respiratoire aigue

**STAT** : *Signal transducer and activator of transcription*

**TCA** : Temps de céphaline activée

**TCR** : *T-cell receptor*

**Tfh** : *T follicular helper*

**Th1** : T helper 1

**TIM-3** : *T-cell immunoglobulin and mucin containing protein-3*

**TLR** : *Toll-like receptors*

**TMA** : Transcription Mediated Amplification

**TMPRSS2** : *transmembrane protease serine subfamily member 2*

**TNFα** : *Tumor necrosis factor alpha*

**TP** : Taux de prothrombine

**TRIF** : *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β*

**VIH** : Virus de l'immunodéficience humaine

**VOC** : *Variant of concern*

**VOI** : *Variant of interest*

# Table des matières

<b>Introduction .....</b>	<b>18</b>
<b>I. Généralités sur le SARS-CoV-2.....</b>	<b>19</b>
A. Historique et origine du virus.....	19
a. Taxonomie et phylogénie .....	19
b. Découverte du SARS-CoV-2 .....	20
c. Origines de l'apparition du SARS-CoV-2 .....	20
B. Structure du virus .....	22
a. Morphologie du virus.....	22
b. Organisation du génome .....	22
c. Protéines structurales .....	24
C. Variabilités génétiques.....	27
a. Nomenclature.....	27
b. Les principaux variants du SARS-CoV-2 .....	30
D. Cycle viral.....	32
a. Entrée du virus dans la cellule-hôte.....	32
b. Réplication du génome.....	34
c. Assemblage et formation de virions.....	35
<b>II. Infection par le SARS-CoV-2.....</b>	<b>35</b>
A. Épidémiologie .....	35
a. Au niveau mondial .....	35
b. En France.....	36
B. Transmission virale .....	37
a. Modes de transmission.....	37
b. Période de transmission .....	37
C. Manifestations cliniques.....	38
a. Les infections asymptomatiques .....	38
b. Les infections symptomatiques légères à modérées.....	39
c. Les infections symptomatiques sévères .....	39
d. Les symptômes prolongés à une infection COVID-19 ou COVID-long .....	40
<b>III. Immunité antivirale.....</b>	<b>41</b>
A. Immunité innée.....	42
a. Initiation de l'immunité innée par les mécanismes de reconnaissance .....	42
b. Les interférons.....	44
c. Inflammation et cytokines pro-inflammatoires .....	46
d. Les principales cellules immunitaires innées dans la maladie COVID-19 .....	49
e. Le complément.....	52
B. Immunité adaptative.....	56
a. Réponse cellulaire à l'infection par le SARS-CoV-2 .....	56
b. Réponse humorale à l'infection par le SARS-CoV-2 .....	60
<b>IV. Diagnostic biologique .....</b>	<b>64</b>
A. Diagnostic biologique direct.....	65
a. Les tests moléculaires .....	65
b. Tests antigéniques.....	67
B. Diagnostic biologique indirect .....	69
a. Tests sérologiques .....	69
b. ELISpot COVID .....	73
<b>V. Prise en charge thérapeutique .....</b>	<b>74</b>
A. Prise en charge médicamenteuse .....	74

a. Les antiviraux _____	75
b. Les anticorps monoclonaux _____	75
c. Les alternatives thérapeutiques _____	78
B. Prévention.....	79
a. Mesures sanitaires _____	79
b. Vaccination COVID-19 _____	81
<b>Objectifs de l'étude.....</b>	<b>83</b>
<b>Matériel et méthodes .....</b>	<b>84</b>
<b>I. Mise au point de la technique ELISpot anti-SARS-CoV-2 .....</b>	<b>84</b>
A. Mise au point de la cohorte initiale.....	84
B. Mise en place de la technique ELISpot COVID maison.....	84
C. Protocole expérimental.....	85
a. Préparation cellulaire _____	86
b. Isolement des PBMC _____	86
c. Numération de la préparation cellulaire _____	86
d. Préparation des antigènes _____	87
e. Dépôt dans la plaque _____	87
f. Révélation _____	88
<b>II. Étude de suivi de la réponse immunitaire.....</b>	<b>90</b>
A. Inclusion des patients .....	90
B. Critères d'exclusion des patients .....	90
C. Critères d'interprétation des résultats d'ELISpot COVID.....	91
<b>III. Recueil d'informations cliniques .....</b>	<b>92</b>
<b>IV. Analyse statistique .....</b>	<b>92</b>
<b>Résultats.....</b>	<b>94</b>
<b>I. Mise au point du test ELISpot COVID maison .....</b>	<b>94</b>
A. Faisabilité du test.....	94
a. Caractéristiques de la population testée _____	94
b. Résultats du test ELISpot COVID maison _____	95
B. Évaluation de la sensibilité et spécificité du test ELISpot COVID .....	96
a. Détermination de la sensibilité, spécificité et du seuil de positivité _____	96
b. Interprétation biologique des résultats d'ELISpot COVID _____	98
<b>II. Suivi de l'immunité cellulaire avec le test ELISpot COVID .....</b>	<b>99</b>
A. Population d'étude .....	99
B. Caractéristiques des patients.....	100
C. Résultats de suivi du nombre de spots selon le temps et la forme clinique .....	103
a. Suivi du nombre de spots en fonction du temps _____	103
b. Suivi du nombre de spots selon la forme clinique _____	105
<b>Discussion .....</b>	<b>109</b>
A. Réponse immunitaire suite à l'infection par le SARS-CoV-2.....	109
B. Le test ELISpot COVID.....	111
C. Le suivi de l'immunité cellulaire T .....	114
D. Limites de l'étude.....	118
E. Perspectives .....	118
<b>Conclusion.....</b>	<b>121</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>122</b>

# Introduction

---

Depuis Décembre 2019, le monde a été témoin de l'émergence de la plus grande pandémie de ce 21<sup>ème</sup> siècle, causée par un coronavirus appelé SARS-CoV-2 (*Severe Acute Respiratory Syndrome-related Coronavirus 2*). Cette nouvelle menace infectieuse détectée pour la première fois en Chine, à Wuhan chez des patients présentant des pneumopathies inexplicables, a rapidement entraîné une pandémie à l'échelle planétaire, entraînant la mort de millions de personnes dans le monde. La dissémination brutale et rapide de ce coronavirus a provoqué une crise sanitaire, qui perdure encore aujourd'hui, avec des conséquences socio-économiques importantes. La mobilisation rapide des personnels soignants pour endiguer la pandémie et prendre en charge les patients, ainsi que de la communauté scientifique et des autorités sanitaires et gouvernementales, a permis de rechercher des solutions en temps réel dans la gestion de la crise sanitaire et le contrôle de la dissémination virale, telles que des mesures restrictives d'urgence marquées par des confinements multiples de la population, l'instauration de couvre-feux, la mise en place de gestes barrières modifiant nos habitudes comme le port du masque. Cependant, une compréhension de la physiopathologie du SARS-CoV-2, ainsi que des modalités de réponse du système immunitaire dans la lutte anti-infectieuse est déterminant pour l'issue de la maladie. Le SARS-CoV-2 infecte principalement le système respiratoire, provoquant un large panel de présentations cliniques, allant de l'infection asymptomatique aux formes graves avec un syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) nécessitant une prise en charge en réanimation et pouvant entraîner une issue fatale des patients infectés. Il semble donc important d'étudier et évaluer la réponse immunitaire afin d'envisager la sortie de cette pandémie.

La réponse immunitaire anti-infectieuse fait intervenir de nombreux acteurs de l'immunité innée et de l'immunité adaptative (cellulaire et humorale). En parallèle de la recherche moléculaire et sérologique, la mémoire immunitaire spécifique T a pu montrer son intérêt lors de l'épidémie de SARS-CoV-1. Ainsi, dans ce travail, il est proposé de mettre en place un nouvel outil permettant d'évaluer la réponse immunitaire adaptative, et plus précisément la réponse des lymphocytes T anti-SARS-CoV-2. Nous décrivons ainsi la mise en place de la technique ELISpot anti-SARS-CoV-2 au sein de l'Institut d'immunologie du CHU de Lille, et l'utilisation de cet outil pour le suivi de l'immunité T spécifique des patients infectés du CHU de Lille.

# I. Généralités sur le SARS-CoV-2

## A. Historique et origine du virus

### a. Taxonomie et phylogénie

Selon le Comité International de taxonomie virale (ICTV), le SARS-CoV-2 est un virus appartenant à l'ordre des *Nidovirales*, plus particulièrement à la famille des *Coronaviridae*. Cette famille se décompose en deux sous-familles : *Letovirinae* et *Orthocoronavirinae*, elle-même composée de quatre genres : les *Alpha-*, *Beta-*, *Gamma-* et *Delta-coronavirus* (1). Ces coronavirus sont majoritairement retrouvés chez les oiseaux et les mammifères où ils sont responsables d'infections respiratoires et digestives. Jusqu'en 2019, six coronavirus étaient connus comme responsables d'infections humaines : deux Alphacoronavirus, les *Human coronavirus* (HCoV)-NL63 et HCoV-229E, ainsi que quatre Betacoronavirus (Betacoronavirus 1, HCoV-HKU1, SARS-CoV et MERS-CoV (Middle East Respiratory Syndrome-related Coronavirus) (2,3). En 2019, est apparu un nouveau Betacoronavirus, du sous-genre Sarbecovirus, le SARS-CoV-2 (4). Par la suite, le SARS-CoV a été dénommé SARS-CoV-1 suite à l'apparition du SARS-CoV-2 (Figure 1).

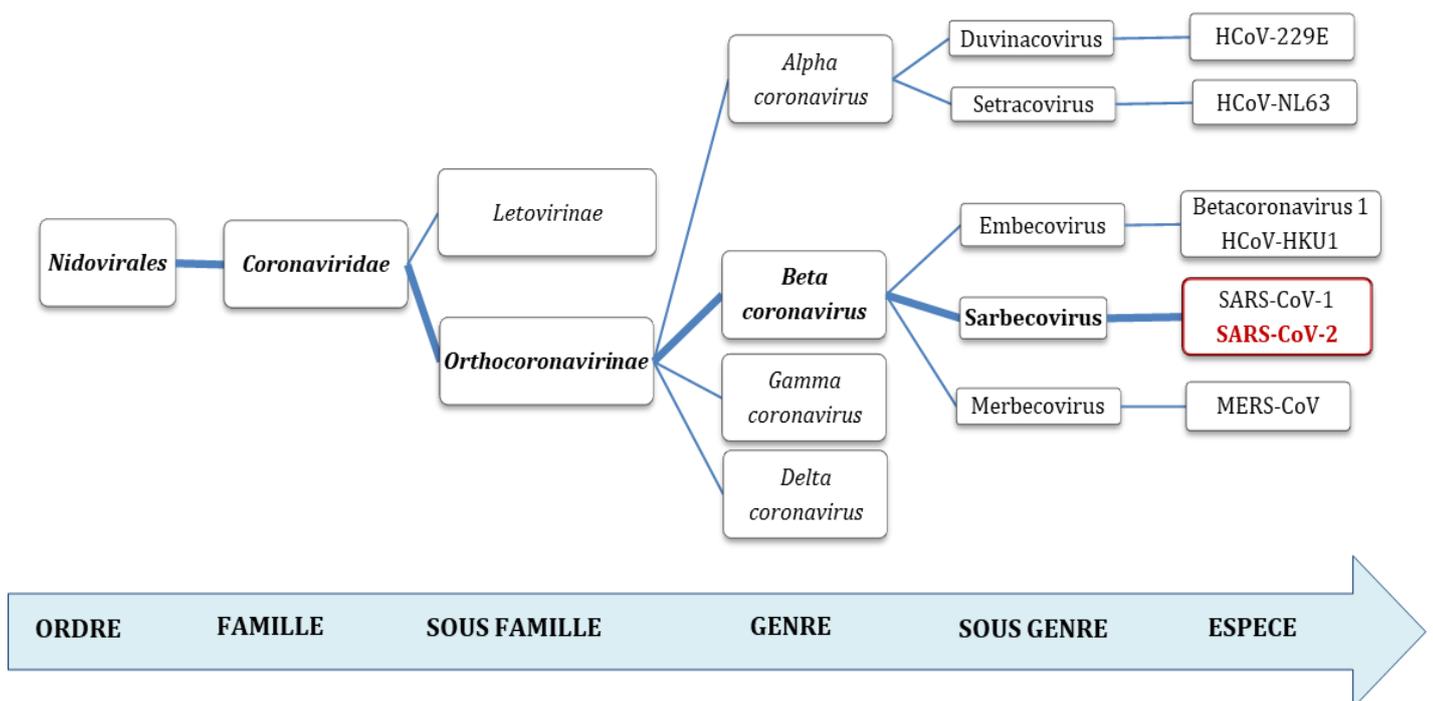


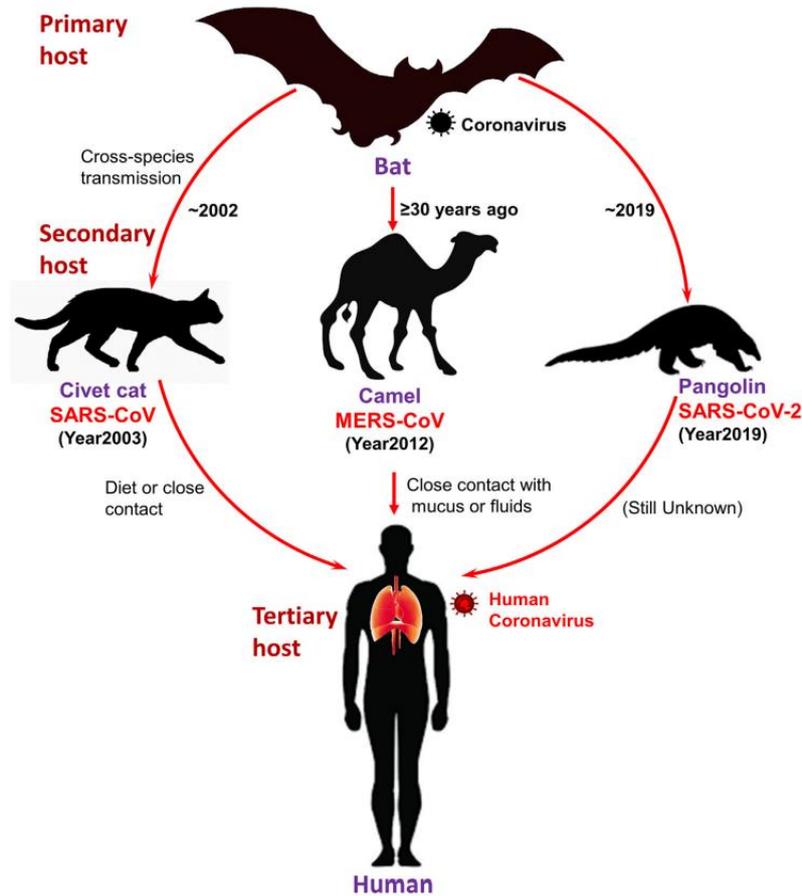
Figure 1 : Place du SARS-CoV-2 dans la classification taxonomique des coronavirus responsables d'infections humaines, selon l'ICTV.

## **b. Découverte du SARS-CoV-2**

Le SARS-CoV-2 a été découvert pour la première fois en décembre 2019, dans la ville de Wuhan, province de Hubei en Chine, chez des patients présentant des pneumopathies sévères inexplicables (2). Ce virus, initialement appelé nCoV-2019 (5), puis SARS-CoV-2 par le comité international de taxonomie des virus (6), s'est rapidement répandu dans le monde entier au cours des premiers mois de l'année 2020. Après le SARS-CoV-1 en 2002 en Chine, puis le MERS-CoV en 2012 dans la péninsule arabique, responsables de syndrome de détresse respiratoire souvent mortels, il s'agit de la troisième menace sanitaire mondiale liée à un coronavirus en moins de vingt ans (7). Le 11 février 2020, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) attribua le nom de COVID-19 (*CO*rona*V*irus *D*isease 2019) (8) pour désigner la maladie causée par le SARS-CoV-2. Un mois plus tard, le 11 mars 2020, la propagation et la sévérité du virus au niveau international, ont conduit l'OMS à déclarer le COVID-19 comme pandémie.

## **c. Origines de l'apparition du SARS-CoV-2**

La question de l'origine du SARS-CoV-2 n'a à ce jour pas été totalement élucidée. Plusieurs hypothèses ont été envisagées. L'une des hypothèses serait une origine zoonotique, d'une part via l'analogie du SARS-CoV-2 avec le SARS-CoV-1 et le MERS-CoV, et d'autre part à partir de comparaisons génomiques avec des coronavirus isolés chez les animaux. Il est admis que le SARS-CoV-2 appartient aux coronavirus dont le réservoir est la chauve-souris. Son génome présente 79% d'homologie avec le SARS-CoV-1 et 52% d'homologie avec le MERS-CoV (9,10). Le coronavirus dont il est le plus proche phylogénétiquement (96% d'homologie) est RaTG13-CoV (*Rhinolophus affinis*), un coronavirus isolé chez les chauves-souris (5). Pourtant, les lieux de vie des chauves-souris sont éloignés des communautés humaines, ce qui suggère que le passage inter-espèces a probablement nécessité un hôte intermédiaire (comme l'ont été respectivement, la civette palmée et le dromadaire, pour le SARS-CoV-1 et MERS-CoV (11,12)). Dans le cas du SARS-CoV-2, le pangolin, mammifère sauvage consommé notamment en Chine et dont la niche écologique recouvre celle des chauves-souris, pourrait avoir joué ce rôle (Figure 2). En effet, il a été isolé une souche de coronavirus chez le pangolin très proche phylogénétiquement (92 % d'homologie) (12,13).



**Figure 2 : Représentation schématique de trois coronavirus humains (SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 et MERS-CoV) et la transmission à l'Homme à partir de la chauve-souris, via des hôtes intermédiaires (14).**

Le SARS-CoV-2, comme le SARS-CoV-1, utilise l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 (ACE2 ou *Angiotensin-converting enzyme 2*) comme récepteur cellulaire principal afin de pénétrer dans la cellule hôte (5). Cependant, par rapport au SARS-CoV-1 et aux coronavirus de la chauve-souris, le SARS-CoV-2 présente une modification importante du domaine liant le récepteur ACE2. Ce domaine RBD (*receptor binding domain*) est situé sur la protéine S, au niveau de sa sous-unité S1 et est responsable d'un gain d'affinité pour son récepteur ACE2 (5,15,16). Ce domaine de liaison est retrouvé quasiment à l'identique (à un acide-aminé près) chez un coronavirus du pangolin (13,17). Ceci conforte l'idée que l'évolution du virus au contact du pangolin pourrait avoir favorisé le passage à l'homme, possiblement via la translocation du domaine de liaison (18). Cette anthrozoonose se serait produite en Chine, probablement au marché de Huanan, dans la mesure où la majorité des premiers cas de COVID-19 y ont été exposés fin 2019 (19). Néanmoins, l'analyse phylogénétique de virus isolés en Chine révèle qu'au moins deux souches différentes de SARS-CoV-2 étaient apparues plusieurs mois avant les premiers cas de COVID-19 décrits (20).

## B. Structure du virus

### a. Morphologie du virus

Le SARS-CoV-2 est un virus enveloppé formant une particule sphérique de diamètre 100-160 nm, composé d'une nucléocapside hélicoïdale, formée de la protéine de nucléocapside (N) complexée à l'ARN viral. Elle est protégée par une enveloppe bicouche phospholipidique dans laquelle sont ancrées plusieurs glycoprotéines de surface : la protéine Spike (S), la protéine de membrane (M) et la protéine d'enveloppe (E). De hautes projections formées de protéines de surface S associées en trimère, forment une large couronne à la surface du virus en lui donnant un aspect en forme de couronne en microscopie électronique, d'où sa dénomination «coronavirus » (Figure 3).

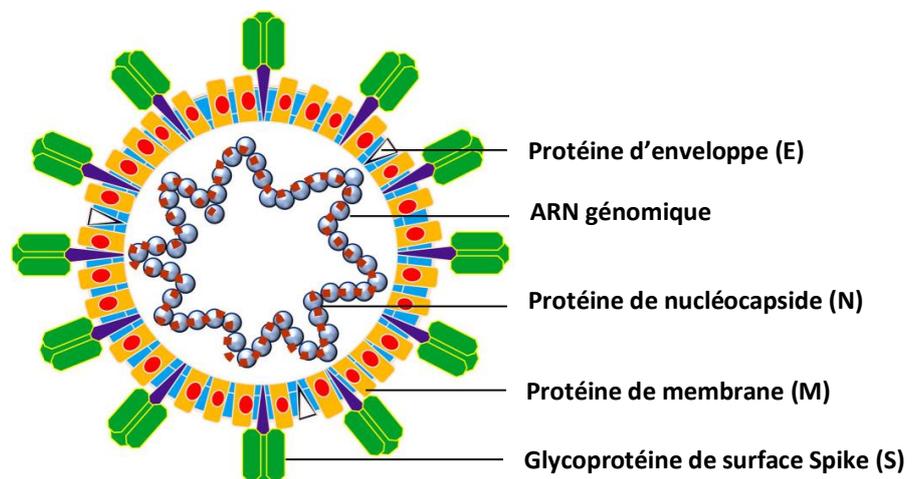


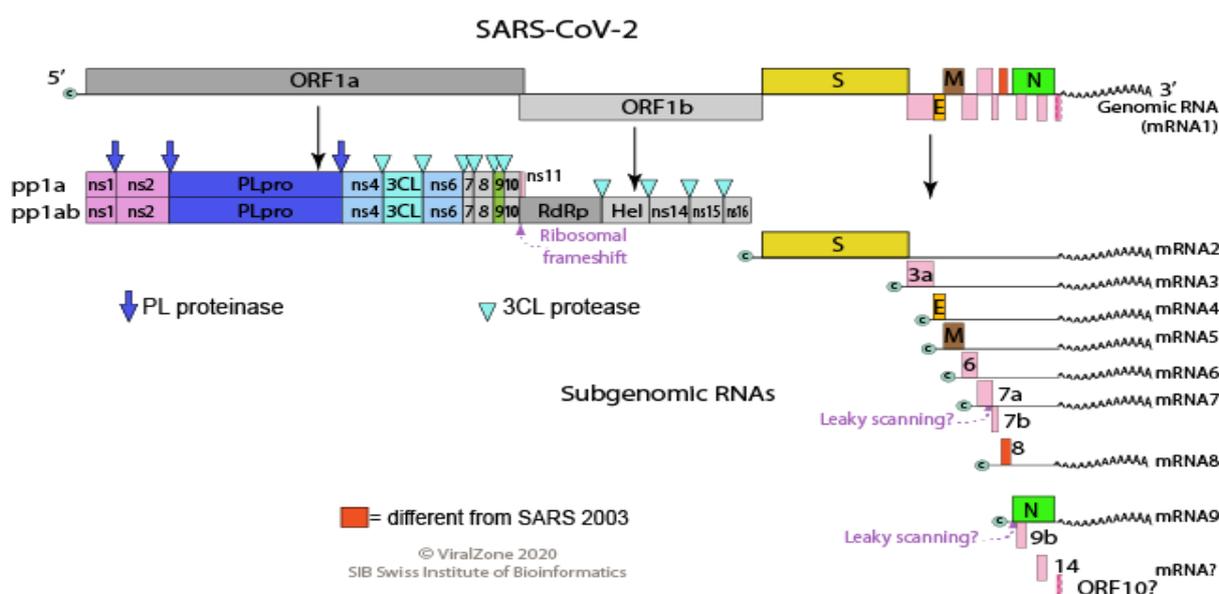
Figure 3 : Représentation schématique de la structure du SARS-CoV-2 (14).

### b. Organisation du génome

Le génome du SARS-CoV-2 est de grande taille, d'environ 29,9 kilobases, composé d'une molécule d'ARN monocaténaire, linéaire, non segmentée, de polarité *positive* (10). Il comprend deux régions non codantes aux extrémités 5' (une coiffe) et 3' (une queue polyadénylée). La partie codante est divisée en plusieurs sections (Figure 4) :

Les deux premiers tiers du génome sont composés de deux grands cadres de lecture ouverts ORF1a et ORF1b (*open reading frame*), qui sont de grandes régions chevauchantes codant

pour un vaste gène réplicase qui sera traduit en deux polyprotéines (pp1a et pp1ab). Ces deux polyprotéines seront par la suite auto-clivées en seize protéines non structurales appelées nsp (*non-structural proteins*). Pp1a code les protéines nsp1 à nsp11, et pp1ab, les protéines nsp1 à nsp16. Le clivage est réalisé grâce aux activités protéasiques de type papaine de deux protéines différentes, nsp3 et nsp5. Nsp3 clive les jonctions entre les nsp 1 à 4, tandis que nsp5 clive les jonctions entre les nsp 5 à 16 (14,21). Les protéines nsp produites s'assemblent ensuite entre elles pour former le complexe réplicase-transcriptase (RTC) indispensable à la réplication et à la transcription de l'ARN génomique viral lors de l'infection. Chacune des protéines nsp possède une activité précise, par exemple la protéine nsp12 (RdRp, *RNA dependent RNA polymerase*) est responsable de l'activité polymérase dépendante de l'ARN, alors que la protéine nsp14 est responsable de l'activité de relecture, permettant de corriger de potentielles erreurs insérées lors de la synthèse d'un nouveau brin d'ARN viral (22).



**Figure 4 : Organisation du génome du SARS-CoV-2, issue du site Viral Zone de l'Institut Suisse de Bioinformatique (SIB) (23).**

Le tiers restant du génome code essentiellement pour les protéines de structure du virus dont quatre glycoprotéines membranaires : la protéine de surface Spike (S) et les protéines de membrane (M) et d'enveloppe (E), ainsi que la protéine de nucléocapside (N). Six gènes codant des protéines accessoires, sont également insérés entre les gènes codant les protéines structurales. La majorité des fonctions de ces protéines accessoires sont encore mal comprises, mais elles semblent jouer un rôle très important dans la pathogénicité des coronavirus. En effet, une étude réalisée sur des virus mutants, n'exprimant qu'une partie de

ces protéines, révèlent leur implication dans l'atténuation de la réponse immunitaire innée de l'hôte, en inhibant la synthèse des interférons de type  $\beta$  (24), essentiels dans la lutte contre une infection virale.

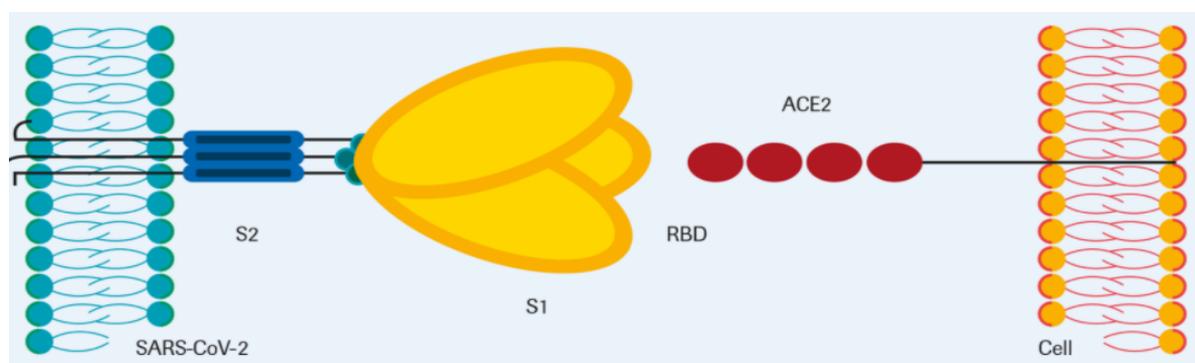
### c. Protéines structurales

#### **La protéine de surface S**

La première protéine structurale codée par le génome du SARS-CoV-2 est la protéine Spike (S) également appelée protéine de spicule (25). C'est une protéine fortement glycosylée de 180-200 kDa, qui s'assemble sous forme de trimères. Elle est ancrée à la surface de l'enveloppe virale par une partie transmembranaire et possède deux sous-unités S1 et S2 (Figure 5) :

- La sous-unité S1 interagit directement avec le récepteur ACE2 exprimé à la surface des cellules hôtes, via le domaine de liaison au récepteur (RBD) qui contient le motif de liaison au récepteur (RBM, *receptor-binding motif*) permettant la reconnaissance et la fixation au récepteur ACE2 (Figure 6). La sous-unité S1 contient aussi un domaine N-terminal (NTD, *N-terminal domain*).
- Le sous-unité S2 est constituée d'un peptide de fusion. Elle est activée par la liaison entre S1 et le récepteur ACE2 et contient les éléments nécessaires à la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de la cellule hôte.

De par sa localisation à la surface du virus, la protéine S est la principale cible des anticorps (Ac) neutralisants qu'une personne va développer à la suite d'une infection par le SARS-CoV-2. Ainsi, la protéine S joue un rôle important dans l'infection par le SARS-CoV-2 ainsi que dans l'induction des réponses des Ac neutralisants et des cellules T dans l'immunité protectrice.



**Figure 5 : Schéma simplifié représentatif de la structure de la protéine Spike et sa liaison au récepteur ACE2 via le domaine RBD (26).**

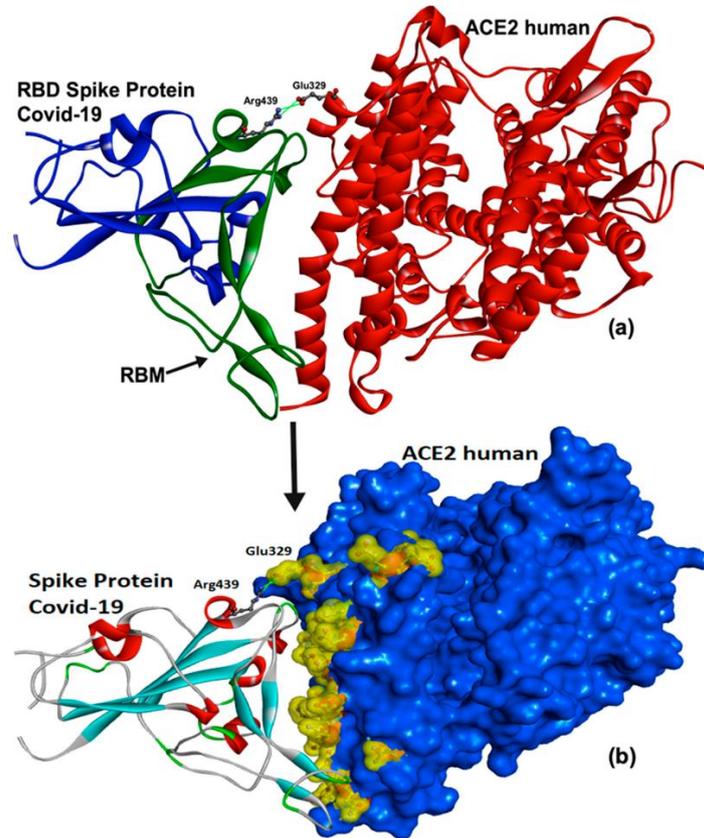


Figure 6 : (a) Structure du domaine de liaison RBD (ruban bleu) et du motif de liaison RBM (ruban vert) de la protéine Spike du SARS-CoV-2 au récepteur ACE2 de la cellule hôte (ruban rouge). (b) Site actif du récepteur ACE2 (en jaune) permettant l'interaction RBD-ACE2. L'interaction est stabilisée par une liaison hydrogène (lignes vertes) entre l'Arg 439 du SARS-CoV-2 et la Glu 329 de l'ACE2 (27).

### ***La protéine d'enveloppe E***

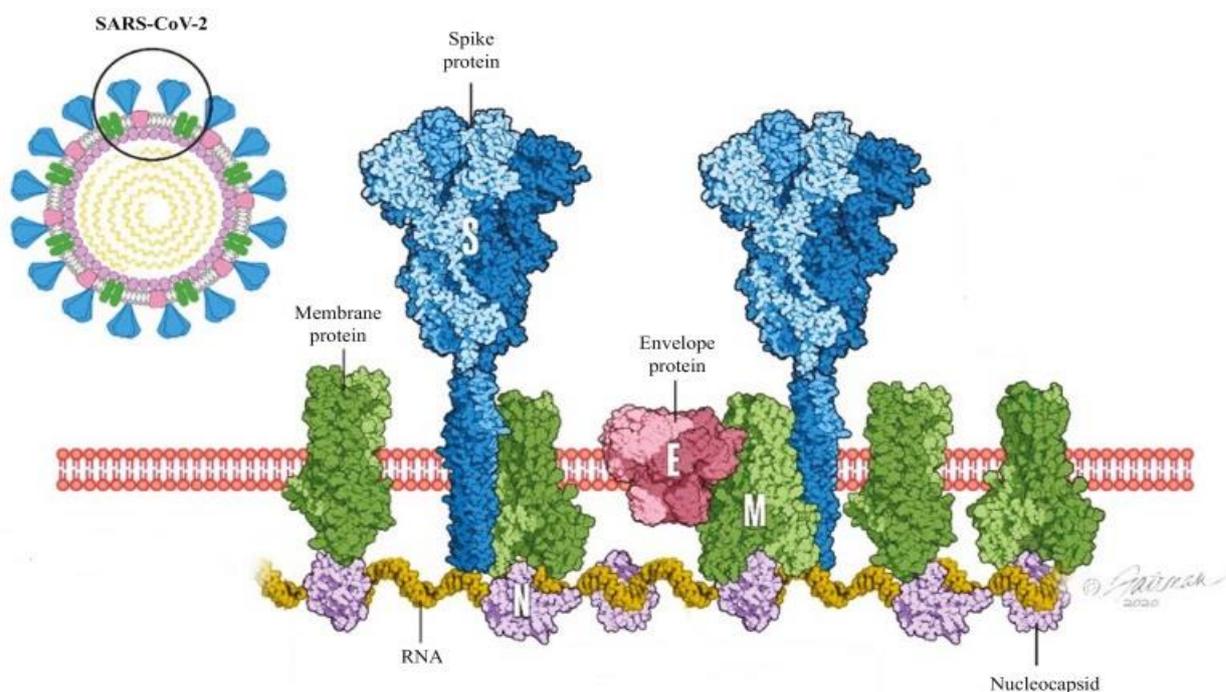
La seconde protéine structurale codée par le génome du SARS-CoV-2, est la protéine d'enveloppe E, petite protéine de 8 à 12 kDa. Elle se compose en N-terminal d'un court ectodomaine hydrophile, d'un long et unique domaine transmembranaire hydrophobe qui s'oligomérisent formant un pore dans la membrane, et d'un segment hydrophile en C-terminal, formant l'endodomaine. La protéine E est la moins abondante des protéines de l'enveloppe virale, mais n'est pas la moins importante. En effet, la découverte d'une activité de canal ionique suggère que cette protéine interviendrait dans la libération des nouveaux virions et semble également indispensable à l'assemblage de l'enveloppe virale. Plusieurs études ont montré que la protéine E, ainsi que la protéine M, étaient nécessaires pour produire des particules sub-virales (particules dépourvues de génome, mais qui ont les mêmes tailles et forment qu'une particule virale complète) (28).

### **La protéine de membrane M**

La protéine membranaire M est la troisième protéine structurale codée par le génome du SARS-CoV-2 et la plus abondante des protéines constituant l'enveloppe virale. C'est une protéine de 25 à 35 kDa qui possède au moins un site de glycosylation (N-glycosylation) localisé au niveau d'un très court ectodomaine N-terminal (29). Ce domaine est suivi de trois domaines transmembranaires, puis d'une longue séquence C-terminale intracellulaire qui représente plus de la moitié de la protéine. La protéine M est considérée comme le moteur de l'assemblage des particules virales. En effet, elle établit diverses interactions intermoléculaires avec les autres protéines de structure (M-S, M-E, M-N, M-M), essentielles à la formation de nouveaux virions ; les interactions M-M et M-E étant les plus importantes pour l'assemblage (Figure 7).

### **La protéine de nucléocapside N**

La quatrième et dernière protéine structurale codée par le génome du SARS-CoV-2 est la protéine de nucléocapside. C'est une phosphoprotéine de 43-50 kDa qui est associée à l'ARN génomique pour former la nucléocapside hélicoïdale (30). La protéine N est multifonctionnelle (31) et joue un rôle dans la protection, la réplication du génome et la transmission du génome viral, ainsi que dans l'assemblage du virion via des interactions avec la protéine M et l'ARN viral. Elle aurait également un rôle dans la transcription et la traduction du génome.



**Figure 7 : Schéma représentant les différentes protéines structurales du SARS-CoV-2 et leurs interactions (32).**

## C. Variabilités génétiques

Le SARS-CoV-2 possède une diversité génétique qui est la conséquence de plusieurs mécanismes (33) :

- des mutations ponctuelles (substitutions, délétions ou insertions) dues aux erreurs de réplication de la polymérase virale. Comme pour tous les virus à ARN, la réplication du SARS-CoV-2 n'est pas très fidèle et de nombreuses mutations apparaissent rapidement avec le temps. Cependant le taux de mutation est néanmoins inférieur à celui observé pour d'autres virus à ARN (virus de la grippe, virus de l'hépatite C par exemple), grâce à la relecture par l'exoribonucléase virale (nsp14) qui permet de corriger partiellement les erreurs introduites par la polymérase virale et diminuer le nombre de mutations (33,34).
- des recombinaisons entre deux lignées virales co-infectant le même hôte pouvant faire émerger des virus « mosaïques » (par exemple recombinant entre variants),
- des systèmes d'édition génomique de l'hôte par des adénosines-désaminases cellulaires, qui font partie de l'immunité naturelle de l'hôte et pourrait également contribuer à la variabilité génétique virale.

Seules les mutations ponctuelles les plus pertinentes, ayant entraîné l'apparition des variants seront abordées dans cette partie.

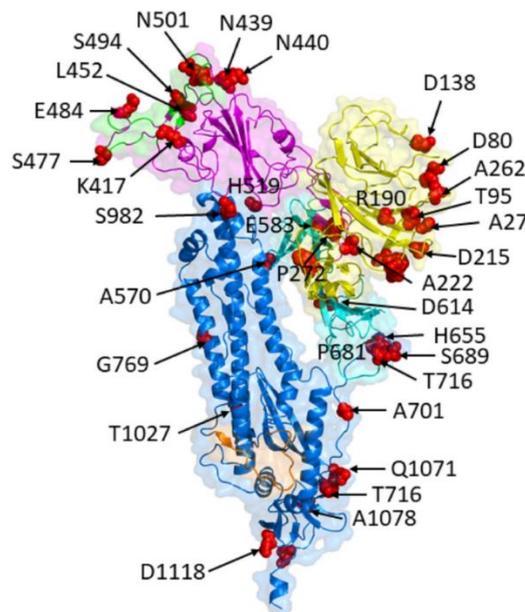
### a. Nomenclature

#### **Mutations**

Une mutation est la substitution d'une base de l'ARN par une autre (dans le cas des virus à ARN), au cours d'une erreur de réplication, aboutissant à la modification de l'acide aminé (AA) correspondant sur la protéine codée par le gène muté. Cette mutation peut aboutir à une substitution (remplacement d'un AA par un autre), une délétion (disparition d'un AA), une insertion (introduction d'un nouvel AA dans la protéine) ou une duplication (répétition anormale d'un AA). Dans le cas des variants du SARS-CoV-2, ces mutations sont essentiellement des substitutions. Par exemple, la mutation N501Y signifie qu'en position du 501<sup>e</sup> AA de la protéine S, une tyrosine (Y) a remplacé une asparagine (N). En suivant le devenir de ces mutations dans le temps (leur transmission, l'ajout de nouvelles mutations, etc.), on

obtient des « lignées » de virus. Sur ces lignées, un groupe de virus partageant un même ensemble de mutations est appelé « variant ». Lorsque suffisamment de mutations s'accumulent chez un variant au point que celui-ci commence à se comporter de manière particulière, on parle de « souche ».

La plupart des mutations qui apparaissent spontanément sur l'ensemble du génome du SARS-CoV-2 n'ont que peu ou pas d'incidence sur les propriétés du virus avec moins d'impact sur la progression et le contrôle de la pandémie. Cependant, certaines mutations peuvent affecter les propriétés du virus et influencer la facilité de propagation, la gravité de la maladie qu'il entraîne ou l'efficacité des vaccins, des traitements et des techniques diagnostiques. Ces mutations concernent principalement la protéine S, pièce centrale de la capacité du virus à infecter une cellule et, par son exposition à l'extérieur de l'enveloppe virale, elle est la cible de la réaction immunitaire, naturelle ou vaccinale. Les mutations les plus fréquentes de la protéine S sont répertoriées sur la Figure 8.



**Figure 8: Schéma répertoriant les mutations les plus fréquentes (en rouge) dans la protéine S du SARS-CoV2 déterminées par des méthodes de regroupement et d'alignement.** Les deux sous-unités de la protéine S sont S1, qui contient le RBD (magenta) et le domaine N-terminal (jaune), et S2 (bleu marine). Le site de liaison ACE2 sur le RBD est représenté en vert (RBM) et le peptide de fusion en orange. La plupart des mutations à haute fréquence ont été détectées dans le RBD et le NTD (35) .

## **Variants**

L'OMS suit et évalue l'évolution du SARS-CoV-2 depuis janvier 2020. L'apparition, fin 2020, de variants qui présentaient un risque accru pour la santé publique mondiale a conduit à caractériser des variants à suivre (*Variant of interest*, VOI) et des variants préoccupants (*Variant of concern*, VOC), afin de hiérarchiser les activités de surveillance et de recherche au niveau mondial contre la pandémie de COVID-19 (36).

D'après l'OMS, un VOI est un « variant qui présente des modifications génétiques dont on sait qu'elles affectent ou dont on prévoit qu'elles affecteront les caractéristiques du virus telles que la transmissibilité, la gravité de la maladie, l'échappement immunitaire, la capacité d'échapper au diagnostic ou au traitement et qui cause une transmission communautaire importante ou plusieurs foyers de COVID-19, dans plusieurs pays, entraînant une prévalence relative croissante et une augmentation du nombre de cas dans le temps, ou d'autres conséquences épidémiologiques observables qui font craindre un risque émergent pour la santé publique mondiale ».

De même, un VOC est un « variant qui répond à la définition du VOI et dont on a montré, qu'il est associé à un ou plusieurs des changements suivants :

- Une augmentation de la transmissibilité ou évolution préjudiciable de l'épidémiologie de COVID-19 ; ou
- Une augmentation de la virulence ou modification du tableau clinique ; ou
- Une diminution de l'efficacité des mesures de santé publique et sociale ou des outils de diagnostic, des vaccins et des traitements disponibles ».

Les VOC actuellement répertoriés par l'OMS figurent dans le Tableau 1, dont le dernier en date du 26 novembre 2021 est le variant Omicron.

D'autres outils sont également utilisés pour la nomenclature de ces variants comme la classification Nexclade ou GISAID (*Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data*) qui propose une classification en clade (37) ou la nomenclature PANGO (*Phylogenetic Assignment of Named Global Outbreak*), plus dynamique, qui réalise une assignation de lignage permettant un meilleur suivi de l'évolution des variants (38).

Dénomination de l'OMS	Lignée PANGO	Lieu d'apparition	Date de désignation	Mutations d'intérêt de la protéine S (39)
Alpha	B.1.1.7	Royaume-Uni	18 décembre 2020	D614G, N501Y, P681H/R
Bêta	B.1.351	Afrique du Sud	18 décembre 2020	D614G, N501Y, K417N, <b>E484K</b> , A701V
Gamma	P.1	Brésil	11 janvier 2021	D614G, N501Y, K417N, <b>E484K</b> , H655Y
Delta	B.1.617.2	Inde	VOI : 4 avril 2021 VOC : 11 mai 2021	D614G, <b>L452R</b> , T478K, <b>E484Q</b> , P681R
Omicron	B.1.1.529	Plusieurs pays	VOC : 26 novembre 2021	

Tableau 1 : Variants préoccupants du SARS-CoV-2 répertoriés par l'OMS au 15/03/2022 (36).

## b. Les principaux variants du SARS-CoV-2

### **Premier variant**

Le premier variant décrit par rapport au virus d'origine isolé à Wuhan, a présenté la mutation D614G (substitution de l'acide aspartique par une glycine en position 614). Cette mutation au sein du RDB de la protéine S a été détectée en Europe dès Février 2020, lui conférant une transmissibilité accrue par rapport à la souche d'origine. En effet, les variants porteurs de la mutation D614G sont rapidement devenus les souches virales dominantes dans le monde entier (40). Des études ont montré que la mutation D614G est associée à des charges virales plus élevées, améliorant la liaison de la protéine S virale au récepteur ACE2 et augmentant l'infectivité (40,41). La quasi-totalité des souches en circulation après février 2020 portent cette mutation.

### **Variant Alpha (B.1.1.7)**

En décembre 2020, le Royaume-Uni a signalé un VOC du SARS-CoV-2, lignée B.1.1.7, qui est dénommé par l'OMS sous le nom de variant « alpha ». Ce variant probablement apparu en septembre 2020, est rapidement devenu le variant dominant en circulation au Royaume-Uni en quelques mois, puis a été exporté dans le monde entier (42). Il comprend 17 mutations dans le génome viral, dont huit dans la protéine S (43). Parmi ces mutations, N501Y dans le RBD améliore l'affinité de liaison du virus au récepteur ACE2 des cellules hôtes (43,44) et la transmissibilité du virus, et P681H est adjacent au site de clivage de la furine dans la protéine

S, qui est un déterminant clé de la transmission, permettant d'améliorer le potentiel fusogène de la protéine S et facilitant la diffusion tissulaire (45).

### ***Variant Bêta (B.1.351)***

Pendant la même période, en Afrique du Sud a été identifiée la lignée B.1.351, étiquetée variant « bêta » par l'OMS (46). Ce variant a ensuite été détecté dans d'autres pays, probablement en lien avec des voyageurs en provenance d'Afrique du Sud (47). Le variant bêta comprend neuf mutations dans la protéine S, dont trois sont situées dans le RBD (K417N, E484K et N501Y). Tout comme la mutation N501Y identifiée dans le variant alpha, les mutations E484K et K417N augmentent l'affinité de liaison à l'ACE2 humain, et la combinaison de ces trois mutations l'améliore d'avantage, induisant une infectiosité plus élevée (48,49).

### ***Variant Gamma (P.1)***

La lignée P.1, qui est le variant « gamma » selon l'OMS, a été détecté pour la première fois chez des voyageurs revenant au Japon depuis l'État d'Amazonas au Brésil en janvier 2021 (50). Ce variant abrite 10 mutations de la protéine S (51), et trois de ces mutations sont situées dans le RBD, similaire au variant bêta (L18F, K417N et E484K). Les mutations N501Y, K417N et E484K, qui se trouvent également dans les variants alpha et bêta, ont été associés à une affinité de liaison accrue à l'ACE2 humain ainsi qu'à une transmissibilité élevée (43,44,52).

### ***Variant Delta (B.1.617.2)***

En mars 2021, le ministère indien de la Santé a signalé pour la première fois un variant du SARS-CoV-2 avec des mutations importantes E484Q et L452R dans le RBD de la protéine S (53). En quelques mois, le variant a été détecté dans d'autres pays et a été nommé lignée B.1.617.2, et sous le nom de variant « delta » par l'OMS. Il a été désigné comme VOC, car sa transmissibilité a été évaluée comme étant au moins équivalente à celle du variant alpha (54). En peu de temps, le variant delta s'est rapidement propagé, et est devenu la souche la plus dominante dans le monde (55). Les mutations principales au sein de la protéine S incluent L452R, P681R et D614G. De plus, certaines séquences du variant delta peuvent avoir la mutation G142D. La mutation L452R peut stabiliser l'interaction entre la protéine S et le récepteur ACE2 de la cellule hôte, et ainsi augmenter l'infectivité (56,57). Bien que le résidu L452 n'entre pas directement en contact avec le récepteur ACE2, contrairement au résidu N501, L452 est positionné dans une poche hydrophobe du RBD de la protéine S, et la mutation

L452R peut provoquer des changements conformationnels qui favorisent l'interaction entre la protéine S et le récepteur ACE2. De plus, la mutation P681R, qui se trouve également dans le variant alpha, est située près du site de clivage de la furine et s'est avérée optimiser le clivage de la protéine S par la furine avec une transmissibilité potentiellement améliorée (54).

### ***Variant Omicron (B.1.1.529)***

Omicron a été découvert en Afrique du Sud début novembre 2021. Il a été désigné comme VOC le 26 novembre 2021 par l'OMS. Omicron contient un grand nombre de mutations précédemment documentées dans d'autres VOC, dont au moins 32 mutations dans la seule protéine S, par rapport aux 16 mutations dans la version delta déjà hautement infectieuse, ainsi que d'autres protéines nécessaires à la réplication virale telles que nsp12 et nsp14 (58). Ce taux de mutation dépasse les autres variants d'environ 5 à 11 fois dans le RBD de la protéine S. Ainsi, ce variant pourrait avoir une transmissibilité et une évasion immunitaire améliorées. Omicron peut réinfecter des individus précédemment infectés par d'autres variants du SARS-CoV-2 (59).

## ***D. Cycle viral***

Le cycle du virus dans la cellule se décompose en trois grandes étapes (Figure 9) : l'entrée du virus dans la cellule hôte, la réplication de son génome et la formation et la sécrétion de nouveaux virions.

### **a. Entrée du virus dans la cellule-hôte**

#### ***L'attachement du virus***

L'entrée du virus regroupe toutes les étapes allant de son contact avec la cellule hôte jusqu'à la libération de son génome à l'intérieur de la cellule. Afin de pénétrer dans la cellule, le SARS-CoV-2 utilise la protéine S pour reconnaître un récepteur cellulaire à la surface de la cellule, le récepteur ACE2. Comme expliqué précédemment, c'est le RBD contenu dans la sous-unité S1 de la protéine S qui porte l'activité de liaison au récepteur ACE2. Il est exprimé entre autres, à la surface des cellules pulmonaires, des pneumocytes de type II et des macrophages alvéolaires, ainsi que par les cellules endothéliales vasculaires du cœur. Il intervient dans la

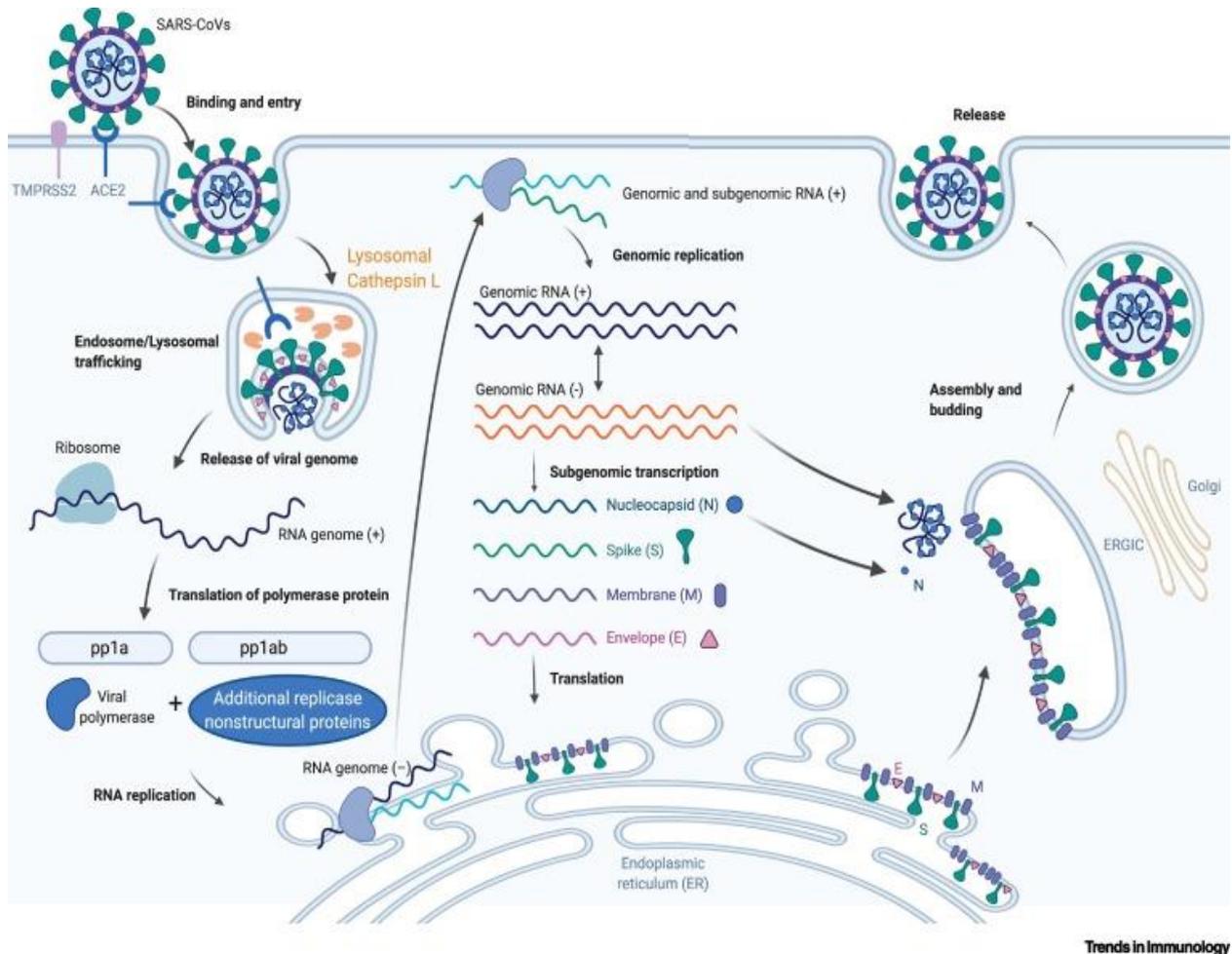
régulation de la pression sanguine, ce qui pourrait expliquer le plus haut risque des personnes souffrant de maladies cardio-vasculaires, comme l'hypertension, en cas de COVID-19 (60). En effet, l'ACE2 régule négativement le système rénine-angiotensine-aldostérone et agit comme une protéine de clairance de l'angiotensine II, qui a des effets vasoconstricteurs, pro-fibrosants, et pro-inflammatoires.

### ***La fusion des membranes***

Afin de délivrer son génome, le SARS-CoV-2 doit fusionner son enveloppe virale avec la membrane de la cellule cible. La fusion est initiée par la délivrance d'un signal d'activation, à la suite d'importants réarrangements conformationnels de la protéine S qui résultent de son clivage protéolytique par des protéases de la cellule cible. En effet, la liaison entre la sous-unité S1 et le récepteur ACE2 induit une modification conformationnelle de la protéine S permettant à la sous-unité S2 de s'insérer dans la membrane de la cellule cible. Ces modifications de la protéine S sont essentielles pour exposer le peptide de fusion et permettre deux voies d'entrée du virus, selon la protéase cellulaire utilisée :

- Une voie majoritaire et directe, qui implique la protéase membranaire TMPRSS2 (*transmembrane protease serine subfamily member 2*) qui va cliver la protéine S au niveau de la jonction S1/S2 et sur un autre site de S2, entraînant une fusion directement à la surface de la cellule (61).
- Une voie minoritaire, en absence de protéase TMPRSS2, permettant l'internalisation du virus dans le cytoplasme par endocytose. L'activation de la fusion entre le virus et l'endosome (la vésicule d'endocytose) qui le contient fera intervenir les protéases endosomales telles que les cathepsines ou la furine. Il a été montré que le SARS-CoV-2 possède un site de clivage furine (non présent chez les autres bêtacoronavirus) (62) qui permet un clivage des sous-unités S1/S2 dès la biosynthèse virale (63) et pourrait majorer le potentiel infectant du virus (64).

Le rapprochement et la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de la vésicule d'endocytose provoque la formation d'un pore par lequel la nucléocapside qui contient le génome viral, est injectée dans le cytoplasme de la cellule.



Trends in Immunology

Figure 9: Représentation schématique du cycle de réplication du SARS-CoV-2 (65).

## b. Réplication du génome

À la suite de la fusion qui aboutit au relargage de la nucléocapside dans le cytoplasme de la cellule infectée, l'ARN viral est libéré par décapsidation et va recruter les ribosomes de la cellule hôte afin d'utiliser la machinerie cellulaire pour se répliquer. L'ARN viral positif va servir de matrice pour synthétiser les deux polyprotéines pp1a et pp1ab qui formeront le complexe réplique-transcriptase (RTC, *replication/transcription complex*) après leur maturation.

### **Le complexe réplique-transcriptase (RTC)**

Le RTC initie les étapes de réplication successives de l'ARN génomique. Il permet d'une part de reproduire l'ARN viral positif. La réplication de l'ARN génomique repose sur la synthèse initiale d'un ARN intermédiaire de réplication, de polarité négative, qui sert ensuite de matrice pour la synthèse des ARN génomiques positifs de pleine longueur. Cette synthèse intermédiaire est réalisée par la nsp12 ou RdRp (*RNA dependent RNA polymerase*) qui est une

ARN polymérase ARN dépendante avec une activité exonucléase, assurant une meilleure fidélité avec une relecture de l'ARN synthétisé (66). Les réplicons ainsi constitués seront encapsulés dans les futurs virions. D'autre part, le RTC réalise la transcription de l'ensemble des ORF codant les protéines structurales et accessoires des nouveaux virions, sous la forme de petits brins d'ARN anti-sens appelés ARN messagers (ARNm) « sous-génomiques ». Ces ARNm sous-génomiques seront ensuite traduits par la machinerie ribosomale de la cellule hôte en protéines structurales et accessoires. Contrairement à la réplication de l'ARN génomique qui est un processus de synthèse continue, le mécanisme de transcription aboutissant à la synthèse d'ARN sous-génomiques de différentes longueurs selon la région transcrite, est discontinu et caractéristique des *Coronaviridae* (21,66).

### **c. Assemblage et formation de virions**

Les brins d'ARN synthétisés sont combinés avec la protéine structurale N pour former la nucléocapside. Les protéines S, M et E sont traduites simultanément et adressées au réticulum endoplasmique (RE) de la cellule où des groupements glycosides sont ajoutés aux protéines natives S et M, qui seront ensuite transportées par voie vésiculaire, vers le compartiment intermédiaire entre le RE et l'appareil de Golgi (ERGIC), site d'assemblage des coronavirus. C'est le lieu de multiples interactions protéiques et du bourgeonnement des nouvelles particules virales. Cette étape dans l'ERGIC est cruciale pour le bon assemblage des virions. Les particules virales néoformées fusionneront avec la membrane plasmique et seront libérées par exocytose dans l'espace extracellulaire afin d'infecter les cellules environnantes voire un nouvel hôte via les gouttelettes oropharyngées (14).

## **II. Infection par le SARS-CoV-2**

### **A. *Épidémiologie***

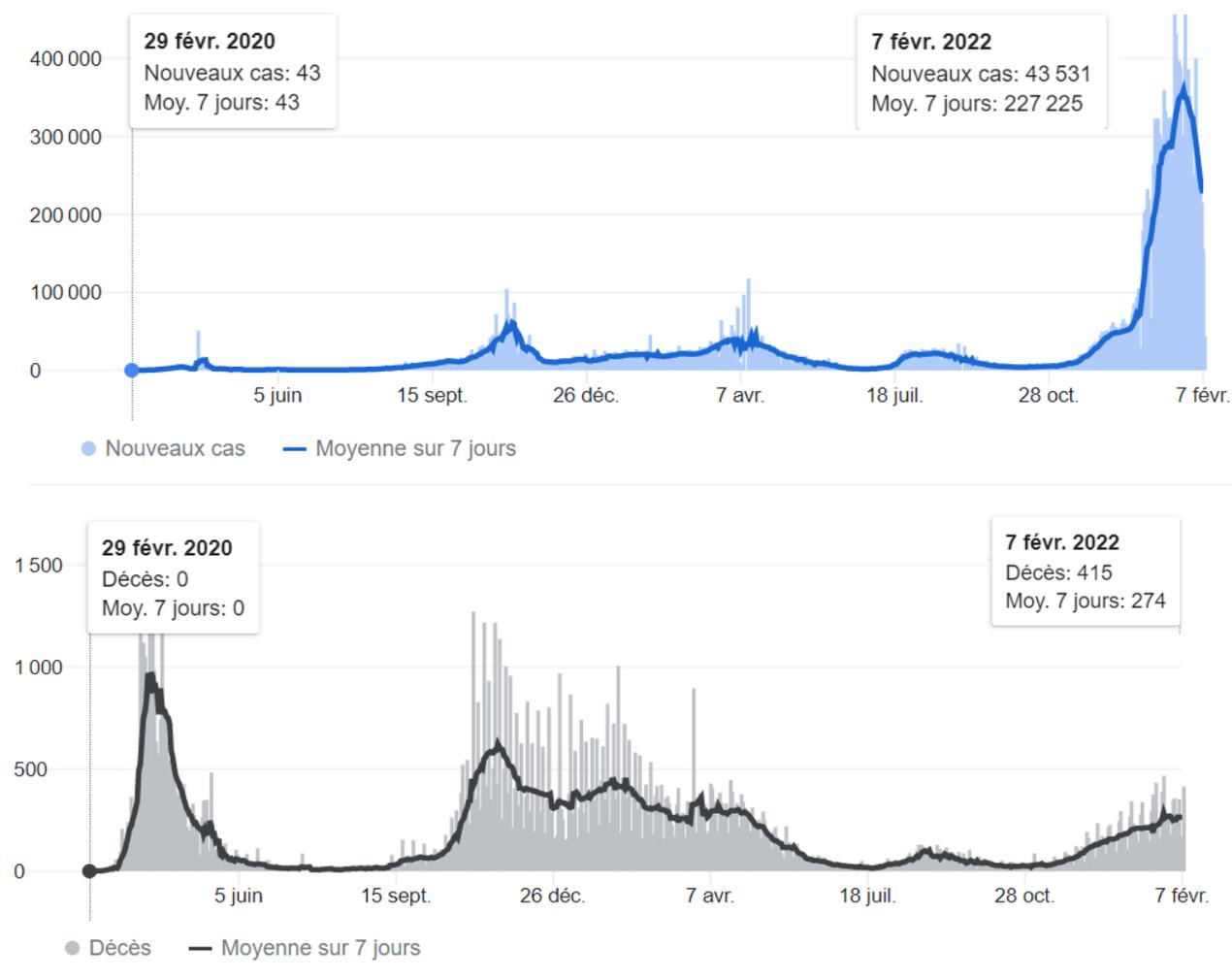
#### **a. Au niveau mondial**

La pandémie de SARS-CoV-2 qui a débuté en Chine fin 2019, s'est rapidement propagée au niveau mondial avec plus de 85 000 cas rapportés en Février 2020. Depuis Février 2020, le

Centre de Sciences et Ingénierie des Systèmes de l'Université Johns Hopkins (*Center for Systems Science and Engineering, JHU CSSE*) des Etats-Unis a développé une plateforme interactive en ligne, recensant les cas signalés de COVID-19 en temps réel, ainsi que le nombre de décès. Du début de la pandémie jusqu'en février 2022, plus de 382 millions de cas positifs au COVID-19 ont été recensés.

## b. En France

En près de 2 ans, l'incidence des infections COVID-19 a été multipliée par 10 000, avec plus de 43 500 nouveaux cas/jour en France au 7 février 2022 (Figure 10).



**Figure 10: Incidence des infections COVID-19 en France (haut). Nombre de décès liés aux infections COVID-19 en France (bas) entre le 29 février 2020 et le 7 février 2022. Source : JHU CSSE COVID-19 Data**

## **B. Transmission virale**

### **a. Modes de transmission**

Le SARS-CoV-2 se transmet depuis une personne infectée vers une personne non infectée essentiellement par voie aérienne, via l'émission de gouttelettes respiratoires. Ces gouttelettes chargées de particules virales pourraient infecter un sujet susceptible, soit par contact direct avec une muqueuse (transmission directe) soit par contact avec une surface infectée par les muqueuses nasales, buccales ou oculaires (67). Elles peuvent être projetées à plusieurs mètres de distance mais ne persistent pas dans l'air. Bien que le virus puisse survivre au moins trois heures après aérosolisation expérimentale (68), il n'existe à ce jour aucune donnée montrant la transmission par aérosols du SARS-CoV-2. En revanche, le virus peut survivre plusieurs jours sur des surfaces inertes (68).

Outre les prélèvements respiratoires, l'ARN viral a également été détecté dans les selles (64) et le sang (64,69–71) des patients infectés, faisant évoquer les possibilités d'une contamination sanguine ou oro-fécale, mais qui n'ont pas été démontrées à ce jour. L'isolement de l'ARN viral dans les urines reste à ce jour très peu décrit (69). Concernant l'existence possible d'une virémie, quelques cas suspects de transmission intra-utérine du virus ont été rapportés (72,73).

### **b. Période de transmission**

Il se déroule en moyenne 5 à 8 jours entre l'infection par le virus et la possibilité de le transmettre à un tiers, que l'on soit symptomatique ou non. Le risque de transmission est maximal à l'apparition des symptômes, mais il débute en moyenne 2 à 3 jours avant. Ce risque diminue ensuite progressivement à partir du 7<sup>e</sup> jour suivant l'apparition des symptômes. Il devient limité au-delà de 10 jours et exceptionnel après 14 jours. Ces durées ne sont toutefois que des moyennes et peuvent varier selon la lignée du virus considéré : globalement, plus les symptômes sont sévères et persistent, plus la possibilité de transmettre le virus se prolonge (Figure 11).

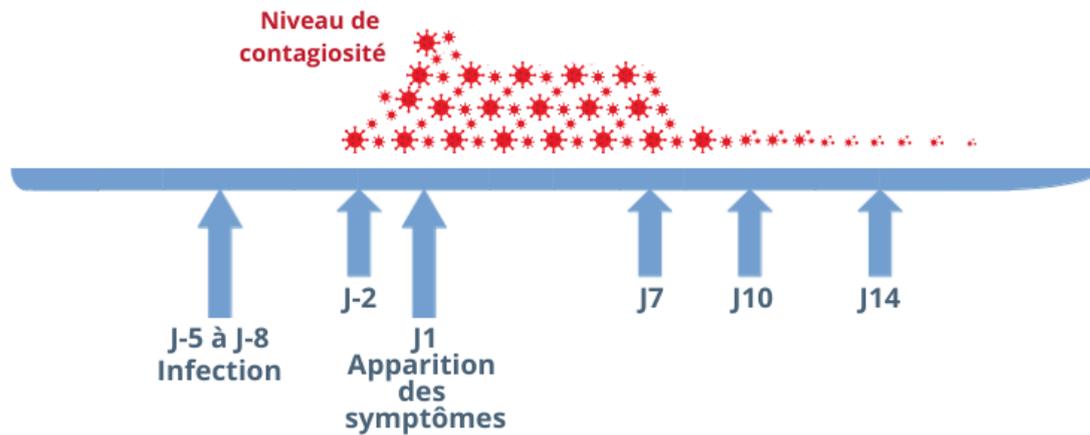


Figure 11 : Schéma représentatif de la période d'incubation du SARS-CoV-2 et l'apparition des symptômes (74).

## C. Manifestations cliniques

La symptomatologie clinique du COVID-19 est hétérogène, allant des formes asymptomatiques ou paucisymptomatiques, aux formes graves avec une détresse respiratoire pouvant se compliquer d'atteintes systémiques et multi-organiques, de défaillance multiviscérale et de choc septique, pouvant entraîner la mort.

### a. Les infections asymptomatiques

Une part non négligeable des personnes infectées par le SARS-CoV-2 ne développent pas de symptômes. Il est difficile d'évaluer exactement cette proportion, dans la mesure où aucun signe clinique ne permet de les identifier. Néanmoins, dans la littérature internationale, plusieurs méta-analyses suggèrent des proportions variables de patients infectés asymptomatiques. À titre d'exemple, une méta-analyse a fait état d'une estimation globale de 31 % de personnes asymptomatiques sur la base de sept études, portant sur des populations dépistées pour le SARS-CoV-2 (75). De même, une analyse de 79 études a montré qu'entre 17 et 25% des sujets infectés par le SARS-CoV-2 n'ont présenté aucun symptôme et sont restés asymptomatiques pendant toute la durée de l'infection (75). Une autre méta-analyse portant sur 28 études a révélé une variation importante de la proportion de personnes infectées asymptomatiques en population générale, au moment du test, estimée entre 20 et 75 % (76). De plus, au sein des cas contacts, la proportion de personnes asymptomatiques était comprise entre 8,2 % et 50 % (76).

## **b. Les infections symptomatiques légères à modérées**

Chez les patients qui deviennent symptomatiques, la nature et la sévérité des symptômes est variable. La plupart ne présentent qu'une forme bénigne (40%) ou modérée (40%) de la maladie, qui peut s'aggraver chez environ 15% des patients, nécessitant un apport en oxygène, alors que 5% présentent un état critique associé à des complications respiratoires, septiques, thrombotiques et à des défaillances d'organes (77).

Dans la forme symptomatique légère, les patients présentent les symptômes d'une infection virale des voies aériennes supérieures, dont les plus fréquents en début de maladie sont la fièvre, la toux, la fatigue (asthénie). Des symptômes non spécifiques ont également été décrits, notamment maux de gorge, congestion nasale, céphalées, diarrhées, nausées et vomissements, arthralgies, myalgies, anorexie, éruption cutanée (19). Certains signes comme la perte de l'odorat (anosmie) ou du goût (agueusie) ont été décrits comme précédant l'apparition des symptômes respiratoires (78–80) et sont des symptômes d'appel du COVID-19.

Dans les formes modérées de COVID-19, les symptômes respiratoires tels que la toux et la sensation d'un souffle court sont retrouvés (81). Certains patients ayant présenté initialement des manifestations cliniques légères, peuvent voir apparaître une aggravation de leurs symptômes durant la première semaine d'évolution de la maladie.

## **c. Les infections symptomatiques sévères**

La forme la plus sévère de COVID-19 est une pneumonie, caractérisée par une toux, une dyspnée et des infiltrats à la tomodensitométrie thoracique. Les patients présentent une dyspnée sévère, des signes de détresse respiratoire, une tachypnée (fréquence respiratoire > 30 cpm) et une hypoxémie ( $SpO_2 < 90\%$  en air ambiant), associés ou non à une fièvre, qui peut être modérée, voire absente. La complication majeure de la pneumonie à COVID-19, chez les patients atteints de forme sévère, est le SDRA, qui apparaît chez 20 % de ces patients après une médiane de 8 jours (82) et induit la mise en place d'une ventilation mécanique. Chez les patients hospitalisés pour des formes sévères de COVID-19, la moitié d'entre eux requière une supplémentation en oxygène par voie nasale, 30% nécessitent une ventilation mécanique non

invasive et moins de 3 % une ventilation mécanique invasive, que ce soit avec ou sans oxygénation par membrane extracorporelle (ECMO) (83).

L'OMS définit plusieurs niveaux de sévérité de l'infection à COVID-19 ainsi que des facteurs de risque de maladie sévère (19,84) :

- un âge supérieur à 60 ans (facteur de risque principal qui augmente proportionnellement avec l'âge)
- les maladies chroniques sous-jacentes : diabète, hypertension artérielle, cardiopathie, maladie pulmonaire chronique, maladies vasculaires cérébrales, démence, troubles mentaux, maladie rénale chronique (notamment le patient dialysé), l'immunosuppression, l'obésité et le cancer. Ces maladies ont été associées à une hausse de la mortalité.
- chez la femme enceinte : grossesse tardive, IMC (Index de Masse Corporelle) élevé, appartenance à une population non blanche, affections chroniques et affections spécifiques à la grossesse (diabète gestationnel, toxémie gravidique) (85)
- le tabagisme (86,87).

Une récente étude a montré que la sédentarité est associée avec un risque plus élevé de développer une infection COVID-19 sévère (88). Les patients inactifs contractant le COVID-19 auraient statistiquement plus de risque d'être hospitalisés et de décéder que les patients qui pratiquent régulièrement une activité physique.

#### **d. Les symptômes prolongés à une infection COVID-19 ou COVID-long**

Les symptômes prolongés du COVID-19 diffèrent des complications post hospitalisation. Ils sont définis par la persistance/résurgence des symptômes initiaux plus de 4 semaines après un épisode COVID confirmé par RT-PCR ou probable, et sans autre explication. Cela touche plus particulièrement les femmes, d'âge moyen estimé à 45 ans, ayant eu une forme modérée d'infection. On estime que plus de 10-20% des patients gardent des symptômes à 3 mois (89,90). En revanche, plus de 70% des COVID sévères gardent des symptômes à 3 mois post-hospitalisation (91), notamment au niveau pulmonaire (inflammation, fibrose, réduction capacité respiratoire), cardiaque (insuffisance, infarctus du myocarde), déconditionnement physique, neurologique. Il s'agit en majorité d'hommes âgés en moyennes de 61 ans.

Les symptômes prolongés sont multi systémiques et invalidants, évoluant de façon fluctuante sur plusieurs mois. Parmi les plus fréquents, sont reportés des troubles neurologiques (cognitifs, sensoriels, troubles du sommeil, irritabilité, céphalées), une asthénie, des troubles cardiothoraciques (dyspnée, tachycardie, douleurs thoraciques, toux), une anosmie/dysgueusie, des myalgies/arthralgies, des troubles digestifs (douleurs, gastralgies, gastroparésie, diarrhée ainsi que des troubles cutanéomuqueux et vasculaires (92). Des facteurs de risque de survenue des symptômes prolongés à la suite d'une infection COVID-19 ont été identifiés, dont l'hospitalisation et le nombre élevé de symptômes au cours de l'épisode initial.

### III. Immunité antivirale

Différents acteurs de l'immunité interviennent dans la lutte contre les infections virales. La Figure 12 résume schématiquement les principaux mécanismes de la réponse immunitaire suite à une exposition au SARS-CoV-2.

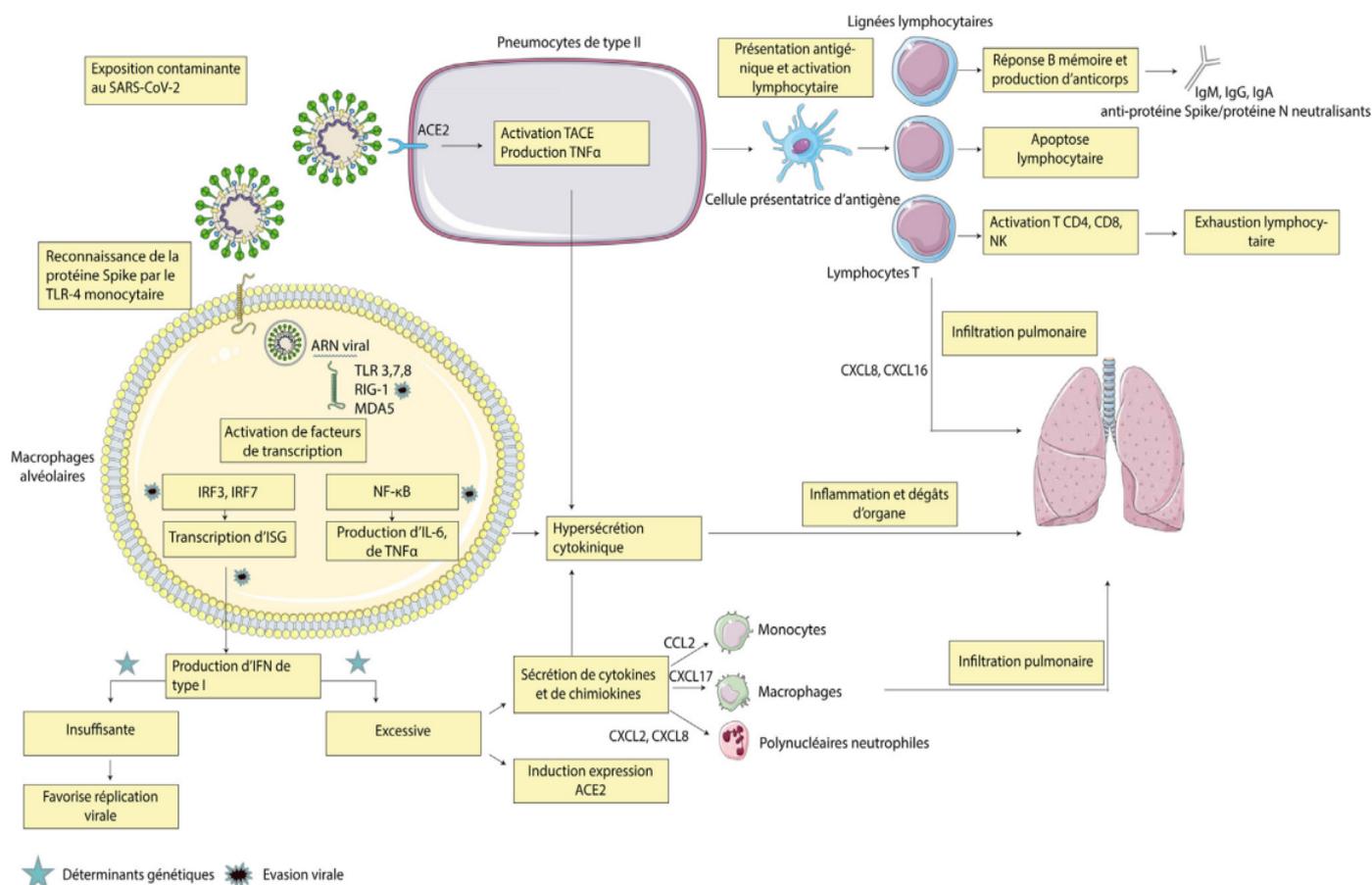


Figure 12 : Représentation schématique des mécanismes de la réponse du système immunitaire suite à une exposition au SARS-CoV-2 (93).

## A. Immunité innée

L'immunité innée est la réponse immédiate du système immunitaire face à un agent pathogène. Elle est très rapide, non spécifique et indispensable pour mettre en place la réponse immunitaire adaptative (cellulaire et humorale). Sa mise en œuvre est un facteur pronostique de la maladie. En effet, une mise en place tardive majore le risque d'infection sévère, en particulier chez les patients immunodéprimés (94).

De façon générale, l'immunité innée repose sur la reconnaissance de signaux moléculaires portés par le virus. Ces signaux moléculaires perçus par des récepteurs présents sur les cellules immunitaires déclenchent des voies de signalisation qui entraînent la production de cytokines pro-inflammatoires, d'interférons (IFN) et de chimiokines (cellules dendritiques, macrophages alvéolaires). Ces molécules vont remplir diverses fonctions dans la réponse antivirale : l'induction d'un état antiviral, le renforcement des propriétés des barrières épithéliales, l'induction de la mort par apoptose des cellules infectées et le recrutement d'autres cellules immunitaires (cellules dendritiques, macrophages, monocytes, lymphocytes T, lymphocytes NK) pour amplifier la réponse innée et contribuer à l'initiation de la réponse adaptative ultérieure (95,96). D'autre part, le système du complément est également impliqué dans la réponse immunitaire innée via l'activation de ses différentes voies (voies classique, alterne et des lectines).

### a. Initiation de l'immunité innée par les mécanismes de reconnaissance

Les cellules immunitaires innées expriment des récepteurs de reconnaissance des agents pathogènes appelés PRR (*Pattern Recognition Receptors*) qui reconnaissent des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs, *Pathogene-associated molecular patterns*).

Ces PRR comprennent (97) :

- Les récepteurs de lectine de type C (CLR, *C-like receptors*),
- Les récepteurs de type NOD (NLR, *NOD-like receptors*),
- Les TLR (*Toll-like receptors*),
- Les RLR (*RIG-I like receptor*) dont les récepteurs de type RIG-I (*Retinoic-acid inducible gene-1*) et MDA5 (*Melanoma differentiation-associated 5*).

Comme pour les virus à ARN, l'ARN du SARS-CoV-2 est reconnu par les PRR cytosoliques (RIG-I) et endosomaux (TLR 3, 7 et 8) (98). Cette reconnaissance induit le recrutement de protéines adaptatrices MyD88 (*Myeloid differentiation 88*) qui entraînent l'activation et la translocation des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B (*Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), AP-1 (*Activator protein 1*) et IRF3 et IRF7 (*Interferon Regulatory Factor*) dans le noyau, pour aboutir à la transcription de gènes codant pour les cytokines pro-inflammatoires, chimiokines et interférons de type I et III (99). De plus, le TLR3 peut être activé par l'ARN double brin, produit lors de la réplication virale, contribuant ainsi via la voie TRIF (*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$* ) à une réponse protectrice dans l'infection par le SARS-CoV-2. La détection du virus en cours de réplication se produit également par RIG-I et MDA5 qui à son tour recrute la protéine MAVS (*Mitochondrial antiviral signaling protein*) conduisant à la phosphorylation IRF-3 et IRF-7 nécessaire à l'expression des IFN (100). De même, les protéines de surface du SARS-CoV-2 notamment la protéine S est reconnue par les TLR 2 et 4 qui sont localisés à la surface des cellules hôtes. Ceci conduit *in fine*, via la portion intracellulaire de l'ACE2 à l'activation de la TNF $\alpha$ -converting enzyme (TACE), qui est responsable d'une sécrétion de TNF $\alpha$ . La reconnaissance de la protéine S par les TLR des monocytes entraîne également l'expression de NF- $\kappa$ B via MyD88 (Figure 13).

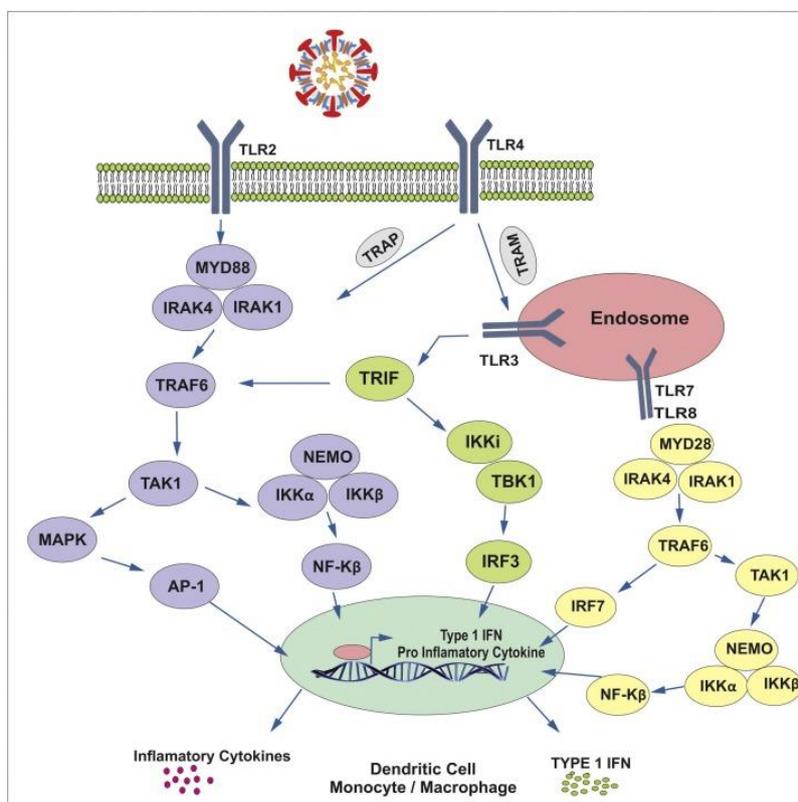


Figure 13 : Représentation schématique de la mise en place de l'immunité innée suite à une infection virale (101).

## b. Les interférons

Il existe trois groupes d'interférons : les IFN de type I (principalement IFN $\alpha$ /IFN $\beta$ ), de type II (IFN $\gamma$ ) et de type III (IFN $\lambda$ ).

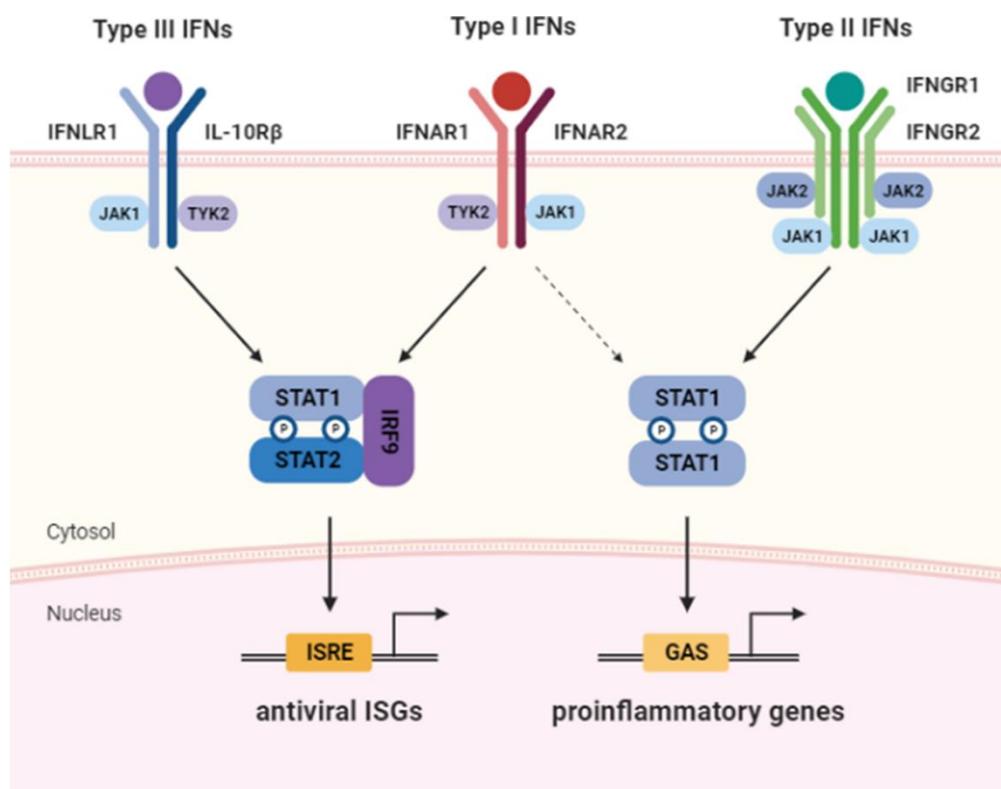
### ***Les interférons de type I et III***

Les IFN de type I et III ont une activité antivirale et sont produits par les cellules nucléées après une infection virale, ainsi que par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC), qui sont spécialisées dans la production d'IFN et qui peuvent aussi détecter la présence de virus en l'absence de réplication virale productive. Les IFN de type I et III produits par les cellules infectées se lient à leur récepteur hétérodimérique de surface respectif : IFNAR composé des sous-unités IFNAR1 et IFNAR2 pour l'IFN de type I, et IFNLR1/IL-10R $\beta$  pour l'IFN de type III (récepteur exprimé principalement sur les cellules endothéliales). La cascade intracellulaire est ensuite commune. La liaison des IFN active les kinases Tyrosine Kinase 2 (TK2) et Janus Kinase 1 (JAK1) associées aux récepteurs, qui permettent la phosphorylation des transducteurs de signaux et des activateurs de la transcription (STAT1 et STAT2). Les STAT phosphorylés forment avec l'IRF9 un complexe trimérique (ISGF3, *IFN-stimulated gene factor 3*), qui après translocation nucléaire, se lie aux éléments de réponse stimulés par l'IFN (ISRE, *IFN-stimulated response elements*) et initie la transcription de centaines de gènes stimulés par l'IFN (ISG, *IFN-stimulated genes*) (Figure 14). Ainsi les IFN de type I et III protègent les cellules hôtes en induisant l'expression de multitudes d'ISG codant pour des protéines interférant avec la réplication virale et réprimant directement la réplication virale via divers mécanismes, y compris l'inhibition de la transcription/traduction virale et la dégradation des acides nucléiques viraux, limitant à la fois la propagation du virus et la charge virale (100). Contrairement aux IFN de type III, les IFN de type I peuvent également signaler via des homodimères STAT1 et favoriser l'expression des gènes pro-inflammatoires.

### ***L'interféron de type II (IFN $\gamma$ )***

L'IFN de type II ou IFN $\gamma$  est principalement produit par les cellules NK et les cellules T helper 1 (Th1) et joue un rôle central dans la régulation de l'immunité innée et adaptative contre plusieurs pathogènes (102). L'IFN de type II se lie au récepteur composé d'IFNGR1 et d'IFNGR2 et favorise la phosphorylation de STAT1 via JAK1 et JAK2. STAT1 phosphorylé forme des homodimères, qui se lient aux séquences activées par les rayons gamma (GAS, *gamma-*

*activated sequences*) dans le noyau et induisent l'expression de gènes pro-inflammatoires (Figure 14) (102).



**Figure 14: Schéma représentant la cascade de signalisation des interférons dans l'infection par le SARS-CoV-2 (102).**

### ***Données sur les interférons chez les sujets infectés par le SARS-CoV-2***

La production d'IFN de type I semble insuffisante chez certains patients pour contrôler l'infection, favorisant ainsi la réplication virale. En effet, différentes équipes ont récemment montré que les formes sévères sont associées à un déficit de production d'IFN par l'organisme. Chez d'autres patients, en revanche, la sécrétion d'IFN-I semble trop importante, entraînant une hypersécrétion cytokinique et une augmentation de l'expression d'ACE2 sur les cellules épithéliales. Ces différences dans la réponse IFN à l'infection pourraient s'expliquer par des susceptibilités génétiques. Le traitement par l'interféron montre aussi des effets bénéfiques chez certains patients. L'interféron est une substance à activité antivirale, qui va stimuler les défenses naturelles de chaque cellule, en induisant la synthèse de protéines qui vont les protéger de l'infection. Une expression élevée des ISG dans les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) a été observée chez les patients COVID-19 légers ou asymptomatiques par rapport aux patients sévères. Cette expression est probablement liée à une production

précoce et importante d'IFN dans les poumons avec une diffusion ensuite dans la circulation sanguine où des taux plasmatiques élevés d'IFN $\alpha$  sont retrouvés (103). L'expression diminuée d'IFN de type I dans le sérum de patients COVID-19 sévères est généralement associée à des niveaux élevés de cytokines pro-inflammatoires. Le pouvoir pathogène du SARS-CoV-2 repose principalement sur la capacité du virus à entraver la voie INF et à stimuler en parallèle la production élevée de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires, telles que l'IL6. Ceci suggère que le SARS-CoV-2 a développé de multiples mécanismes efficaces pour faire pencher la balance en faveur d'un statut pro-inflammatoire interférant avec la production d'IFN (100).

### **c. Inflammation et cytokines pro-inflammatoires**

À la suite de l'infection par le SARS-CoV-2, il peut se produire deux types de réponse (95) :

- Une réponse immunitaire saine et adaptée avec un contrôle de la réplication virale, se traduisant par la clairance virale des cellules infectées et un tableau clinique non sévère.
- Une réponse immunitaire dysfonctionnelle ou déficiente avec une infiltration excessive des monocytes/macrophages et des lymphocytes T, pouvant conduire à un orage cytokinique et des lésions tissulaires graves.

#### ***Inflammation***

Les mêmes PRR engagés dans la production des IFN, dont les TLR peuvent également engager des voies de signalisation aboutissant à la production de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires. A l'inverse de la voie de synthèse des IFN, cette signalisation entraîne l'activation du facteur transcriptionnel NF- $\kappa$ B, qui après migration dans le noyau de la cellule, va entraîner la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires responsables d'une inflammation locale. Trois des cytokines pro-inflammatoires les plus importantes de la réponse immunitaire innée sont l'IL-1, le TNF- $\alpha$  et l'IL-6. Les macrophages tissulaires, les mastocytes, les cellules endothéliales et épithéliales sont la principale source de ces cytokines au cours de la réponse immunitaire innée.

Des récepteurs de la famille des NLR peuvent entraîner l'activation de l'inflammasome NLRP3. Cet inflammasome, par le biais de la protéase caspase 1, clive la pro-IL-1 $\beta$  et la pro-IL18 et permet la sécrétion d'IL-1 $\beta$  et IL-18 (104).

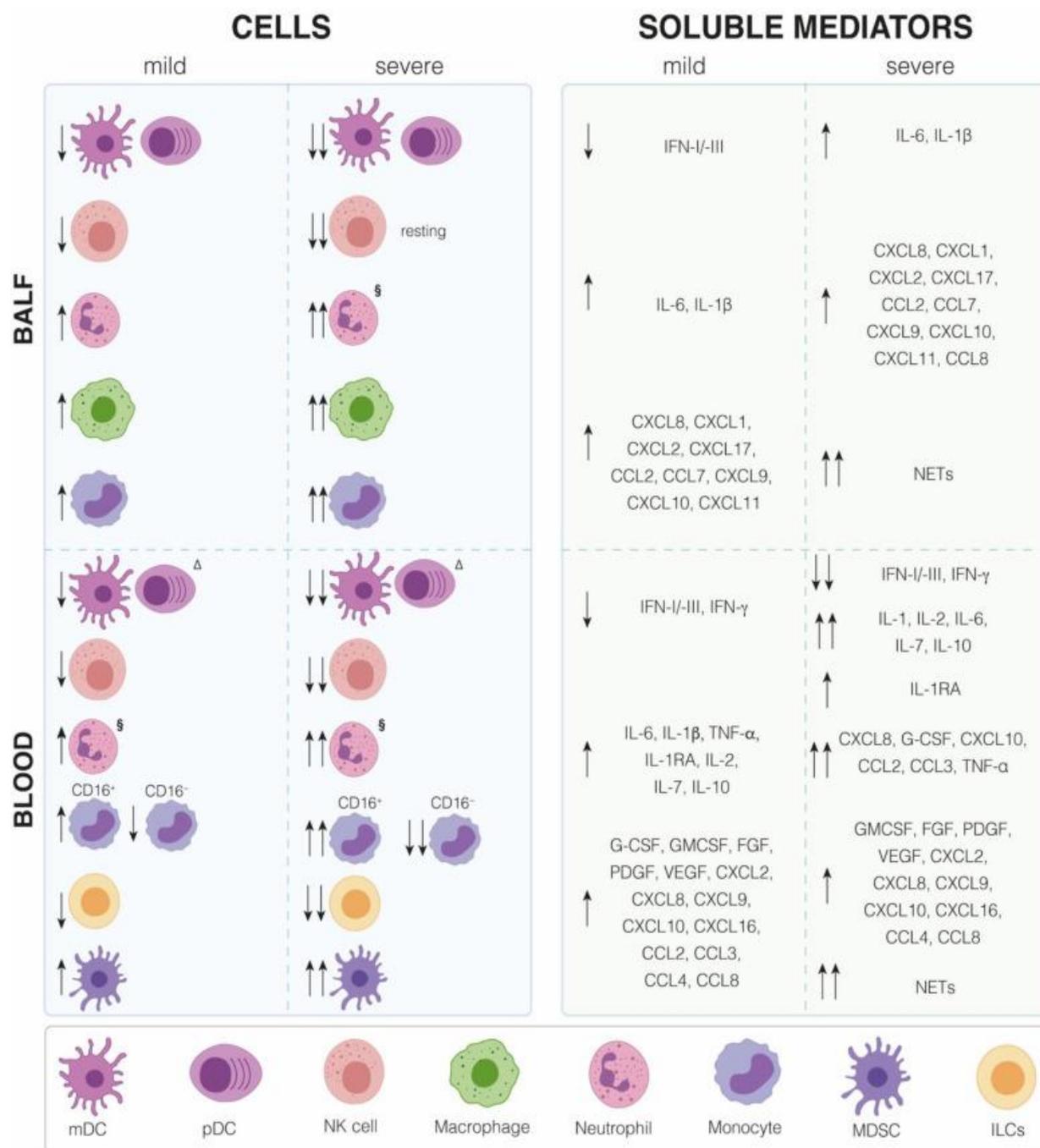
### ***L'orage cytokinique***

L'infection à SARS-CoV-2 peut entraîner une suractivation du système immunitaire en induisant une libération massive de cytokines pro-inflammatoires. Ce phénomène, connu sous le nom d'orage cytokinique, commence par une augmentation soudaine et aiguë des taux circulants de différentes cytokines pro-inflammatoires, notamment l'IL-6, l'IL-1, le TNF- $\alpha$  et par une faible production d'IFN de type I. Cela induit une réponse inflammatoire localisée mais qui se propage ensuite de manière systémique, contribuant au recrutement de cellules immunitaires (macrophages, neutrophiles, lymphocytes T) dans les tissus infectés avec des effets destructeurs au niveau local, résultant de la déstabilisation des interactions entre les cellules endothéliales, des dommages de la barrière vasculaire et des lésions des capillaires alvéolaires. Plusieurs cellules immunitaires activées, dont les lymphocytes T et B, les cellules NK, les macrophages, les cellules dendritiques, les neutrophiles, les monocytes et les cellules tissulaires résidentes (cellules épithéliales et endothéliales), contribuent à l'orage cytokinique au cours de l'infection COVID-19. Cet orage est souvent associé à un sepsis viral, un SDRA, une insuffisance respiratoire, un choc, une défaillance d'organes et finalement la mort (105). En effet, une libération contrôlée de cytokines joue un rôle clé dans la résolution de l'infection, mais des niveaux déséquilibrés de médiateurs pro-inflammatoires et antiviraux restent la principale cause de SDRA et de défaillance multiviscérale (95,106).

Plusieurs études ont montré que par rapport aux témoins sains, les patients infectés par le SARS-CoV-2 présentent des taux plasmatiques accrus de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-1 $\beta$ , l'antagoniste des récepteurs de l'IL-1 (IL1RA), l'IL-2, l'IL-6, l'IL-7, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , GM-CSF, G-CSF, le PDGF ainsi que plusieurs chimiokines (CCL2, CCL3, CCL4, CXCL10, CCL8, CXCL2, CXCL8, CXCL9 et CXCL16) (Figure 15). Une corrélation significative entre la gravité clinique de l'infection COVID-19 et les concentrations sériques d'IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-10, TNF- $\alpha$ , G-CSF, CCL2, CCL3, CXCL8 et CXCL10 a été rapportée (19,107–109). De plus, une autre étude complémentaire a non seulement confirmé que les patients atteints de COVID-19 sévère présentent des taux plasmatiques d'IL-6, d'IL-10 et de TNF- $\alpha$  significativement plus élevés que les cas bénins, mais également, que ces taux sont associés à une moins bonne récupération du COVID-19 et à une réduction et un épuisement fonctionnel des cellules T (110).

Parmi les cytokines et chimiokines surexprimées chez les patients COVID-19, l'IL-6 représente un biomarqueur précieux. En effet, les taux plasmatiques d'IL-6 chez les patients COVID-19

sévères sont corrélés à la charge virale et aux lésions pulmonaires, et son élévation est considérée comme le marqueur pronostique le plus robuste de mortalité, indépendamment des comorbidités (111). Une auto-amplification peut résulter de la voie de Th17. IL-6 active cette voie et lors de sa surexpression, elle délivrera de l'IL-6 à son tour. L'IL-1 $\beta$  et le TNF $\alpha$  augmentent la concentration de l'IL-6 (112).



**Figure 15: Distribution des cellules immunitaires et expression des cytokines et chimiokines chez les patients COVID-19 (100).** BALF : Liquide de lavage broncho-alvéolaire. BLOOD : Sang.

#### **d. Les principales cellules immunitaires innées dans la maladie COVID-19**

Plusieurs médiateurs cellulaires sont impliqués dans la réponse innée vis-à-vis du SARS-CoV-2, dont l'objectif final est l'élimination du virus avant sa propagation. Parmi ces acteurs cellulaires figurent notamment les monocytes, les macrophages, les polynucléaires neutrophiles (PNN), les cellules dendritiques (DCs) et les cellules NK. Nous passerons en revue ces divers médiateurs cellulaires participant aux réponses immunitaires innées ainsi que leur rôle dans la maladie médiée par le SARS-CoV-2.

##### ***Monocytes/macrophages***

Les monocytes et macrophages sont des acteurs majeurs du système immunitaire inné, et sont impliqués dans la physiopathologie de l'infection virale, soit directement en tant que cible virale par la reconnaissance du virus via leurs récepteurs ACE2, ou en tant que cellules productrices de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires. Lors du SDRA, un syndrome d'activation des macrophages, caractérisé par des macrophages hyperactivés par le SARS-CoV-2, est retrouvé de manière systématique (113). Cette preuve est en lien avec la découverte que le SARS-CoV-2 active les macrophages alvéolaires, spléniques et rénaux via l'ACE2 et améliore la sécrétion d'IL-6, de TNF- $\alpha$  et d'IL-10 (114), même en l'absence d'une réplication virale productive et de la génération de virions (115).

La présence de monocytes et macrophages présentant un phénotype pro-inflammatoire a été observée dans différentes localisations au cours du COVID-19 (116,117). La proportion de monocytes présentant ce phénotype majoritairement double positif CD14+/CD16+ augmente en fonction de la gravité de la maladie. Ce sous-type de cellules permet la synthèse d'IL6, TNF $\alpha$ , et d'IL10 à des niveaux importants (117). D'autres marqueurs comme la diminution d'expression du HLA-DR, ainsi que l'augmentation du marqueur PD-L1, attestent d'une altération de la présentation de l'antigène et d'un dysfonctionnement de la réponse immune (118). Dans le LBA, la concentration en macrophages est augmentée chez les patients graves. Le profil d'expression génétique est en faveur d'un phénotype M1, ayant un rôle inflammatoire puissant par la production exacerbée de cytokines/chimiokines chez les patients COVID-19 sévères. A l'inverse, chez les patients modérés ou légers, une augmentation du phénotype M2 est mise en évidence, marquée par une action réparatrice (119).

### ***Cellules dendritiques (DCs)***

Les cellules dendritiques (*DCs, Dendritic cells*) sont des cellules présentatrices d'antigène (CPA) professionnelles. Elles jouent un rôle clé dans l'activation des réponses immunitaires innées et adaptatives. Les DCs sont attirées lors de la présence du virus et permettent la synthèse d'IFN de type I et III. Dans les poumons, trois sous-types de DCs sont présents (120):

- Les cellules dendritiques conventionnelles de type 1 (cDC1) qui activent principalement une réponse Th1,
- Les cellules dendritiques conventionnelles de type 2 (cDC2) responsables de la régulation et de la production des chimiokines pro-inflammatoires,
- Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) qui sont le principal producteur de l'IFN de type I lors d'une infection virale (121).

Ces pDC subissent le plus de modifications lors d'une infection grave au SARS-CoV-2. Dans le LBA et le sang des patients COVID-19, le taux de pDC diminue ainsi que la fonctionnalité des pDC en termes de production d'IFN de type I, notamment l'IFN $\alpha$  (122). Il a été montré qu'en réponse à une infection virale, les pDC subissent une diversification phénotypique (123). Le phénotype correspondant aux pDC synthétisant les IFN de type I est représenté par les marqueurs PDL1+ et CD80-. Ce phénotype est augmenté chez les patients asymptomatiques, indiquant que les pDC sont fortement activés pour produire de l'IFN de type I lors d'une infection asymptomatique. A l'inverse, chez les patients sévères, ce phénotype diminue au profit d'un phénotype PDL1+CD80+. Ces variations justifient le déficit de synthèse d'IFN en cas de symptomatologie sévère (124).

### ***Polynucléaire neutrophiles (PNN)***

Les PNN sont recrutés sur le site d'infection lors de la réponse innée, par libération de chimiokines par les cellules résidentes du système immunitaire. La migration et l'infiltration des PNN engendre une forte réponse inflammatoire locale et une apparition de lésions tissulaires irréversibles. L'inflammation provoquée par les PNN est due à divers phénomènes : la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS, *reactive oxygen species*), la dégranulation des PNN et le phénomène de nétose, qui correspond à un mécanisme de mort via la formation de NETs (*Neutrophil extracellular traps*). Ces NETs sont des pièges extracellulaires en forme de toile, constitués de fibres d'ADN extracellulaire, d'histones, de protéines microbicides et de protéases. Le processus de nétose permet de détruire dans un environnement physiologique,

les bactéries et les virus. Cependant, en cas de SARS-CoV-2, cette exacerbation de nétose induit une inflammation majorée dans le LBA (lavage broncho-alvéolaire) et des phénomènes de thromboses (100).

Les PNN sont présents en grande quantité dans le LBA contrairement aux lymphocytes, notamment chez les patients COVID-19 sévères. En effet, par rapport aux personnes légèrement symptomatiques, les patients COVID-19 sévères sont caractérisés par un ratio PNN/lymphocytes élevé, qui est un marqueur d'inflammation et d'infection (107,125). De plus, les PNN des patients COVID-19 semblent posséder une capacité de présentation réduite de l'Ag, en raison de l'altération du HLA-DR et de l'augmentation de l'expression de surface de PD-L1 (126) et agissent comme un moteur d'hyper-inflammation via la production accrue de cytokines et d'une dégranulation cellulaire (126). Par conséquent, la forte réponse inflammatoire locale conduisant à une lésion tissulaire, est dépendante du recrutement des PNN, qui est médié par certaines chimiokines surexprimées à la fois dans le LBA et le sang, dont CXCL1, CXCL2, CXCL8, CXCL10, CCL2 et CCL7 (127–129). Il a été montré qu'une sous-population de PNN exprimant une signature ISG était fortement représentée chez les patients atteints de COVID-19 léger/modéré mais pas chez les patients atteints de COVID-19 sévère (130).

### ***Cellules NK (Natural Killer)***

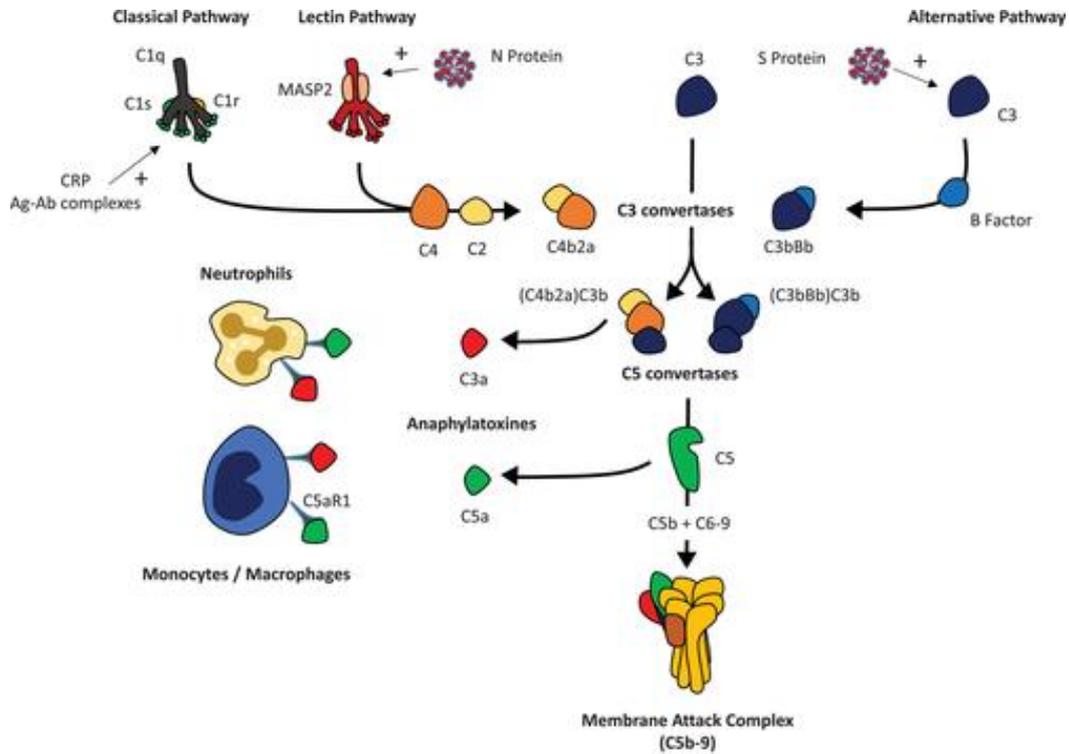
Les lymphocytes NK ont un rôle de reconnaissance et de destruction des cellules infectées par le virus, par le biais de perforines/granzymes ou par cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des Ac. Les cellules NK humaines sont divisées en deux sous-types cellulaires (131):

- Les cellules CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>dim</sup> faiblement cytolytiques, prédominantes dans les tissus et spécialisées dans la production de cytokines.
- Les cellules CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>bright</sup> qui lors de l'activation, présentent une puissante activité cytolytique et une expression majorée de récepteurs KIR (*killer-cell immunoglobulin-like receptors*) qui, avec le CD16, sont cruciaux pour les fonctions cytotoxiques des NK.

En plus de l'activité cytolytique, les cellules NK possèdent également des fonctions immunomodulatrices, capables de supprimer le processus inflammatoire déclenché par l'infection virale afin de limiter les dommages à l'hôte et la progression de la maladie (131). Chez les patients présentant un COVID grave, il a été observé une diminution du taux de lymphocytes NK CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>bright</sup> KIR<sup>+</sup> au niveau périphérique, suggérant soit une altération de la maturation des cellules NK, soit une augmentation du recrutement des cellules NK circulantes dans les tissus infectés (132). Ce déficit quantitatif altère la réponse cytotoxique des cellules NK. En effet, il a été montré que l'infection par le SARS-CoV-2 induit une altération fonctionnelle des cellules NK et influence leur activité cytotoxique en stimulant l'expression de leur principal récepteur inhibiteur : le récepteur NKG2A (133). Cette expression majorée de NKG2A est observée parallèlement à la diminution des marqueurs d'activation CD107a, INF $\gamma$ , IL2 et TNF $\alpha$  dans le sang des patients infectés par le SARS-CoV-2. L'altération quantitative et fonctionnelle des lymphocytes NK est inversement corrélée à la concentration d'IL-6, ce qui conduit à une activation accrue des cellules immunitaires innées avec une production massive de cytokines pro-inflammatoires (134). Ainsi, le phénotype acquis par les cellules NK au stade précoce de l'infection, délimite l'épuisement fonctionnel de l'activité cytotoxique et immunomodulatrice des NK et est corrélée à la progression de la maladie.

#### **e. Le complément**

Le système du complément fait partie des défenses de l'immunité innée. Il existe trois voies d'activation du complément (Figure 16) : la voie classique, la voie alterne et la voie des lectines. Ces voies clivent des zymogènes en cascade par le biais d'une C3 convertase et d'une C5 convertase avec pour finalité la formation d'un complexe d'attaque membranaire (CAM) et la libération d'anaphylatoxines (C3a et C5a). Le SARS-CoV-2 peut activer le complément par l'interaction entre la protéine de nucléocapside N et MASP2. Cette liaison active majoritairement la voie des lectines. La voie alterne sera préférentiellement stimulée par la protéine S du SARS-CoV-2 (135,136).



**Figure 16: Voies d'activation du système du complément (135).**

Le système du complément se place à l'interface entre l'immunité innée et adaptative. Il permet d'éliminer efficacement les virus via plusieurs mécanismes :

- L'opsonisation des virus et des cellules infectées (y compris leur lyse)
- L'induction d'un état immuno-inflammatoire antiviral, en stimulant les réponses immunitaires spécifiques au virus
- La neutralisation directe des virus.

Plusieurs données clinico-biologiques sont en faveur d'une hyperactivation du complément chez les patients COVID-19. Chez les patients sévères, une suractivation des voies du complément a été mise en évidence, avec une élévation des facteurs B, C3a, C5a et des facteurs composant le CAM (C5b-9), corrélée à la gravité clinique. Ces facteurs apparaissent à un stade tardif de la maladie. Le taux important de C3a se traduit par une consommation de C3 et la chute de sa concentration dans le sang périphérique. En effet chaque diminution de 1g/L augmente le risque de décès de plus de 7 fois, et l'augmentation de C3 diminue le risque de mortalité. Le facteur C4 diminue également montrant l'activation des voies classiques et des lectines dans les cas de COVID-19 grave. Un autre marqueur utilisé correspond à l'élévation des niveaux de C4d et de C5b-9 soluble, qui est associée au développement d'une

insuffisance respiratoire. La variation de ces marqueurs semble indépendante des différentes comorbidités et des complications retrouvées dans le COVID-19 (137,138).

En dehors des marqueurs solubles, des dépôts de fragments de complément ont été observés dans plusieurs organes chez des patients atteints du COVID-19, notamment dans des lésions pulmonaires ou cutanées. De plus, des anomalies endothéliales observées dans de nombreux organes dont les reins, les poumons, le cœur, l'intestin grêle et le foie, ont été associées à l'activation du complément. L'état d'hypercoagulabilité observé dans les infections sévères par le SARS-CoV-2 contribue probablement à la lésion endothéliale et à l'activation du complément. Cette hypercoagulabilité est différente de la CIVD (coagulation intravasculaire disséminée). Les caractéristiques de cet état sont un TP normal, un TCA et un taux de fibrinogène élevés, une numération plaquettaire normale ou augmentée, un taux d'antithrombine proche de la normale et une augmentation de la protéine C et du facteur VIII.

Il existe plusieurs mécanismes pouvant expliquer les lésions médiées par le complément pendant l'infection COVID-19 (Figure 17) :

- L'activation des PNN et l'induction de NETs
- L'hypercoagulabilité et l'hyper-inflammation (orage cytokinique)

L'activation du complément génère les anaphylatoxines C3a et C5a, et recrute des neutrophiles et des monocytes. Les PNN activés génèrent des NETs dans un processus connu sous le nom de nérose, qui contiennent des composants tels que C3, la properdine (P) et le facteur B (B) qui activent la voie alterne du complément et engagent une boucle de rétroaction inflammatoire. Bien que les NETs aident à la défense de l'hôte contre les agents pathogènes, une réponse soutenue, comme celle observée dans le COVID-19, peut provoquer une inflammation continue et un état d'hypercoagulabilité. De plus, le CAM induit également une inflammation endothéliale et des lésions tissulaires, conduisant à la génération d'IL-6 et d'IL-1 $\beta$ , qui continuent à propager la nérose.

De telles interactions entre les lésions endothéliales, l'hypercoagulabilité et l'activation du complément provoquent des lésions tissulaires graves, telles que le SDRA, des lésions rénales aiguës (insuffisances rénales aiguës) et des accidents vasculaires cérébraux, et sont souvent associées à une microangiopathie thrombotique.

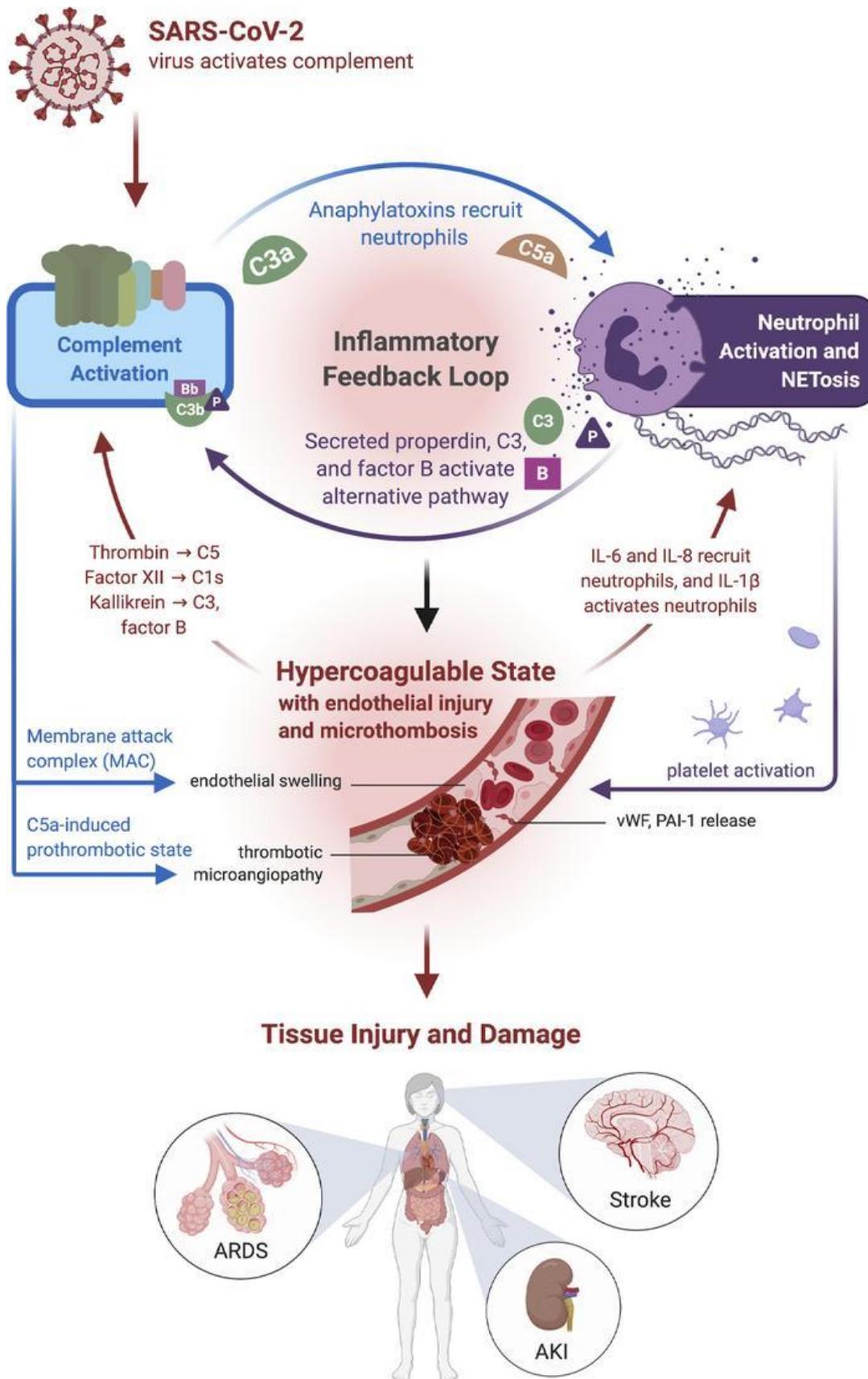


Figure 17: Boucle d'inflammation médiée par l'activation exacerbée du complément par le SARS-CoV-2 (139).

## **B. Immunité adaptative**

La réponse immunitaire adaptative vis-à-vis du SARS-CoV-2 interagit avec la réponse innée afin de contrôler l'infection virale. Cette immunité est composée d'une part de l'immunité à médiation cellulaire impliquant principalement les lymphocytes T (CD4 et CD8) dont le but est d'éliminer les cellules infectées, et d'autre part, l'immunité à médiation humorale qui implique les lymphocytes B (LB) pour permettre la production d'anticorps spécifiques dirigés contre le SARS-CoV-2. Cette réponse immunitaire adaptative participe à la guérison des patients infectés.

### **a. Réponse cellulaire à l'infection par le SARS-CoV-2**

Les LT sont les acteurs majeurs de la réponse antivirale de par leur capacité à éliminer les cellules infectées. Ce rôle est attribué aux LT CD8+ à action cytotoxique (CTL). Ces CTL sont capables de tuer les cellules infectées par un contact étroit avec elles. Les acteurs cellulaires importants dans cette réponse sont les LT CD4+, les LT CD8+ et les cellules présentatrices d'antigène (CPA).

#### ***Les cellules présentatrices d'antigène (CPA)***

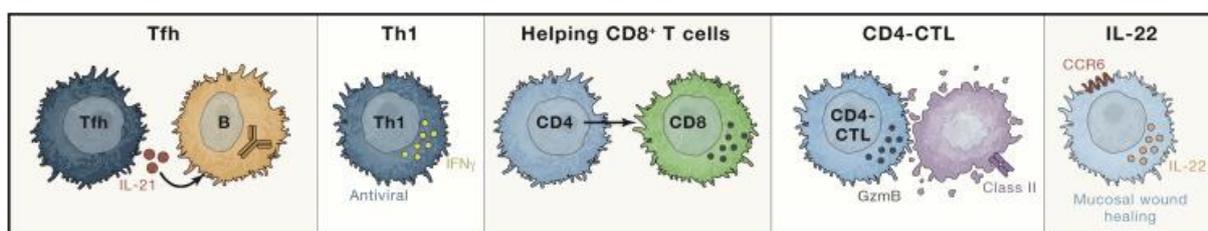
Les CPA sont composées des cellules dendritiques et des macrophages résidents. Suite à l'internalisation du SARS-CoV-2 via le récepteur ACE2, les CPA digèrent le virion sous forme d'antigène et débutent leur migration vers les ganglions lymphatiques pour la présentation du peptide antigénique. Les peptides viraux associés aux molécules de CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) de classe I et II sont présentés au TCR (*T-cell receptor*) des LT. Contrairement aux autres coronavirus hautement pathogènes, les protéines de spicule (S), de la nucléocapside (N) et de la membrane (M) sont présentées selon une même fréquence aux LT (140). D'une part, les antigènes S, N et M du SARS-CoV-2 peuvent être associés aux molécules de CMH de classe I afin de stimuler la prolifération et l'activation des LT CD8+ cytotoxiques. D'autre part, les antigènes associés aux molécules de CMH de classe II vont stimuler des LT naïfs ou Th0. Cette présentation antigénique permet l'activation et la polarisation des LT CD4+ helper vers la voie Th1 principalement. L'activation et la différenciation des LT sont médiées par la présentation de l'antigène et grâce à des facteurs de costimulation associés (141). En complément de la polarisation de la réponse immunitaire,

la présentation antigénique permet une prolifération lymphocytaire importante ainsi que la migration vers le site d'infection (142). Une fois arrivés sur leurs sites d'action, les LT auront différentes fonctions antivirales.

### **Les lymphocytes T**

Les LT CD4+ spécifiques au virus peuvent se différencier en plusieurs types de cellules distinctes en réponse à l'infection à SARS-CoV-2 et présenter une gamme de fonctions auxiliaires et effectrices. Celles-ci incluent (Figure 18) :

- les cellules Tfh (*T follicular helper*), qui aident les cellules B pour la maturation d'affinité et la production d'anticorps.
- les LT CD4+ avec une polarisation Th1, qui ont des fonctions effectrices antivirales directes via la sécrétion de cytokines (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  et IL-2) et le recrutement de cellules de l'immunité innée. Ils sont capables d'activer la réponse des LT CD4+ cytotoxiques.
- les LT CD4+ qui aident les LT CD8+ à proliférer et à se différencier.
- les T CD4+ cytotoxiques (CD4-CTL) sont des lymphocytes capables de sécréter des perforines et granzymes, ayant une activité cytotoxique directe contre les cellules infectées par le virus d'une manière restreinte à la présentation de l'antigène de classe II. Néanmoins, ils semblent peu actifs, comme le montre le faible taux du marqueur de dégranulation CD107a.
- les cellules T CD4+ qui produisent l'IL-22, ayant une fonction de cicatrisation des plaies et de réparation du tissu pulmonaire (94).



**Figure 18: Fonctions des lymphocytes T CD4+ dans le COVID-19 (94).**

Les LT CD8+ cytotoxiques (CTL) sont essentiels à l'élimination de nombreuses infections virales, en raison de leur capacité à tuer les cellules infectées. Ils sont activés selon deux voies : par la présentation antigénique via les CPA et l'interaction CMH de classe I et TCR, ou directement par les cellules épithéliales infectées par le virus. Cette interaction permet la libération de protéines perforines et granzymes B qui ont une action lytique contre les cellules

infectées par le virus. Tout comme les LT CD4+, les CTL subissent majoritairement l'apoptose ou se différencieront en LT CD8+ mémoires.

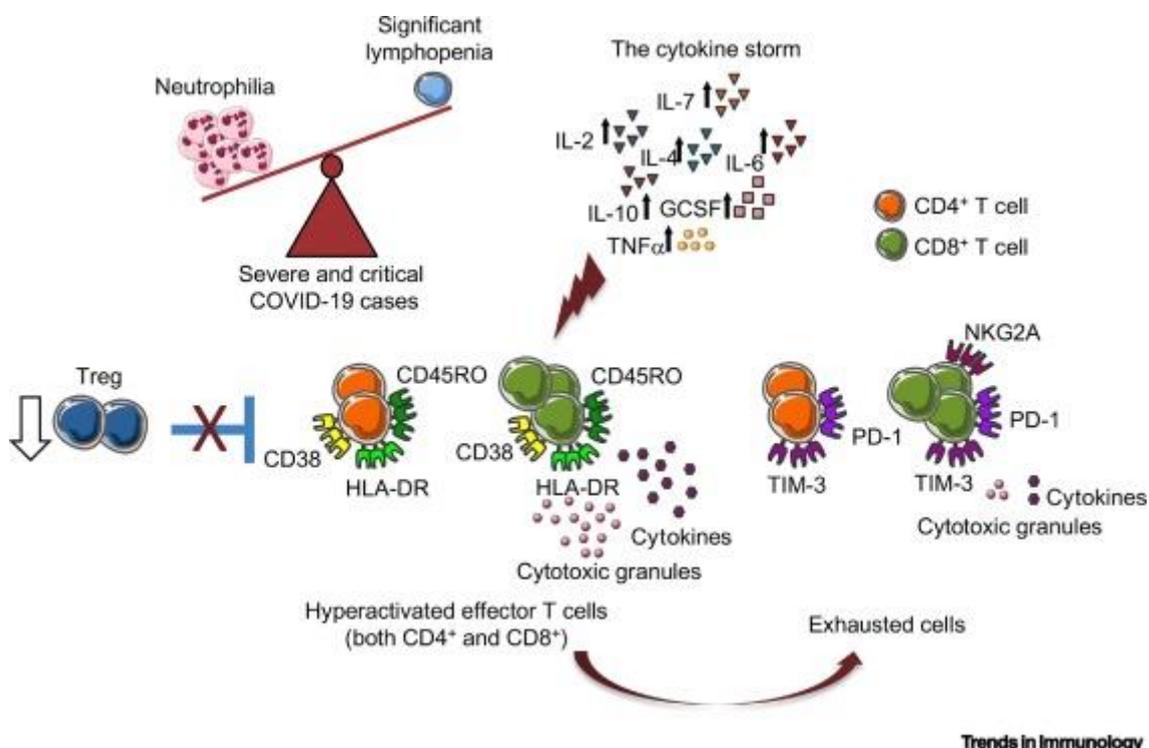
### ***Lymphopénie et épuisement lymphocytaire***

Une lymphopénie T CD4+ et T CD8+ est retrouvée chez les patients COVID-19 (82). Elle est plus importante chez les patients avec des formes sévères de la maladie et est associée à la survenue du décès (84). Cette lymphopénie s'étend sur les populations CD4+ (naïve, mémoire, régulatrice), CD8+ et NK, sans déséquilibre du ratio CD4/CD8, et s'associe à l'expression de gènes pro-apoptotiques (103,107). Plusieurs hypothèses ont été proposées pour élucider les causes de cette lymphopénie :

- La présence du récepteur ACE2 sur les LT pourrait permettre l'entrée du virus dans la cellule avec l'induction d'un dysfonctionnement des LT, aboutissant à leur apoptose (143). De plus le taux de LT est inversement proportionnel à la quantité de cytokines pro-inflammatoires présentes dans le milieu.
- La destruction des organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions lymphatiques) et le taux élevé d'acide lactique pourraient entraver la production de LT majorant la cytopénie (144).
- Le recrutement et la séquestration de lymphocytes activés dans les poumons (119), l'induction de la mort cellulaire ou la dérégulation immunitaire (141,143), qui se manifeste soit par une immunosuppression, soit par une activation immunitaire excessive et un syndrome de relargage cytokinique caractérisé par une production accrue d'IL-6 qui a été corrélé à une gravité et une mortalité accrues dans le COVID-19 (143,145,146).

Les LT CD4+, CD8+ et les cellules NK présentent des marqueurs d'activation (HLA-DR, CD45RO et CD38) et des marqueurs d'exhaustion ou épuisement (PD-1, TIM-3, NKG2A) qui peuvent indiquer une hyperactivation/un état d'épuisement/un état non fonctionnel de ces cellules, avec une perte de leur multifonctionnalité, notamment en termes de cytotoxicité. Ils sont d'autant plus présents chez les patients sévères, pouvant entretenir l'infection (103,133) (Figure 19). En effet, une augmentation du niveau d'expression du récepteur NKG2A, connu pour être à l'origine de l'épuisement des cellules NK et T CD8+, est observée chez les patients présentant des formes sévères. La lymphopénie observée est toutefois réversible. Lors de la réponse cellulaire, les LT CD4+ atteignent leur pic environ une semaine après les premiers symptômes de l'infection et les LT CD8+ sont plus nombreux entre la première et la deuxième

semaine des symptômes, mais la réponse T CD8+ est plus modérée que la réponse T CD4+, à la fois localement et en périphérie. Cette réponse cellulaire dirigée contre les protéines structurales du virus, joue un rôle dans la protection à long terme contre l'infection par le SARS-CoV-2 (147).



**Figure 19: Réponse immunitaire aberrante et inefficace chez les patients atteints d'une infection sévère au COVID-19 (148).**

Chez les patients atteints de COVID-19 sévère, une augmentation du nombre de PNN et du rapport PNN sur lymphocytes sont observés. De plus, des concentrations importantes de cytokines ont été détectées dans le sang périphérique des patients sévères, avec une majorité synthétisée par la voie Th1 (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2) et des cytokines effectrices (IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17 et IL-22). Malgré cette sécrétion, les LT CD4+ multifonctionnelles sécrétant au moins deux des cytokines IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 sont diminués dans les cas graves (149).

Les cellules T ont un rôle dans la clairance virale, mais elles peuvent être à l'origine d'une immunopathologie en potentialisant l'effet inflammatoire. Divers mécanismes ont été mis en évidence, avec l'augmentation de T CD4+ polyclonales GM-CSF+. Le GM-CSF entraîne une inflammation pulmonaire induite par les cellules T et une auto-amplification de la réponse cytokinique. Cette induction majeure davantage l'hyper-inflammation induite par les cytokines. Le taux de lymphocytes GM-CSF+ est quantitativement proportionnel à la gravité de la

maladie. Cette molécule est un lien entre l'induction d'inflammation par les LT CD4+ par sécrétion d'INF- $\gamma$  et la libération d'IL-6 par les macrophages (142).

Bien que la réponse Th1 soit majoritaire, des cytokines provenant de la voie Th17 sont retrouvées. Cette lignée synthétise de l'IL-17, recrutant des monocytes/macrophages et des neutrophiles provenant de la circulation. Ce recrutement induit la libération d'IL-1 $\beta$  et IL-6 responsables de l'emballement de la réaction inflammatoire (150). Comme dans l'immunité innée, ces cytokines possèdent de larges propriétés inflammatoires et participent à l'orage cytokinique.

Enfin, le nombre de LT régulateurs CD4+ CD25+ et les LT  $\gamma\delta$  sont significativement diminués chez les patients sévères. Ces deux types de sous-populations lymphocytaires permettent respectivement de réguler l'inflammation et d'avoir des propriétés antivirales. Leur diminution pourrait entretenir l'inflammation déjà intense de l'orage cytokinique (145).

## **b. Réponse humorale à l'infection par le SARS-CoV-2**

### ***Mise en place de la réponse humorale***

La réponse humorale est initiée au niveau des muqueuses respiratoires par une interaction entre les LB naïfs et l'antigène (Ag) viral. Cette interaction va permettre l'activation et l'engagement des LB dans deux voies différentes (151) :

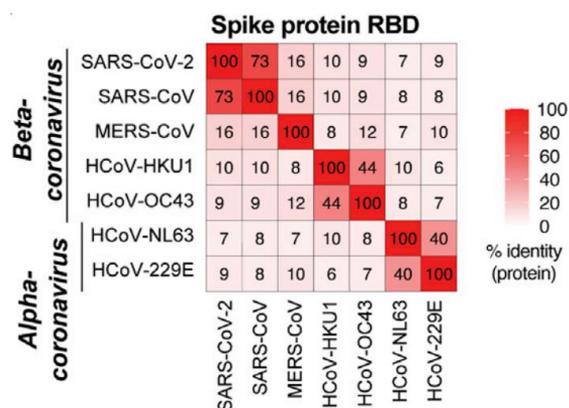
- Une voie folliculaire avec des LB activés qui vont migrer vers les centres germinatifs ou organes lymphoïdes secondaires avec une génération de deux types cellulaires : les LB mémoires circulants et les plasmocytes folliculaires à longue durée de vie. Cette voie comporte une présentation de l'Ag par les LT CD4, permettant une boucle d'hypermutation somatique, ce qui permet d'augmenter la spécificité et l'affinité des Ac produits par le LB. Plus l'infection progresse, plus les LB seront affins par rapport à l'Ag. Grâce à la commutation de classe, des IgG et IgA sont produites en majorité (152,153).
- Une voie extrafolliculaire, plus rapide, permettant une reconnaissance directe par les LB via le BCR (*B cell Receptor*) sans intervention des LT. Cette voie induit une action locale avec génération de LB mémoires et de plasmablastes (plasmocytes extrafolliculaires).

Cette voie comporte un faible taux d'hypermutation somatique, limitant la diversité génétique des Ac produits par le LB, avec en premier lieu une synthèse d'IgM. À la fin de cette voie, les plasmablastes à courte durée de vie sont remplacés par des centres germinaux folliculaires excréant majoritairement des Ac de type IgG et IgA (152).

Ces deux voies permettent d'expliquer l'apparition dans certains cas d'IgG et IgA en même temps que les IgM issus des plasmablastes de la voie extrafolliculaire. Malgré la lymphopénie, dont la diminution des LB au début de la maladie, une fréquence élevée de plasmablastes est retrouvée permettant la génération rapide d'Ac. La régression survient après 3 à 6 mois de convalescence (151).

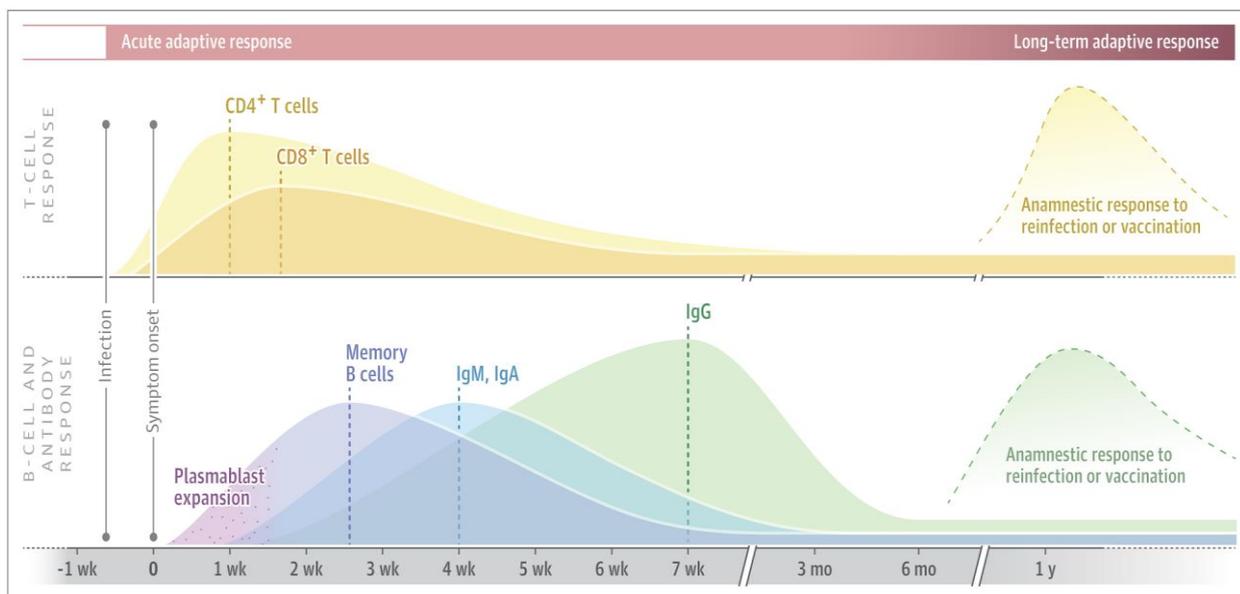
### ***Cinétique des anticorps***

Plusieurs protéines virales du SARS-CoV-2 peuvent induire une réponse humorale. Parmi les antigènes d'intérêt du SARS-CoV-2, le domaine de liaison RBD de la protéine S ainsi que la protéine de nucléocapside (N) ont été étudiés. De nombreuses équipes ont étudié la cinétique de ces Ac au cours de l'infection par le SARS-CoV-2. Dans l'étude de Wölfel menée sur neuf patients infectés, la séroconversion anti-S survenait en médiane à 7 jours, atteignant 100 % à 14 jours. Ces anticorps présentaient une réactivité croisée avec les autres coronavirus humains, notamment le SARS-CoV-1, de par l'homologie de séquence de la protéine S du SARS-CoV-2 (Figure 20) (64). De plus, une étude plus large rapportait l'apparition d'IgM et d'IgG anti-S aux 11e et 12e jours, respectivement (154).



**Figure 20: Analyse d'homologie de séquence du domaine RBD de la protéine Spike du SARS-CoV-2 par rapport aux autres coronavirus humains (155).**

La séroconversion anti-N semble plus tardive (156). En effet, dans l'étude de Guo, 78 % des patients développaient des anticorps anti-N après 14 jours de suivi (157). Ces résultats semblent cohérents avec ceux retrouvés dans une large étude française menée par Grzelak (158). Le pic des IgM et IgA, apparues simultanément, précéderait d'une semaine le pic des IgG (159). La production des IgG peut être concomitante à celle des IgM ou survenir quelques jours après, cependant tous les anticorps anti SARS-CoV-2 (IgM, IgA et IgG) sont détectables chez les patients à partir de la deuxième semaine suivant l'apparition des symptômes (Figure 21). Concernant la durée des Ac, une étude de cinétique a montré une négativation des IgA et IgM à 12 semaines post-symptômes. La décroissance des IgG semble plus lente et progressive jusqu'à plusieurs mois post-symptômes (160).



**Figure 21: Cinétique de la réponse immunitaire adaptative lors d'une infection à SARS-CoV-2 (161).**

### ***Caractéristiques des anticorps neutralisants***

L'efficacité des Ac sur la prévention de l'infection est liée à leur pouvoir de neutralisation. Les Ac neutralisants sont ceux qui se lient au virion pour empêcher la liaison ou fusion du virus avec la cellule cible, entraînant ainsi sa neutralisation (162). La protéine S du SARS-CoV-2 est la cible des Ac neutralisants dont 90% ciblent le domaine RBD et le domaine NTD. Ils semblent modifier la protéine S, empêchant ainsi l'interaction entre le RBD et l'ACE2 (163) (Figure 22). La similitude des séquences des protéines S entre le SARS-CoV-1 et SARS-CoV-2 permet d'envisager une protection croisée avec les Ac présentant l'activité neutralisante la plus importante (164). Dans l'étude de Wölfel, tous les patients développaient des anticorps neutralisants à 14 jours du début de l'infection (64). Dans l'étude de Grzelak, l'activité

neutralisante des anticorps atteignait 80-100 % entre 14 et 21 jours après les premiers symptômes, et s'associait à la positivité des anticorps anti-S et anti-N (158).

Les Ac neutralisants permettent l'opsonisation des cellules infectées par le SARS-CoV-2 ainsi que des virus libres, aboutissant à la phagocytose par les macrophages. Ces Ac favorisent la liaison de leur fragment Fc (Fraction cristallisable) au C1q, activant la voie classique du complément et l'induction de la synthèse des protéines C3, C3a et C5a du complément (165). Les Ac peuvent également recruter des cellules effectrices afin d'induire l'apoptose de la cellule infectée via la cytotoxicité dépendante des Ac, par le biais de la reconnaissance du complexe "Ac – protéines virales" par les cellules NK.

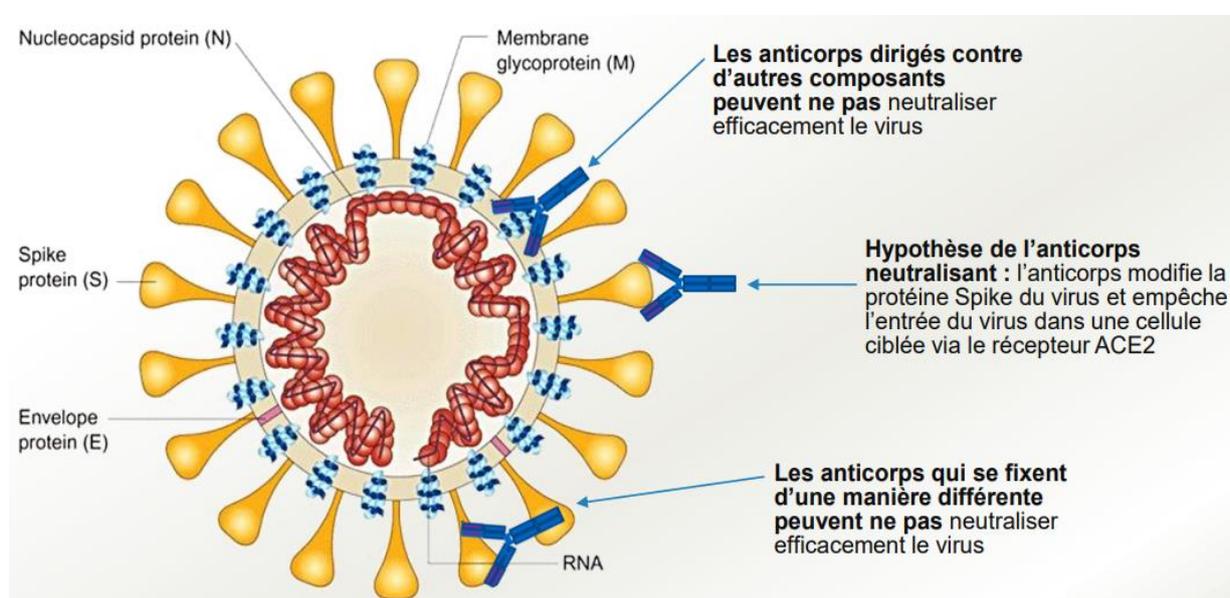


Figure 22 : Schéma représentatif de l'action des anticorps neutralisants (166).

Une activité neutralisante variable a été montrée sur une cohorte de 963 patients, avec différents degrés de neutralisation. Les non-répondeurs étaient principalement des patients asymptomatiques. De même, cette activité neutralisante varie selon les différents variants du SARS-CoV-2 (167). Les anticorps neutralisants sont positivement corrélés avec l'âge, le sexe masculin et la sévérité de la maladie. Ce sont des facteurs prédictifs de taux élevés d'Ac neutralisants (168).

### ***Lien entre la réponse humorale et la symptomatologie clinique***

Les taux des Ac anti-RBD sont corrélés à la gravité clinique. Les taux d'anticorps sont plus élevés pour les formes sévères que pour les formes bénignes, sans toutefois pouvoir

empêcher l'infection en cas de réponse immune inadaptée. En effet les patients de réanimation présentent significativement une réaction plus robuste et constante par rapport aux patients avec une symptomatologie modérée qui présentent des titres d'Ac plus faibles et déclinant plus rapidement (160). Cette corrélation est confirmée dans l'étude de Hansen qui a montré un maintien des taux importants d'Ac à 11 semaines post-infection chez les patients de forme sévère (169). De plus, l'apparition des Ac neutralisants semble plus tardive chez les patients sévères comparé aux patients légers. Par ailleurs, il a été montré que l'administration de sérum de patients guéris de l'infection au SARS-CoV-2 a été associée à une amélioration clinique chez cinq patients ayant une forme sévère avec un SDRA, suggérant le potentiel de neutralisation des Ac induits (170). L'efficacité clinique étant corrélée au taux d'Ac neutralisants présents dans le sérum.

Cependant, le développement d'anticorps spécifiques appelés « facilitants » pourrait être un facteur aggravant de l'infection : dans l'étude de Zhao (154), des taux élevés d'Ac anti-S étaient associés à la mortalité, faisant craindre l'existence d'une aggravation de l'infection anticorps-dépendante (*antibody dependent enhancement, ADE*), par facilitation de l'entrée du virus dans les cellules et renforcement de la réponse inflammatoire (171). Ces Ac facilitants potentialiserait l'infection, à l'inverse des Ac neutralisants. Ce phénomène, basé sur différents mécanismes, a déjà été décrit pour d'autres espèces virales, notamment la dengue ou le virus Zika et constaté sur un modèle simien pour le SARS-CoV-1 (154,172).

#### **IV. Diagnostic biologique**

Dans le cadre de la pandémie à COVID-19, le diagnostic biologique est un élément très important afin de prendre en charge les patients infectieux mais aussi de limiter la propagation de la maladie. Dans cette partie, j'exposerai les principaux tests de diagnostic direct et indirect disponibles et utilisés par les laboratoires (Figure 23), mais davantage de techniques existent.

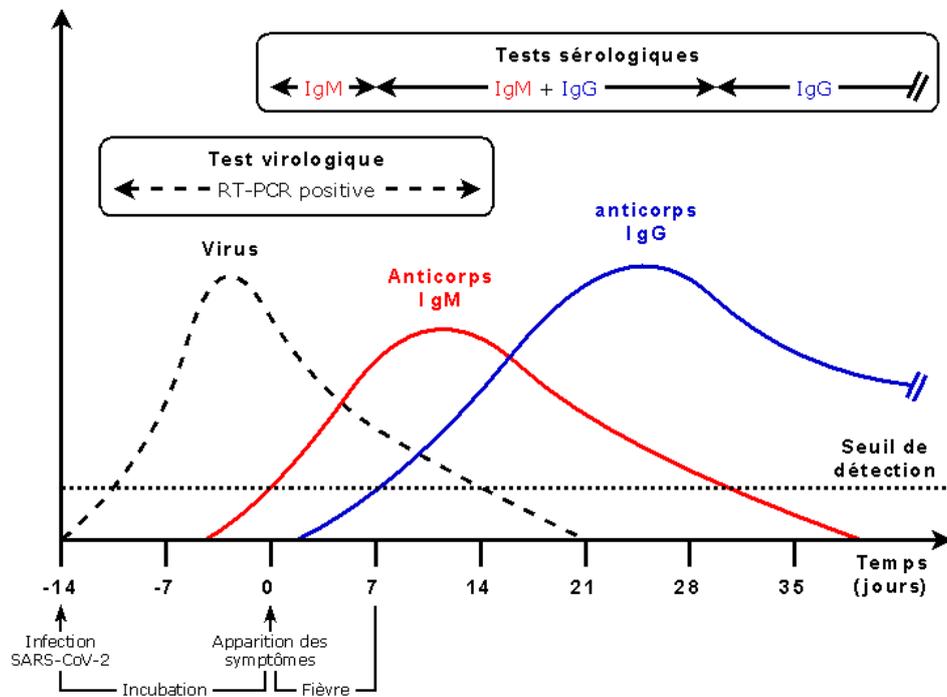


Figure 23 : Schéma représentant la place actuelle des tests diagnostiques biologiques de l'infection au SARS-CoV-2 (173).

## A. Diagnostic biologique direct

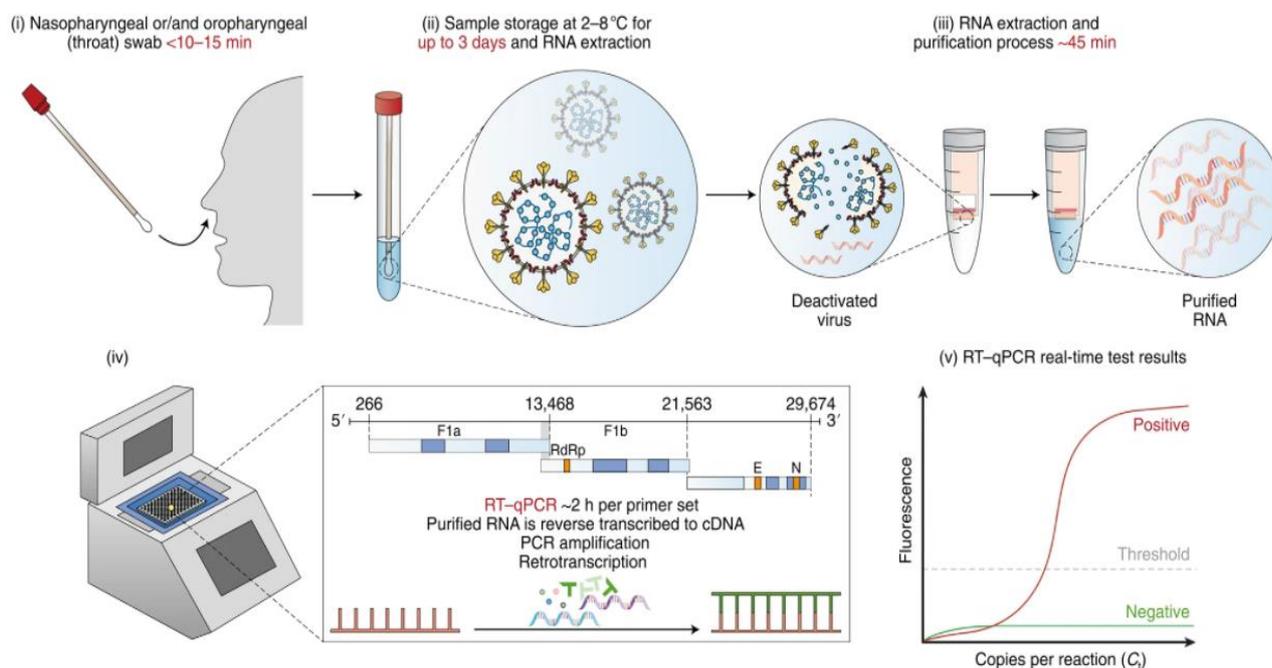
Les tests de diagnostic biologique direct permettent la détection directe du virus du SARS-CoV-2 à partir de prélèvements naso- ou oropharyngés principalement, mais aussi salivaires, et plus rarement à partir de selles, prélèvements trachéaux ou liquide broncho-alvéolaire (LBA).

### a. Les tests moléculaires

#### La RT-PCR

La RT-PCR (*retro transcription-polymerase chain reaction*) est la technique de référence (gold standard) recommandée par l'OMS pour la détection directe du SARS-CoV-2, permettant un diagnostic précoce de la maladie (174). Cette technique repose sur la technologie d'amplification des acides nucléiques de l'ARN viral. En effet, elle permet de faire une PCR (réaction en chaîne par polymérase) à partir d'un échantillon d'ARN. La première étape est une rétro-transcription (ou transcription inverse) de l'ARN viral en ADN par le biais d'une transcriptase inverse qui utilise la matrice d'ARN viral pour produire un brin d'ADN simple brin

complémentaire (ADNc). Ensuite, une ADN polymérase est utilisée pour convertir l'ADN simple brin en ADN double brin. Ces molécules d'ADN peuvent être utilisées comme matrices pour une réaction PCR afin d'amplifier un fragment d'ADN et détecter indirectement l'ARN présent dans l'échantillon (Figure 24).



**Figure 24 : Schéma résumé de la technique de RT-PCR à partir d'un échantillon naso ou oropharyngé (175).**

Les avantages de la RT-PCR sont une grande sensibilité, estimée à 95 % et une spécificité très élevée de 99,9 % (176). La technique est automatisable, permettant la réalisation de séries importantes et un diagnostic à large échelle de la population. En revanche, les résultats de la RT-PCR en temps réel utilisant des amorces ciblant différentes parties du génome viral peuvent être affectés par la variation de la séquence de l'ARN viral, notamment en cas de nouveaux variants (changement de séquence des régions dans lesquelles les amorces s'hybrident). De plus, des résultats faussement négatifs peuvent survenir en raison de l'évolution virale (177) ou en raison du moment du prélèvement (trop tôt ou trop tard dans l'évolution de l'infection, y compris la limite de détection due aux infections tardives avec des manifestations atypiques ou des patients ayant éliminé le virus). Les autres limites de la RT-PCR sont la qualité du prélèvement (matériel insuffisant), le transport et le stockage de l'échantillon (récipient inapproprié, exposition à des températures), la purification des acides nucléiques de mauvaise qualité ou la présence d'inhibiteurs de PCR, le coût et le temps

d'attente du résultat qui peut varier de 1 à 2 jours (178) selon les techniques. Pour pallier aux urgences diagnostiques, des techniques rapides permettant l'obtention d'un résultat en moins d'une heure ont été développées en RT-PCR simple (plate-forme GenXpert de Cepheid®) ou PCR-multiplex (plate-forme Filmarray de Biomerieux®).

### **Le test RT-LAMP**

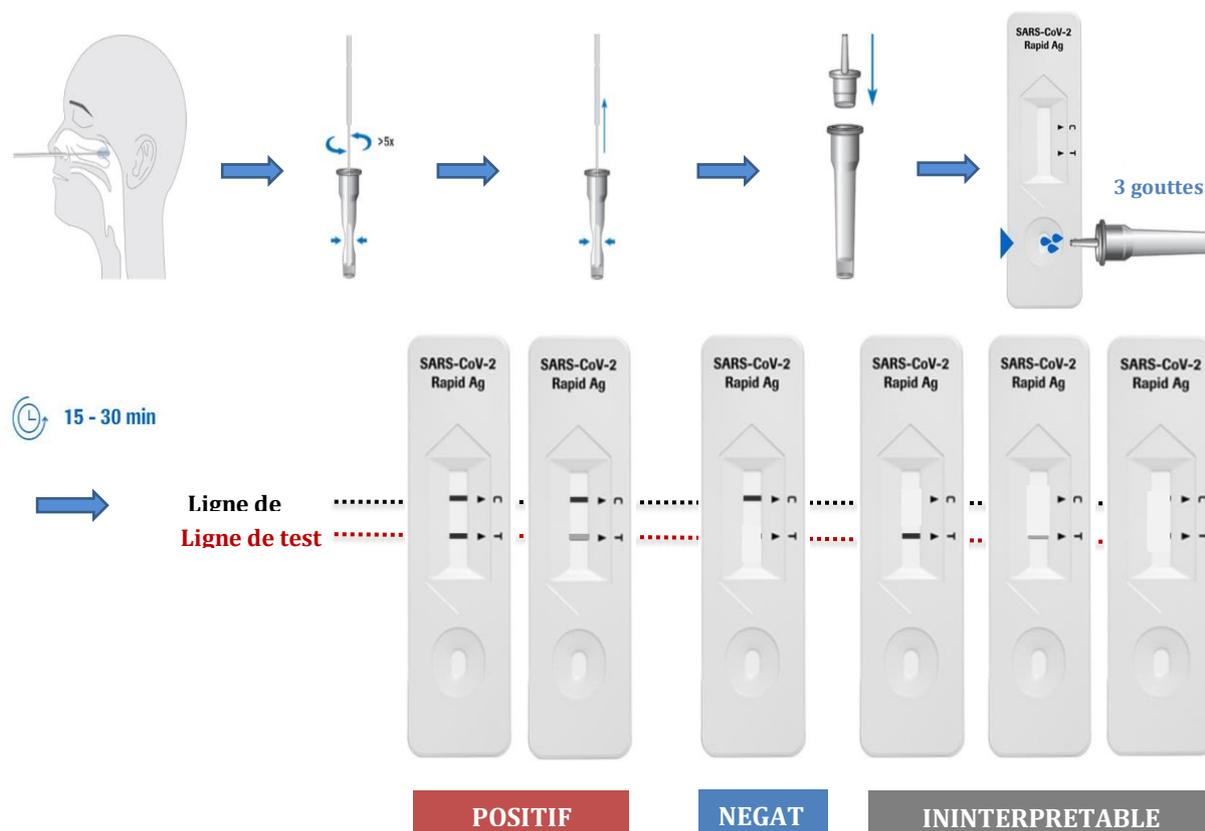
Le test RT-LAMP est une méthode d'amplification isothermique médiée par boucle de transcription inverse (*Loop-mediated isothermal amplification*). C'est une méthode d'amplification visuelle rapide, sensible et efficace des acides nucléiques mais sans extraction des acides nucléiques. Les avantages de cette technique permettent un rendu de résultat plus rapide que la RT-PCR classique (en 40 minutes). Les performances de cette technique sont plus faibles que celles de la RT-PCR qui reste le gold standard, cependant cette méthode a été largement utilisée pour l'isolement d'autres coronavirus comme le MERS-CoV (179) et d'autres espèces virales (grippe, Zika, Ebola...). Des tests RT-LAMP intégrés sur salive ont été développés et avaient obtenus une bonne spécificité avec des résultats de 97 à 99%, cependant en termes de sensibilité, ces tests présentaient des résultats très hétérogènes variant de 30% à 90%, sans véritable explication. Cette hétérogénéité était observée en population globale (chez les personnes symptomatiques ou non) et entre prélèvements pour un même test, entre divers études ou au sein d'une même étude, et dans des lieux de prélèvement différents (180). Ces nouvelles données ont conduit la HAS à suspendre sa recommandation de prise en charge des tests RT-LAMP intégrés sur prélèvement salivaire. Depuis novembre 2020, d'autres techniques de détection du génome du SARS-CoV-2 ont été validées sur matrice salivaire comme la RT-PCR et le test TMA (*Transcription Mediated Amplification*) qui est une autre technique de détection du génome viral lorsque le prélèvement nasopharyngé est difficile voire impossible.

## **b. Tests antigéniques**

Les tests antigéniques permettent la détection directe des protéines spécifiques du SARS-CoV-2 (majoritairement la protéine de nucléocapside) par une technique d'immunochromatographie avec une lecture manuelle ou automatisée. Leur principal avantage est le délai rapide de rendu de résultat variant entre 15-30 minutes, bien inférieur à la plus rapide des techniques de RT-PCR. En comparaison à la RT-PCR, les tests antigéniques

présentent des performances plus faibles, avec une sensibilité de moins de 70 % (181). Néanmoins, de par leur simplicité d'utilisation et leur rapidité de rendu de résultat, ces tests sont envisagés dans une stratégie de dépistage des individus contagieux (avec une excrétion virale importante) et pour diagnostiquer au plus tôt les clusters. En effet, afin de parvenir à une couverture de dépistage élevée, l'OMS recommande l'utilisation de tests de diagnostic rapide de détection des antigènes. Dans l'idéal, toutes les personnes symptomatiques qui répondent aux critères d'infection au COVID-19 doivent être testées le plus tôt possible (dans la première semaine) après l'apparition de la maladie (174). Ce type de test est largement utilisé en clinique et en ville par divers praticiens, selon une stratégie de dépistage de première ligne.

Comme les tests de RT-PCR, ils assurent le diagnostic précoce de la maladie dès la phase aiguë. Plusieurs solutions de tests rapides permettant la détection d'antigènes sont apparues sur le marché (Figure 25).



**Figure 25: Schéma de la réalisation du test de détection rapide d'antigènes du SARS-CoV-2, adapté de Diagnostics Roche (182).** Un test est considéré positif s'il y a présence à la fois de la ligne de contrôle ainsi que de la ligne de test du patient. Un test est négatif s'il n'y a que la ligne de contrôle mais que la ligne de test n'apparaît pas. Un test est ininterprétable en absence de ligne de contrôle visible, et ce même s'il y a une ligne de test.

De nos jours, des auto-tests fonctionnant sur le même principe que les tests antigéniques, sont commercialisés à destination de la population générale. Ces auto-tests rapides de dépistage s'effectuent par l'individu lui-même (du prélèvement à la lecture et l'interprétation des résultats), dans un environnement domestique.

## **B. Diagnostic biologique indirect**

Les tests de diagnostic indirect permettent le diagnostic d'une infection à SARS-CoV-2 en explorant l'immunité adaptative humorale et cellulaire induite à la suite de l'infection.

### **a. Tests sérologiques**

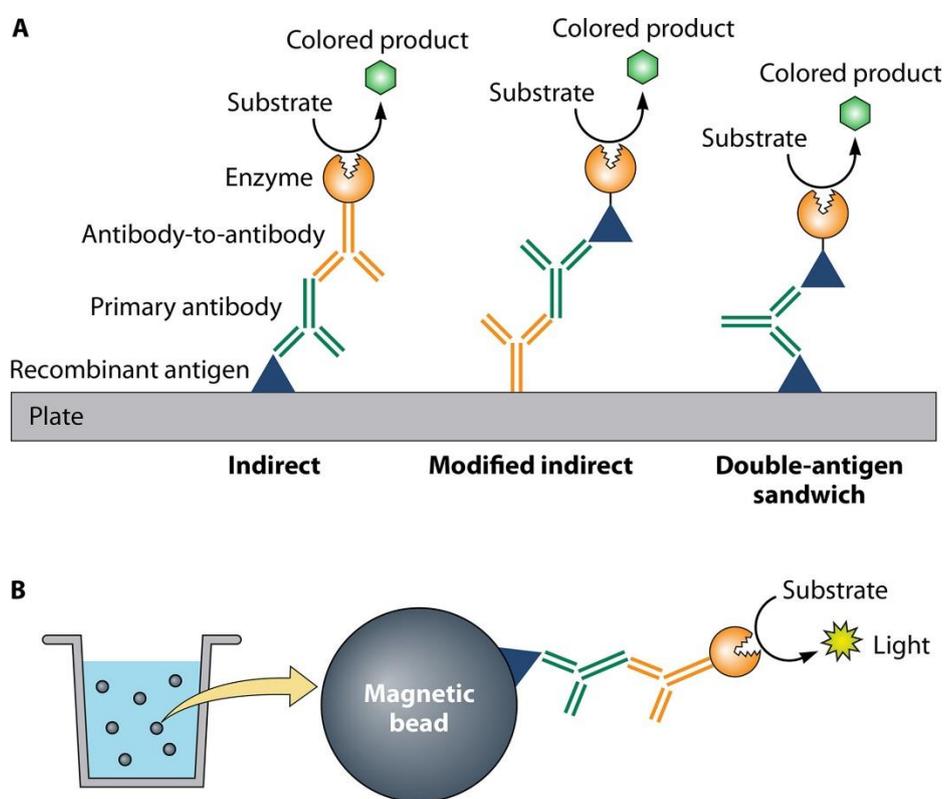
Les tests sérologiques permettent de détecter la présence d'anticorps dirigés contre le SARS-CoV-2 (Ac totaux ou isotypes IgA, IgM, IgG) et d'étudier le versant humoral de la réponse immunitaire adaptative. Ils peuvent permettre de faire la distinction entre une infection récente ou ancienne au COVID-19 et de mettre en évidence une immunité post-vaccinale.

Les tests sérologiques utilisés en routine ciblent différentes structures du SARS-CoV-2. Les cibles antigéniques sont le plus souvent la protéine S, notamment son domaine RBD, ainsi que la protéine N (183). Avec l'arrivée des vaccins qui induisent principalement des Ac anti-S, la positivité des tests sérologiques anti-N possède l'avantage d'affirmer l'antériorité d'une infection naturelle.

#### **Tests sérologiques par méthode ELISA et CLIA**

La technique la plus utilisée est l'ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*). C'est une méthode immuno-enzymatique qui permet une mesure qualitative et semi-quantitative (titration) des anticorps produits dans le sang contre le SARS-CoV-2. Il existe plusieurs types de méthodes ELISA : dans la méthode ELISA indirecte, un support solide (microplaque à 96 puits) est recouvert d'antigènes recombinants du SARS-CoV-2. Le sérum ou le plasma du patient est ajouté et, s'ils sont présents, les Ac spécifiques du SARS-CoV-2 se lieront aux antigènes immobilisés. Après les étapes de lavage, un Ac secondaire spécifique de l'isotype ciblé (IgM, IgA, IgG anti-humaine) est ensuite ajouté. Cet Ac secondaire (ou conjugué) est lié à un fluorophore pouvant générer de la fluorescence ou conjugué à une enzyme qui génère un

signal colorimétrique ou chimiluminescent suite à l'ajout d'un substrat. Le substrat ajouté réagira avec le conjugué, entraînant un changement de couleur. Cette couleur possède une absorbance ou densité optique (DO) qui est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre. La quantité de changement de couleur est directement corrélée avec la concentration des Ac cibles, ce qui permet une mesure quantitative du nombre d'Ac présents dans l'échantillon (Figure 26). D'autres permutations d'ELISA sont également possibles (indirect modifié ou sandwich à double antigène), mais bien que ces techniques partagent toutes des similitudes en termes de mécanismes de génération de signal, chacune peut varier en termes de performances. En règle générale, le temps de rendu d'un résultat pour les tests sérologiques par méthode ELISA varie entre 1 à 5 h (184).



**Figure 26: Schéma représentant le principe des tests sérologiques les plus utilisés pour la détection des anticorps spécifiques du SRAS-CoV-2 (185). (A) Modèles communs de méthodes ELISA, y compris les tests indirects, indirects modifiés et sandwich à double antigène. (B) Méthode CLIA à base de billes magnétiques.**

Une autre technique très utilisée en sérologie est la chimiluminescence (CLIA, *Chemiluminescence immunoassay*), qui repose sur le même principe que l'ELISA mais avec un mode de révélation différent. En effet, la CLIA utilise la chimiluminescence pour quantifier le niveau d'anticorps présents dans un échantillon sanguin (186). Des antigènes du SARS-CoV-2 sont conjugués à de l'isothiocyanate de fluorescéine et liés à des particules magnétiques. Si

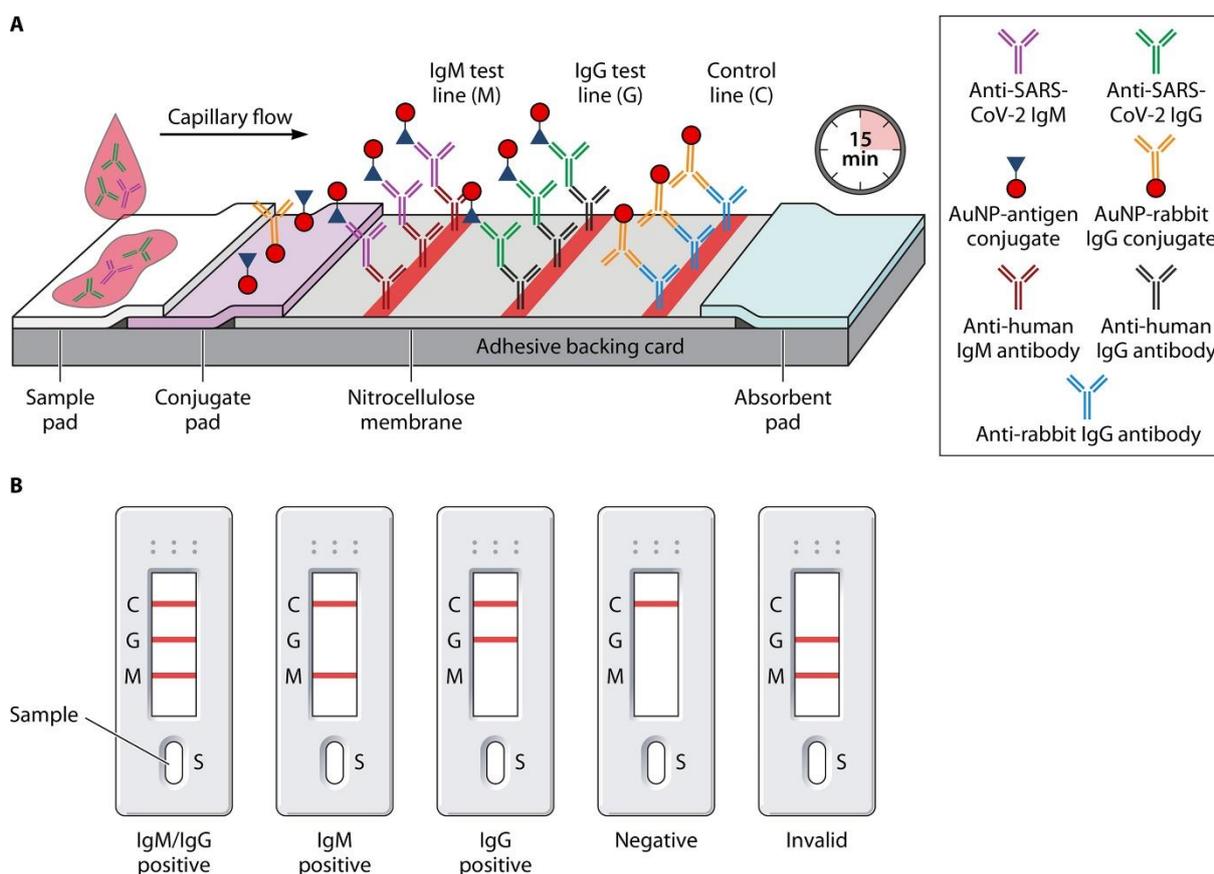
des Ac anti SARS-CoV-2 sont présents dans l'échantillon, ils se lient aux antigènes et sont ensuite visualisés par chimiluminescence à l'aide d'un Ac de détection. La chimiluminescence est une réaction chimique qui émet de l'énergie sous forme de lumière. Pour produire de la lumière, le conjugué utilise une réaction enzyme-substrat. Cette lumière est détectée par un luminomètre en unités lumineuses relatives (RLU) et traduit la quantité d'Ac présente dans l'échantillon (Figure 26). Les avantages de la technique CLIA sont une excellente sensibilité permettant de détecter de faibles niveaux d'Ac (186), une intensité élevée du signal, l'absence d'émissions interférentes (un rapport signal/bruit très élevé) et une grande stabilité des réactifs.

Ces tests sérologiques sont automatisables et sont de ce fait, préférables dans une stratégie diagnostique à large échelle, car ils permettent des séries plus importantes en moins de temps. Il existe plusieurs trousse commerciales disponibles sur le marché. Leurs performances sont variables et sont fonction de la cible antigénique utilisée ainsi que de l'isotype détecté (IgA, IgM, IgG). Parmi les tests ciblant la protéine S, ceux qui détectent les Ac dirigés contre le domaine RBD sont les plus sensibles (183). Malgré le risque évoqué de potentielles réactions croisées entre le SARS-CoV-2 et d'autres coronavirus, la spécificité de ces tests sérologiques anti-S est très bonne en pratique. La protéine N semble être plus sensible que la protéine S, de par son abondance dans le virus, cependant, la cinétique des Ac anti-N est courte (187). Les tests permettant la détection des Ac totaux sont généralement les plus sensibles et spécifiques (187). La détection d'IgG et d'IgM comporte des performances similaires, contrairement aux IgA pour lesquels il subsiste une perte de spécificité due à une réaction croisée.

### ***Test sérologiques rapides par LFIA***

Il existe des tests sérologiques rapides basés sur le principe d'immunochromatographie, qui utilise des antigènes SARS-CoV-2 recombinants conjugués à des nanoparticules d'or colloïdal (188). Ce sont des tests à flux latéral (*Lateral Flow Immunochromatographic Assay*, LFIA) qui ne nécessitent qu'une goutte de sang total, sérum ou plasma. Lorsque l'échantillon est placé sur la bandelette réactive, il migre par capillarité vers les antigènes SARS-CoV-2 conjugués à des nanoparticules d'or colloïdal ou AuNP, déjà pré-immobilisés et réagit avec eux. Si des Ac IgM/IgG sont présents dans l'échantillon, ils se lient aux AuNP et forment un complexe Ag – Ac qui est ensuite capturé dans l'une des lignes de test par des Ac anti-IgM/IgG humaines. Ceci

entraîne une coloration rose due à l'accumulation des AuNP et l'apparition d'une bande. Ensuite, un conjugué AuNP-IgG de lapin sera capturé par des Ac anti-IgG de lapin dans la ligne de contrôle, indiquant la bonne réalisation du test (185) (Figure 27). Les résultats sont visibles en 15 minutes. Les avantages de ce test sont leur facilité d'utilisation ainsi que leur rapidité. En revanche, à l'inverse des tests par ELISA ou CLIA, ce type de test ne permet de rendre qu'un résultat qualitatif (absence ou présence d'Ac). De plus, la sensibilité est plus faible que les méthodes ELISA ou CLIA, et est limitée durant la phase aigüe de la maladie (183).



**Figure 27: Schéma représentant le principe des tests sérologiques de détection rapide à flux latéral (LFIA) des anticorps spécifiques du SARS-CoV-2 (185). (A) Schéma d'un dispositif d'immunodosage à flux latéral pour la détection simultanée d'anticorps IgM et IgG. (B) Différents profils de résultats du test LFIA.**

De façon générale, quelle que soit la méthode sérologique utilisée (ELISA, CLIA ou LFIA), les résultats faussement positifs dus à une réactivité croisée sont rares, avec une spécificité rapportée allant de 96 % à 100 % (189). Dans une méta-analyse, la sensibilité groupée du LFIA était de 78% avec un intervalle de confiance à 95 % (IC95) entre 71-83 %, celle de l'ELISA de 86% (IC95 : 82-89 %) et celle du CLIA à 92 % (IC95 : 86 –95%) (189). Bien que la plupart des tests sérologiques actuellement disponibles évaluent les Ac dirigés contre les protéines S et

N, d'autres épitopes antigéniques pourraient également induire de fortes réponses immunitaires. Parmi les différents antigènes du SARS-CoV-2, la nucléocapside ainsi que les protéines non structurales ORF8 et ORF3b induisent les réponses Ac spécifiques les plus fortes (190). Les ORF combinés avaient une spécificité de 99,5 %, ce qui suggère que les tests diagnostiques de deuxième génération utilisant de nouvelles cibles, comme les protéines non structurales, pourraient améliorer les performances des tests sérologiques à l'avenir.

## **b. ELISpot COVID**

Le test ELISpot COVID est destiné à la détection d'une réponse immunitaire à médiation cellulaire au SARS-CoV-2 dans le sang total. Il s'agit d'une méthode diagnostique quantitative et sensible, basée sur une technique immuno-enzymatique l'ELISpot (*Enzyme Linked ImmunoSpot*), ayant le même principe que l'ELISA. En effet, la réponse immunitaire adaptative à l'infection par le SARS-CoV-2 est déclenchée par l'activation des lymphocytes B et T. Ce test fonctionnel permet de mesurer la proportion de lymphocytes T spécifiques sécréteurs d'IFN $\gamma$  après avoir été sensibilisés aux antigènes du SARS-CoV-2, en capturant l'IFN $\gamma$  à proximité de ces cellules (191). Une réponse des cellules T au SARS-CoV-2 est généralement détectable dans le sang plusieurs jours après l'infection initiale. La durée de la réponse détectable après l'infection n'est pas encore bien déterminée et fait l'objet de mes travaux (voir partie Objectifs).

Les tests ELISpot sont exceptionnellement sensibles car la cytokine cible (ici l'IFN $\gamma$ ) est capturée directement autour de la cellule sécrétrice, avant d'être diluée dans le surnageant, liée par les récepteurs des cellules adjacentes ou encore dégradée. De ce fait, les tests ELISpot sont beaucoup plus sensibles que les tests ELISA classiques (192–195). En effet, une bonne sensibilité est importante pour détecter la réponse cellulaire T spécifique au SARS-CoV-2 car la fréquence des lymphocytes T peut être plus faible que pour d'autres virus (196). De plus, certains facteurs comme l'âge (197), la gravité de la maladie (198) et l'immunosuppression (199) ont été associés à une variabilité de l'ampleur de la réponse T spécifique du SARS-CoV-2. Néanmoins, cette technique très sensible, reste chronophage et coûteuse. En effet, il faut compter 2 jours pour l'analyse et le rendu des résultats, et n'étant pas une technique de routine et non inscrite à la nomenclature des actes de biologie médicale (NABM), son coût varie entre 150 et 200€ selon les laboratoires qui le proposent. Ce test est destiné à identifier

les personnes présentant une réponse immunitaire adaptative au SARS-CoV-2, et pourrait être utilisé parallèlement ou en complément des tests sérologiques pour compléter l'évaluation clinique des patients, qui présentent une suspicion de COVID-19, mais sont négatifs à la RT-PCR COVID, et constitue une alternative à l'évaluation du versant humoral notamment chez les patients atteints de déficit primaire en production d'Ac ou ceux recevant une thérapie pouvant interférer avec les résultats sérologiques.

## **V. Prise en charge thérapeutique**

La prise en charge thérapeutique des patients atteints de COVID-19 a été source de débat parmi la communauté médicale. Différentes études ont été menées dans les Centres Hospitaliers (CH) et Universitaires (CHU) de France et des consensus commencent à émerger. Nous exposerons brièvement les thérapies utilisées au CHU de Lille. Toutefois, la pandémie n'étant pas encore terminée, la recherche de traitements efficaces dans la lutte contre le COVID-19 est en cours et des innovations thérapeutiques sont à venir dans les mois et/ou les années à venir.

### **A. *Prise en charge médicamenteuse***

Plusieurs molécules ont été proposées pour la prise en charge médicamenteuse des patients infectés par le SARS-CoV-2 tout au long de la pandémie. A l'heure actuelle, deux ans après le début de la pandémie, certains traitements ne sont plus retenus, parmi lesquels : divers antibiotiques, l'hydroxychloroquine, l'ivermectine, le nitazoxanide, la chlorpromazine, le sérum anti-SARS-CoV-2 d'origine équine, la colchicine, la ciclosporine, divers antiviraux (lopinavir, la ribavirine, favipiravir, oseltamivir, sofosbuvir), la plupart des cytokines et inhibiteurs ayant fait l'objet d'essais cliniques (l'interféron, l'imatinib, le baricitinib, le tofacitinib, le clofoctol) et la fluvoxamine. Les traitements symptomatiques comme l'oxygénothérapie ou les anticoagulants ainsi que le plasma de patients convalescents ne seront pas décrits. Seuls les traitements récemment autorisés par les autorités sanitaires dans la prise en charge thérapeutique des patients infectés, sont détaillés dans cette partie.

## a. Les antiviraux

### ***VEKLURY® (Remdesivir (GS-5734))***

Veklury® est un médicament antiviral produit par le laboratoire Gilead qui a été le premier à obtenir le 3 juillet 2020 une autorisation de mise sur le marché (AMM) conditionnelle, pour le traitement des patients ayant une pneumonie associée au COVID-19 et recevant une oxygénothérapie. Il a obtenu une extension d'indication le 20 décembre 2021 pour les patients non oxygénorequérants présentant un risque accru de développer une forme sévère de COVID-19. Le remdesivir est une prodrogue analogue nucléotidique de l'adénosine qui est métabolisée dans des cellules hôtes pour former le métabolite nucléoside triphosphate pharmacologiquement actif qui agit comme un analogue de l'ATP en inhibant de manière compétitive l'ARN polymérase ARN-dépendante du SARS-CoV-2 et la synthèse de l'ARN viral (200–202).

### ***PAXLOVID® (Nirmatrelvir/Ritonavir)***

À l'heure actuelle, un seul médicament a obtenu une AMM le 28 janvier 2022 dans l'indication de « traitement de la maladie COVID-19 chez les patients adultes qui ne nécessitent pas de supplémentation en oxygène et qui présentent un risque accru d'évolution vers une forme sévère ». Il s'agit d'un médicament antiviral, développé par Pfizer, appelé Paxlovid® qui prévient la réplication virale. C'est une association entre le nirmatrelvir, une antiprotéase inhibitrice de la protéase 3C-like des coronavirus qui induit le blocage de la réplication du SARS-CoV-2, et du ritonavir, autre antiprotéase utilisée comme puissant inhibiteur enzymatique du cytochrome P450 pour augmenter les concentrations plasmatiques du nirmatrelvir et booster sa biodisponibilité. Il doit être administré par voie orale, dès que possible après le diagnostic de COVID-19 et dans les 5 jours suivant l'apparition des symptômes à posologie de 2 comprimés de nirmatrelvir (soit 300mg) et 1 comprimé de ritonavir (100mg) pris ensemble, deux fois par jour, pendant 5 jours. Il peut être utilisé y compris sur le variant Omicron.

## b. Les anticorps monoclonaux

Les Ac monoclonaux suivants ont obtenu une autorisation d'accès précoce (AAP), qui est une procédure permettant l'utilisation, à titre exceptionnel, d'un médicament dans une indication

précise soit avant la délivrance d'une AMM, soit dans l'attente de sa prise en charge par l'Assurance maladie au titre de son AMM, dès lors que toutes les conditions suivantes sont remplies :

- La maladie est grave, rare ou invalidante ;
- Il n'existe pas de traitement approprié ;
- L'efficacité et la sécurité de ce médicament, pour l'indication considérée, sont fortement présumées au vu des résultats des essais thérapeutiques ;
- Le médicament est présumé innovant ;
- La mise en œuvre du traitement ne peut être différée.

### **EVUSHELD® (Tixagévimab/Cilgavimab)**

Le tixagévimab et cilgavimab sont deux Ac monoclonaux recombinants humains IgG1κ, isolés à partir des cellules de patients convalescents, spécifiquement dirigés contre deux épitopes distincts et situés sur des régions non chevauchantes du domaine de liaison au récepteur (RBD) de la protéine S du SARS-CoV-2. Ces Ac préviennent la fixation et l'entrée du virus dans les cellules humaines en bloquant l'interaction avec le récepteur cellulaire ACE2 humain, entraînant ainsi une neutralisation du virus SARS-CoV-2. Des modifications des fragments Fc des deux Ac monoclonaux ont été effectuées par l'intermédiaire de substitutions d'acides aminés permettant ainsi :

- Un allongement de la durée de demi-vie des Ac, passant de 20 jours en moyenne à une durée comprise entre 70 et 100 jours,
- Une abrogation de la fonction effectrice, grâce à une réduction de la liaison au récepteur Fcγ induisant une diminution du risque théorique potentiel d'exacerbation de la maladie par les Ac (risque ADE, *Antibody-Dependent Enhancement*).

Ce médicament, développé par AstraZeneca a reçu une AAP le 9 décembre 2021, dans l'indication de « *prophylaxie pré-exposition du COVID-19 chez les patients âgés de 12 ans et plus ayant un déficit de l'immunité lié à une pathologie ou à des traitements et faiblement ou non répondeurs à la vaccination après un schéma vaccinal complet, ou non éligibles à la vaccination et qui sont à haut risque de forme sévère de COVID-19* ». Actif sur le variant Delta, c'est le seul à être utilisé en prophylaxie pré-exposition, en raison de la présence désormais majoritaire du variant Omicron dans la population. Le traitement doit être administré et supervisé par un professionnel de santé qualifié et dans des conditions permettant de prendre

en charge une réaction allergique. En effet, les patients doivent être surveillés cliniquement pendant l'administration et observés pendant au moins trente minutes après l'administration (203–205).

### **RONAPREVE® (Casirivimab/Imdevimab)**

Le casirivimab (IgG1κ) et l'imdevimab (IgG1λ) sont deux Ac monoclonaux humains recombinants non modifiés au niveau des régions Fc, qui se lient à des épitopes non chevauchants du domaine de fixation au récepteur (RBD) de la protéine S du SARS-CoV-2. Cette liaison empêche la fixation du RBD au récepteur de l'ACE2 humain, empêchant ainsi le virus de pénétrer dans les cellules.

Ce médicament développé par Roche, a reçu une AAP par la HAS, le 17 février 2022 dans l'indication de :

- « *Traitement du COVID-19 confirmé par un test virologique de détection du SARS-CoV-2 positif, chez les patients âgés de 12 ans et plus, ne nécessitant pas d'oxygénothérapie, ou hospitalisés et séronégatifs (IgG anti-S) nécessitant une oxygénothérapie non invasive et étant à risque élevé d'évolution vers une forme grave de la maladie* ». Le traitement doit être instauré dès que possible après l'obtention du test RT-PCR positif et dans un délai maximum de 5 jours après le début des symptômes.
- « *Prophylaxie post-exposition de l'infection à SARS-CoV-2 chez les patients âgés de 12 ans et plus, n'ayant pas développé du fait de leur immunodépression une réponse vaccinale satisfaisante après un schéma vaccinal complet* »

Dans tous les cas (préventif post-exposition ou curatif), il est utilisé uniquement chez les patients infectés par le variant Delta, ce qui nécessite au préalable la réalisation d'un criblage (206,207).

### **XEVUDY® (Sotrovimab)**

La HAS a accordé une AAP le 6 janvier 2022 à l'Ac monoclonal Xevudy® (sotrovimab) développé par GSK dans le traitement curatif du COVID-19, y compris les formes associées au variant Omicron du SARS-CoV-2. Le sotrovimab est un Ac monoclonal humain de type IgG1 qui se lie à un épitope hautement conservé du domaine de liaison au récepteur (RBD) de la protéine S du SARS-CoV-2. Par rapport aux autres Ac monoclonaux dirigés contre le SARS-CoV-2, le

sotrovimab est le seul Ac monoclonal utilisable en curatif contre le variant Omicron, et se distingue par sa double capacité d'action :

- une action neutralisante en empêchant le virus d'infecter de nouvelles cellules
- une action effectrice puissante en éliminant les cellules déjà infectées.

A ce jour, Xevudy® est une solution pour perfusion intraveineuse et doit être administré dans un établissement de santé dans lequel les patients peuvent être surveillés durant l'administration et pendant au moins 1 heure après l'administration. Il est recommandé de l'administrer dans les 5 jours suivant l'apparition des symptômes.

Les recommandations d'utilisation de ces Ac monoclonaux sont présentées dans le Tableau 2.

Nom (DCI) Laboratoire	Préventif pré-exposition	Préventif post-exposition	Curatif à domicile	Curatif hospitalier
<b>EVUSHELD®</b> (tixagévimab/cilgavimab) AstraZeneca	<b>Oui</b>	Non	Non	Non
<b>RONAPREVE®</b> (casirivimab/imdevimab) Roche	Non (passage vers EVUSHELD®)	<b>Oui</b> (uniquement si variant Delta)	<b>Oui</b> (uniquement si variant Delta)	<b>Oui</b> (uniquement si variant Delta)
<b>XEVUDY®</b> (sotrovimab) GSK	Non	Non	Non	<b>Oui</b>

**Tableau 2: Recommandations d'utilisation des anticorps monoclonaux disponibles en France à la date du 11 janvier 2022 (mise à jour du DGS-Urgent du 4 janvier 2022)(208).**

### c. Les alternatives thérapeutiques

#### **ROACTEMRA® (Tocilizumab)**

Antagoniste du récepteur de l'interleukine 6, le tocilizumab se lie de manière spécifique aux récepteurs solubles et membranaires de l'IL6 et inhibe la transmission du signal médié par les récepteurs. Il a obtenu une AMM européenne le 6 décembre 2021 dans l'indication de traitement du COVID-19 chez les adultes recevant une corticothérapie systémique et nécessitant une supplémentation en oxygène ou une ventilation mécanique.

### **KINERET® (Anakinra)**

Anti-inflammatoire, antagoniste du récepteur de l'interleukine-1 humaine. Il a obtenu une AMM européenne le 17 décembre 2021 dans l'indication de traitement du COVID-19 chez les adultes atteints de pneumonie nécessitant une supplémentation en oxygène et à risque de progression vers une insuffisance respiratoire.

### **Dexaméthasone**

Ce corticoïde a obtenu dès la fin de l'année 2020, une indication inscrite dans le résumé des caractéristiques du produit (RCP) : « *Infection à coronavirus SARS-CoV-2 (COVID-19) chez les adultes et les adolescents qui nécessite une oxygénothérapie* », à la posologie de 6 mg/j à dose fixe, pour une durée de 10 jours au maximum, pour des patients hospitalisés présentant des symptômes évoluant depuis une semaine.

## **B. Prévention**

### **a. Mesures sanitaires**

Plusieurs mesures sanitaires appelées « gestes barrières » ont rapidement été mises en place par l'État suite à l'augmentation exponentielle des cas d'infection COVID-19 en France. Ces recommandations ont largement été diffusées à la population (Figure 28). Ces mesures comprennent :

- Le maintien d'une distance de sécurité : distanciation physique d'au moins 2 mètres avec tout le monde, y compris les personnes qui ne semblent pas malades.
- Des mesures d'hygiène : désinfection des mains par un lavage fréquent des mains, avec du savon et de l'eau ou avec une solution ou gel hydroalcoolique. L'utilisation de mouchoirs jetables à usage unique et en cas de toux ou d'éternuement, se couvrir le nez et la bouche avec le pli du coude ou un mouchoir. La désinfection des surfaces en contact avec les mains (poignées de porte...).
- Le port d'un masque chirurgical (ou FFP2 de préférence) dans les espaces publics, notamment en intérieur ou lorsque la distanciation physique n'est pas possible, permettant de limiter les échanges de particules virales présentes dans les gouttelettes.
- L'aération régulière des pièces en intérieur en ouvrant les fenêtres le plus souvent possible et préférer les zones ouvertes et bien ventilées aux espaces fermés.

- La vaccination COVID-19 recommandée selon les divers schémas vaccinaux spécifiques.
- L'isolement chez soi en cas de symptômes.
- Privilégier le télétravail au maximum dans la mesure du possible afin de limiter les contacts sociaux.
- Saluer sans serrer les mains et éviter les embrassades (bises et contacts rapprochés).
- Utiliser les outils numériques dont l'application *TousAntiCovid* développée par le Gouvernement.



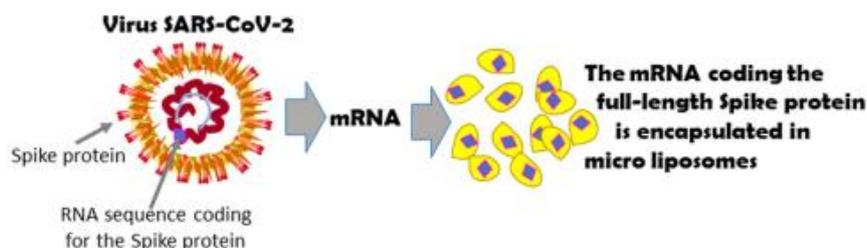
Figure 28: Affiche des consignes des gestes barrières du ministère des Solidarités et de la Santé publique en France (209).

## b. Vaccination COVID-19

Suite à l'impact de la pandémie et la nécessité de l'endiguer et de protéger la population, de nombreux vaccins ont été développés et ont commencé à être administrés à la population, selon des schémas vaccinaux spécifiques. Les principaux vaccins disponibles en France et validés par l'OMS, sont chronologiquement (210) :

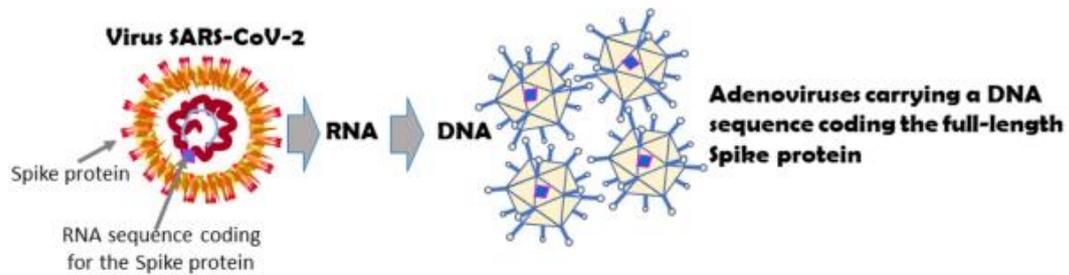
- Le vaccin Pfizer/BioNTech Comirnaty®, le 31 décembre 2020.
- Les vaccins SII/COVISHIELD et AstraZeneca/AZD1222, le 16 février 2021.
- Le vaccin Janssen/Ad26.COV 2.S développé par Johnson & Johnson, le 12 mars 2021.
- Le vaccin Moderna COVID-19 (ARNm 1273), le 30 avril 2021.

Les vaccins de Pfizer-BioNTech et Moderna sont des vaccins à ARN messager (ARNm), dont la technologie utilisée consiste à injecter dans l'organisme non pas le virus mais des molécules d'ARNm fabriquées au laboratoire. Cet ARN, encapsulé dans des particules de lipides, sans adjuvant chimique, ordonne aux cellules au niveau du site d'injection (principalement les cellules musculaires et les cellules du système immunitaire) de fabriquer une protéine spécifique du virus responsable du COVID-19, ce qui activera une réponse immunitaire. Il est ensuite rapidement éliminé. L'ARNm ne pénètre pas dans le noyau de la cellule et n'a aucune action sur le génome, autrement dit, il ne modifie pas l'ADN (Figure 29).



**Figure 29: Principe des vaccins basés sur l'ARNm de la protéine Spike porté par des microparticules lipidiques (211).**

Les vaccins d'AstraZeneca et Janssen (Johnson & Johnson) ont développé des vaccins à vecteur viral (adénovirus). Ces vaccins reproduisent sur un virus inoffensif certains éléments de l'enveloppe du SARS-CoV-2. Une fois injectés, ils préparent le système immunitaire à se défendre contre le SARS-CoV-2 (Figure 30).



**Figure 30: Principe des vaccins basés sur l'ADN de la protéine Spike porté par les adénovirus (211).**

Ces vaccins ont obtenu une AMM conditionnelle dans le cadre de l'urgence sanitaire. Cette liste n'est pas exhaustive et d'autres vaccins ont été développés au niveau mondial, notamment les vaccins chinois Sinopharm (le 7 mai 2021) et Sinovac-CoronaVac (le 1er juin 2021), et le vaccin indien COVAXIN (BBV152) de Bharat Biotech (le 3 novembre 2021).

Récemment, le 20 décembre 2021, l'Agence européenne du médicament (EMA, *European Medicines Agency*) s'est prononcée favorablement pour une AMM conditionnelle du vaccin français NUVAXOVID (Novavax) dans l'Union européenne. Ce vaccin contient des protéines S recombinantes associées à un adjuvant (Matrix-M). Son équivalent indien est le vaccin Covovax (NVX-CoV2373) (le 17 décembre 2021).

# Objectifs de l'étude

---

En parallèle de la recherche moléculaire et sérologique, la mémoire immunitaire spécifique T a pu montrer son intérêt lors de l'épidémie SARS-CoV-1 (85). Une réponse plus importante a d'ailleurs été corrélée avec la sévérité clinique, ainsi qu'avec les tests sérologiques (86). Ainsi les objectifs de mes travaux sont :

- D'une part, étudier et proposer un nouvel outil diagnostique original et complémentaire (ELISpot COVID) permettant le suivi immunologique des patients COVID-19 suite à une infection naturelle, notamment en cas de sérologie indétectable et RT-PCR négative.
- D'autre part, utiliser cet outil afin de suivre le devenir de l'immunité adaptative T spécifique des patients atteints de COVID-19 du CHU de Lille lors de l'année 2020 et 2021, selon la symptomatologie clinique des patients (symptomatique léger, modéré, sévère) et la corrélation avec la sérologie, pendant 6 mois post-infection.

Les objectifs poursuivis nous permettront de répondre aux problématiques suivantes :

Y a-t-il un maintien de l'immunité cellulaire T à distance de l'infection (moyen et long terme) ? Existe-t-il un lien entre l'immunité T spécifique et la sévérité de l'infection initiale au SARS-CoV-2 ? Les comorbidités ou facteurs de risque des patients influencent-ils les paramètres de l'immunité cellulaire ?

# Matériel et méthodes

---

## I. Mise au point de la technique ELISpot anti-SARS-CoV-2

### A. *Mise au point de la cohorte initiale*

Afin de mettre au point la cohorte pour tester et étudier la technique ELISpot COVID maison, une étude prospective a été réalisée au CHU de Lille, entre le 21 Avril et le 20 Mai 2020. Les patients ayant un diagnostic récent d'infection COVID-19, confirmée par une RT-PCR réalisée à partir d'un prélèvement respiratoire nasopharyngé, ont été inclus dans l'étude et classifiés selon leurs symptômes cliniques en 3 catégories :

- **Léger** (patients asymptomatiques ou symptomatiques sans gravité clinique, ne nécessitant pas d'hospitalisation)
- **Modéré** (patients symptomatiques requérant une hospitalisation  $\geq$  24h et une oxygénothérapie  $\leq$  3 L/min)
- **Sévère** (patients hospitalisés en soins intensifs et/ou réanimation et/ou requérant une oxygénothérapie  $>$  3 L/min)

Pour l'obtention de témoins négatifs, utilisés comme contrôles, des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) cryoconservées à partir d'échantillons de sang hépariné provenant de sujets non infectieux immunocompétents ont été recueillies avant la pandémie de COVID-19 (en 2018-2019 lors d'une étude POMI-AF NCT03376165, qui incluait des patients programmés pour une chirurgie cardiaque). Tous les échantillons de sérum provenant de ces sujets contrôles, étaient négatifs pour les anticorps anti-N, anti-S1 et anti-RBD du SARS-CoV-2.

### B. *Mise en place de la technique ELISpot COVID maison*

Fort de son expérience dans les tests ELISpot grâce à la mise en place d'une plateforme automatisée pour les tests IGRAs (*Interferon Gamma Release Assays*) dans le cadre du dépistage de la tuberculose latente, l'Institut d'immunologie du CHU de Lille a mis au point un

test ELISpot spécifique anti-SARS-CoV-2 « maison » afin de quantifier la réponse lymphocytaire T spécifique.

Ce test consiste à stimuler les PBMC isolées à partir d'échantillons de sang total des patients SARS-CoV-2 positifs, les laver, les compter puis ajouter une quantité standardisée de cellules à des pools de peptides chevauchants spécifiques de l'ensemble des séquences des protéines N, M et S du SARS-CoV-2. Les PBMC incubées avec ces antigènes vont permettre la stimulation des cellules T sensibilisées présentes. La réponse des cellules T à chaque protéine est mesurée simultanément dans des puits individuels. La cytokine IFN $\gamma$  sécrétée par les cellules T spécifiques est capturée par des anticorps spécifiques (Ac de capture), présents à la surface de la membrane à la base du puits (Figure 31). Un deuxième anticorps (Ac de révélation), conjugué à la phosphatase alcaline et dirigé vers un épitope différent sur la molécule d'IFN $\gamma$ , est ajouté et se lie à l'IFN $\gamma$  capturé sur la surface de la membrane. Tout conjugué non lié est éliminé par lavage. Un substrat soluble est ajouté dans chaque puits ; il est clivé par l'enzyme liée pour former une tache (bleue foncée) de précipité insoluble au site de la réaction. L'évaluation du nombre de taches obtenues fournit une mesure de l'abondance des cellules T effectrices anti-SARS-CoV-2 dans le sang périphérique.

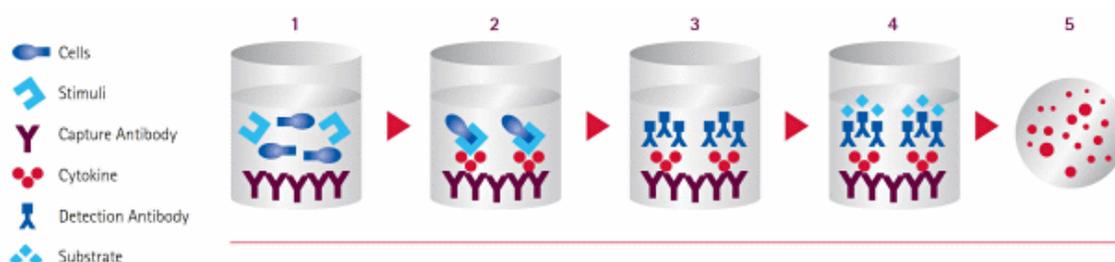


Figure 31 : Schéma représentant le contenu d'un puits lors de la technique ELISpot COVID (212).

### C. Protocole expérimental

Le test ELISpot COVID est réalisé à partir d'échantillons de sang total prélevés dans des tubes d'héparine de lithium sans gel séparateur, avec un volume minimal requis de 5 mL. Les tubes de sang total héparinés doivent parvenir à température ambiante en technique au maximum 32 heures après le prélèvement. Les tubes ayant un volume de sang total insuffisant ou parvenus au laboratoire au-delà du délai analytique requis, ont été refusés.

### **a. Préparation cellulaire**

Après homogénéisation par retournement, les tubes de sang total provenant des patients sont transférés dans des tubes Falcon identifiés au nom de chaque patient et le volume de sang total est relevé. 25µL de réactif T-Cell *Xtend*<sup>®</sup> (Oxford Immunotec) est rajouté par mL de sang. Les tubes Falcon sont ensuite homogénéisés par retournement, puis laissés incuber à température ambiante pendant 15 à 20 min. Après incubation, du milieu RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) 1640 (Gibco<sup>™</sup>) est ensuite ajouté à chaque tube Falcon pour compléter à 8 mL. Les tubes sont à nouveau homogénéisés par retournement.

### **b. Isolement des PBMC**

L'isolement des PBMC a été réalisé par centrifugation en gradient de densité Ficoll à l'aide des tubes Leucosep<sup>™</sup> Greiner Bio-One. Ces tubes stériles de 12 mL contiennent une barrière poreuse qui permet de verser l'échantillon de sang sur le milieu de séparation par gradient de densité. 5 mL de milieu de séparation des lymphocytes Pancoll Humain (PAN-Biotech), ont été ajoutés dans les tubes Leucosep<sup>™</sup> jusque sous la barrière poreuse. Les tubes Falcon précédemment dilués sont ensuite versés délicatement sur la paroi des tubes, puis ces derniers sont centrifugés 1000 g, 10 min, température ambiante, sans frein. Après centrifugation, la couche de PBMC est récupérée dans un autre tube Falcon, identifié au nom de chaque patient. Du milieu RPMI est ensuite ajouté à chaque tube Falcon pour compléter à 15 mL et remettre en suspension les cellules. Après homogénéisation par retournement, une nouvelle centrifugation à 600 g, 7 min est réalisée. Après la 2<sup>e</sup> centrifugation, le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est resuspendu avec 10 mL de milieu RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*, Gibco<sup>™</sup>). Une 3<sup>e</sup> centrifugation à 350 g, 7 min est réalisée. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est récupéré dans 900 µL de milieu sans sérum AIM-V<sup>™</sup> (Gibco<sup>™</sup>).

### **c. Numération de la préparation cellulaire**

Un tube à cytométrie est préparé avec 1,5 µL de CD45-Kro (Beckman-Coulter) et 50 µL de la suspension de PBMC précédemment obtenue. Après une incubation de 7 min à l'abri de la lumière, 200 µL de tampon PBS (*Phosphate Buffered Saline*) de Dulbecco (Eurobio Scientific)

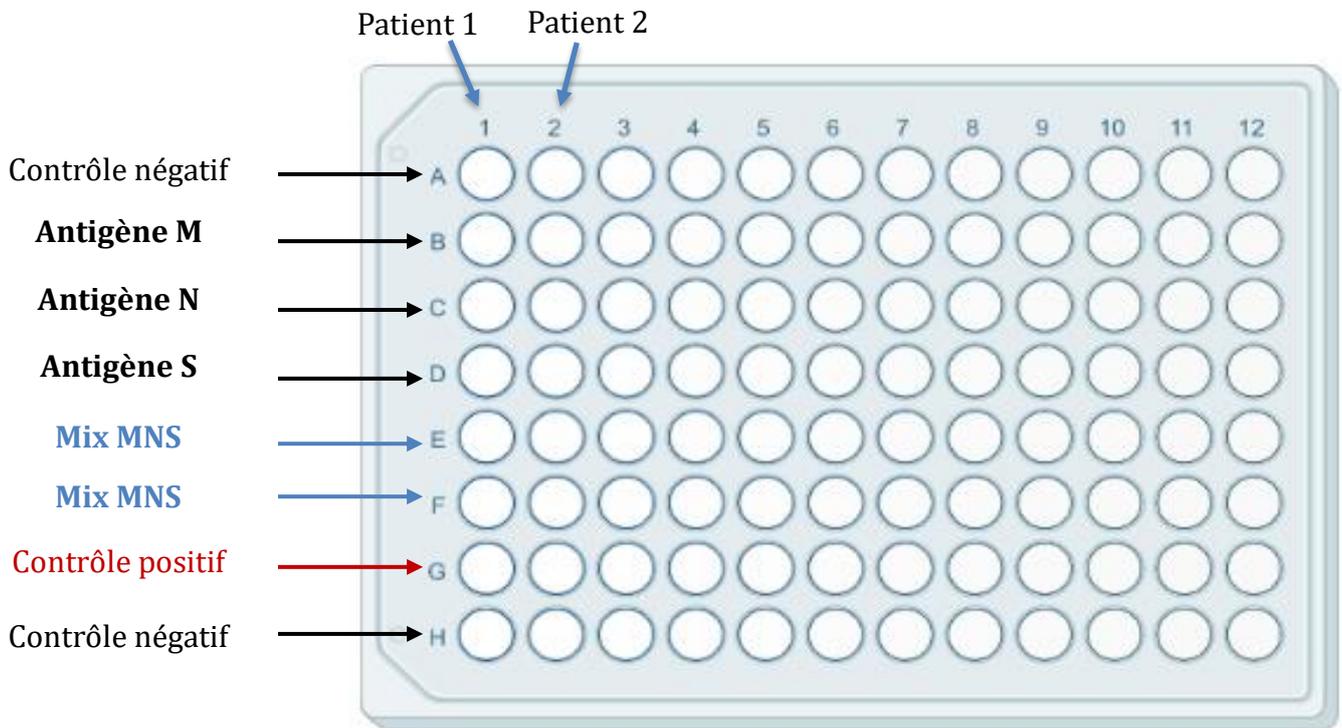
puis 50  $\mu\text{L}$  de billes Flow-Count™ sont successivement rajoutés dans le tube. Après vortex, la numération des PBMC est analysée sur le cytomètre Navios® (Beckman-Coulter). Afin d'obtenir une concentration de 2500 cellules/ $\mu\text{L}$ , une dilution avec du milieu AIM-V™ est nécessaire pour tous les tubes dont la concentration est supérieure à 2500 cellules/ $\mu\text{L}$  afin d'ajuster la concentration et préparer un volume de 1 mL. Toute concentration inférieure à 2000 cellules/ $\mu\text{L}$  est insuffisante pour réaliser le test et entraîne l'arrêt du test. Pour une concentration comprise entre 2000 et 2500 cellules/ $\mu\text{L}$ , aucune dilution n'est nécessaire. La suspension est prête à l'emploi.

#### **d. Préparation des antigènes**

Les pools de peptides chevauchants spécifiques recouvrant l'ensemble des séquences des protéines N, M et S du virus, ainsi qu'un mélange de ces peptides (appelé « mix MNS ») ont été utilisés comme antigènes à une concentration de 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (PepTivator® SARS-CoV-2 Prot\_M [ref 130-126-703], PepTivator® SARS-CoV-2 Prot\_N [ref 130-126-699], PepTivator® SARS-CoV-2 Prot\_S [ref 130-126-701], Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Allemagne). Les peptides de 15 acides aminés se chevauchent sur 11 acides aminés.

#### **e. Dépôt dans la plaque**

Les PBMC isolées sont placées dans des puits de microtitration où elles sont mises en présence d'un témoin de phytohématagglutinine (PHA) (un stimulateur mitogène indiquant la fonctionnalité des cellules), d'un témoin nul (tampon AIM-V™) ou de quatre groupes distincts d'antigènes du SARS-CoV-2 dérivés respectivement de la protéine Spike (S), protéine de membrane (M), protéine de nucléocapside (N) et un mix de ces trois protéines S, M et N. Le mix MNS a été déposé en duplicat. Les différents antigènes sont distribués pour un volume de 50  $\mu\text{L}$ /puits dans leurs puits respectifs, dans une plaque de microtitration 96 puits, se présentant sous forme de 12 bandes de 8 puits dans un cadre, recouverts d'un anticorps monoclonal murin anti-cytokine IFN $\gamma$  (T-SPOT.TB, Oxford Immunotec) (Figure 32). Enfin, la suspension finale (diluée ou pure) est distribuée dans chaque puits correspondant au patient. La plaque est ensuite incubée dans un incubateur humidifié à 37°C, avec 5% de CO $_2$ , pendant 19 à 20h.



**Figure 32 : Schéma de plaque de microtitration 96 puits utilisé pour le test ELISpot COVID maison.** Les colonnes 1 à 12 sont respectivement utilisées pour 12 patients (1 colonne/patient). Les lignes A à H contiennent respectivement le contrôle négatif, les antigènes M, N et S, le mix MNS en duplicat, le contrôle positif et le contrôle négatif. Le contrôle négatif est déposé en duplicat (lignes A et H), ne comportant que la suspension finale de PBMC du patient (100  $\mu$ L), diluée dans l'AIM-VTM (50  $\mu$ L). Le contrôle positif (ligne G) comprend la PHA, un stimulateur mitogène utilisé comme contrôle de la fonctionnalité des cellules. Les antigènes M, N et S sont déposés respectivement dans les lignes B, C et D (50  $\mu$ L). Le mix MNS est déposé en duplicat dans les lignes E et F (50  $\mu$ L). La suspension finale de PBMC de chaque patient est rajoutée dans les puits de sa colonne respective.

## f. Révélation

La plaque est retirée de l'incubateur et trois lavages successifs avec du PBS sont réalisés. 50  $\mu$ L de solution de réactif conjugué (Oxford Immunotec®) est ajouté dans chaque puits. Après incubation de la plaque entre 2 et 8°C pendant une heure, quatre lavages successifs au PBS sont réalisés et 50  $\mu$ L de solution de substrat chromogène est ajouté dans chaque puits. Après incubation de la plaque à température ambiante pendant 7 min, un lavage de la plaque à l'eau déionisée ou distillée est effectué pour arrêter la réaction de détection. La plaque est ensuite incubée pendant 4h dans une étuve à 37°C pour séchage. Des tâches deviennent visibles au fur et à mesure que la plaque sèche. Après séchage, la lecture de la plaque est réalisée par un système automatisé Lecteur CTL Reader série 6 (ImmunoSpot®) (Figure 33). Une image numérique est capturée. Les taches produites à la suite de la stimulation de l'antigène

apparaissent comme des taches larges, rondes et sombres appelées spots. Il est souvent observé un effet de gradient avec un centre plus sombre et une périphérie plus diffuse. Les artefacts non spécifiques qui peuvent se produire sont plus petits, moins intenses et de forme irrégulière (Figure 34). Chaque spot représentant quantitativement un lymphocyte T réactif spécifique de l'Ag mis dans le puits, est automatiquement compté par le lecteur CTL Reader série 6 (ImmunoSpot®). Les spots douteux sont retirés du décompte par l'automate mais peuvent également être retirés manuellement.

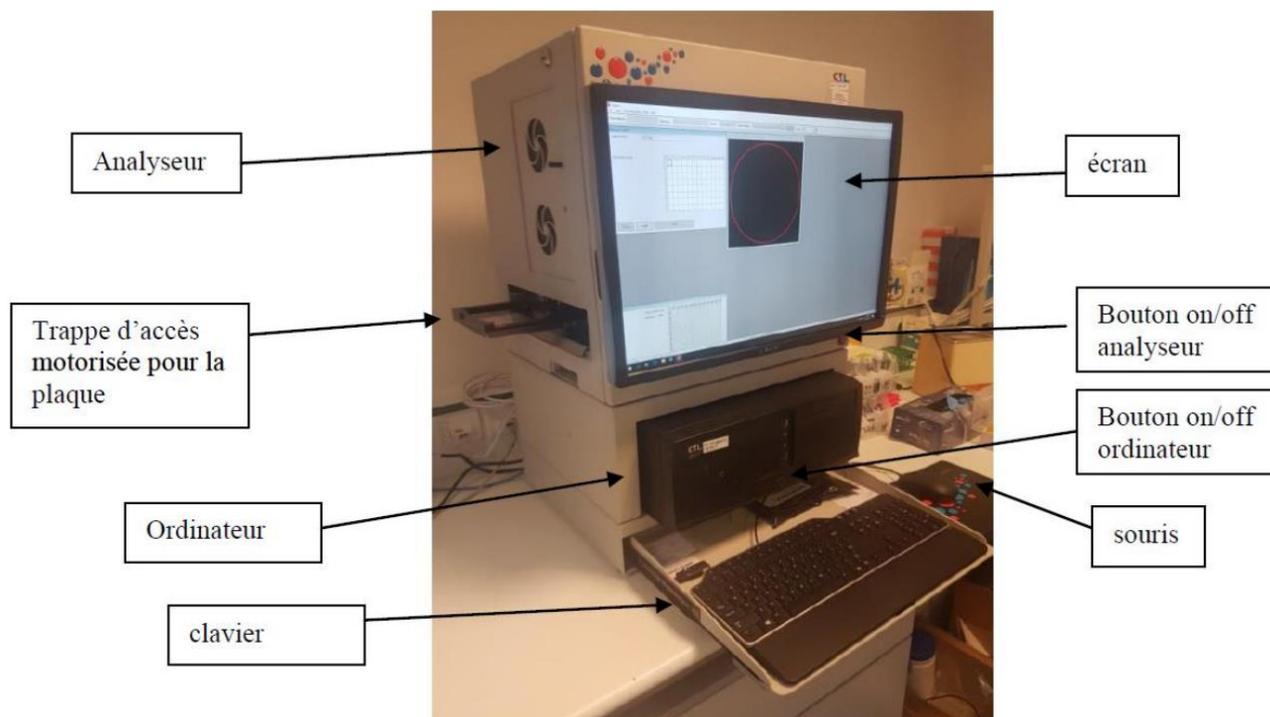


Figure 33: Photographie du lecteur CTL Reader série 6 (ImmunoSpot®) du laboratoire.

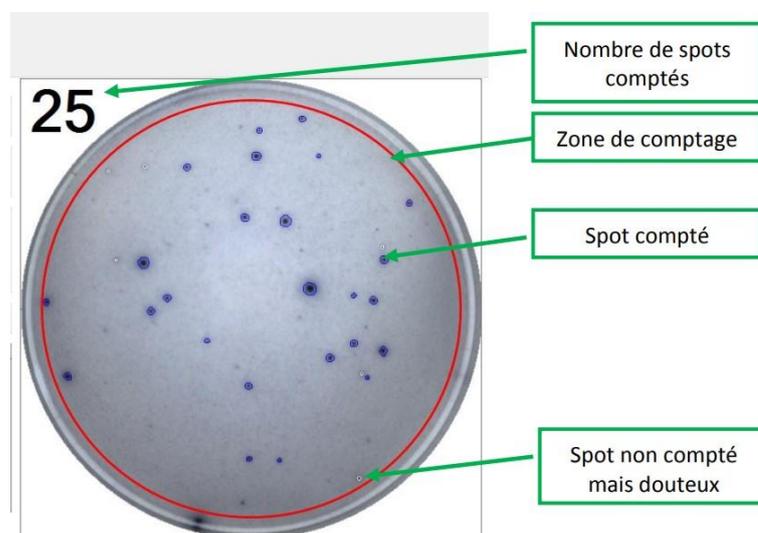


Figure 34: Exemple de lecture d'un puits par le lecteur CTL Reader série 6 (ImmunoSpot®).

## II. Étude de suivi de la réponse immunitaire

### A. *Inclusion des patients*

L'étude de suivi prospective appelée IMMUNOCOV a été réalisée au CHU de Lille, entre le 26 février 2020 et le 17 décembre 2020. Les critères d'inclusion sont les mêmes que ceux utilisés pour la mise en place du test ELISPOT maison, à savoir les cas confirmés de COVID-19 par RT-PCR. De la même manière que précédemment, une classification clinique selon la sévérité des symptômes a été réalisée selon les mêmes critères : symptomatologie légère, modérée ou sévère. Les patients ont été inclus dans le protocole clinico-biologique LICORNE (Lille CORonavirus Network) et ont donné leur consentement pour le recueil et l'utilisation de leurs données clinico-biologiques. L'étude IMMUNOCOV comporte les patients inclus dans le protocole LICORNE. Les patients ont été inclus à l'admission (J1) et une visite de suivi a été réalisée à J3, J7, J9, J14, J30, 3 mois et 6 mois du début des symptômes ou après sortie d'hospitalisation. À l'admission ainsi qu'à chaque point de visite, les tests ELISpot COVID et la sérologie COVID ont été réalisées, afin de suivre la cinétique de ces patients. Pour une homogénéité des données, les visites de suivi ont été regroupées en trois périodes :

- **V0** : Visite à 1 mois après le début des symptômes (30 Jours), comprenant les tests réalisés entre 30 +/- 15 Jours, soit un intervalle allant de 15 à 45 Jours.
- **V1** : Visite à 3 mois après le début des symptômes (90 Jours), comprenant les tests réalisés entre 90 +/- 30 Jours, soit un intervalle allant de 60 à 120 Jours.
- **V2** : Visite à 6 mois après le début des symptômes (180 Jours), comprenant les tests réalisés entre 180 +/- 30 Jours, soit un intervalle allant de 150 à 210 Jours.

### B. *Critères d'exclusion des patients*

Les critères d'exclusion retenus dans cette étude étaient :

- Les patients n'ayant pas signé le consentement, soit par impossibilité médicale ou refus de donner leur accord pour l'utilisation des données.
- Les patients dont la RT-PCR est négative, malgré une symptomatologie SARS-CoV-2 like (cas non confirmés).

- Les patients avec une RT-PCR positive, mais dont le volume du prélèvement sanguin ou les PBMC recueillies est insuffisant pour la réalisation du test ELISpot COVID.
- Les patients n'ayant pas de point de suivi et ne permettant pas de réaliser une cinétique des spots.

### C. Critères d'interprétation des résultats d'ELISpot COVID

L'interprétation des résultats d'ELISpot se fait selon l'algorithme de la Figure 35. En premier lieu, il est indispensable de vérifier les contrôles négatifs et positifs déposés pour chaque patient. Un contrôle négatif est valide s'il y a un nombre de spots inférieur à 10 dans le puits. Dans le protocole expérimental, un duplicat du contrôle négatif est déposé. Ainsi, la moyenne obtenue avec les duplicats est prise en compte et doit être <10 spots pour valider le test. Dans le cas contraire, le bruit de fond est considéré comme trop important et le résultat est jugé indéterminé. Les causes peuvent être dues par exemple, à une contamination d'un puits à l'autre lors de la manipulation. Dans ce cas, le test peut être renouvelé. Si le contrôle négatif est toujours indéterminé, la cause peut être intrinsèque au patient, qui réagit en absence de toute stimulation. De la même manière, pour le contrôle positif, un nombre minimum de 20 spots est fixé pour considérer le test valide. Dans le cas contraire, une erreur de manipulation peut être suspectée, comme l'absence de dépôt du mitogène PHA dans le puits. En cas de doute sur le dépôt de la PHA, le test peut être renouvelé. Une fois les contrôles négatifs et positifs valides, le test peut être interprété.

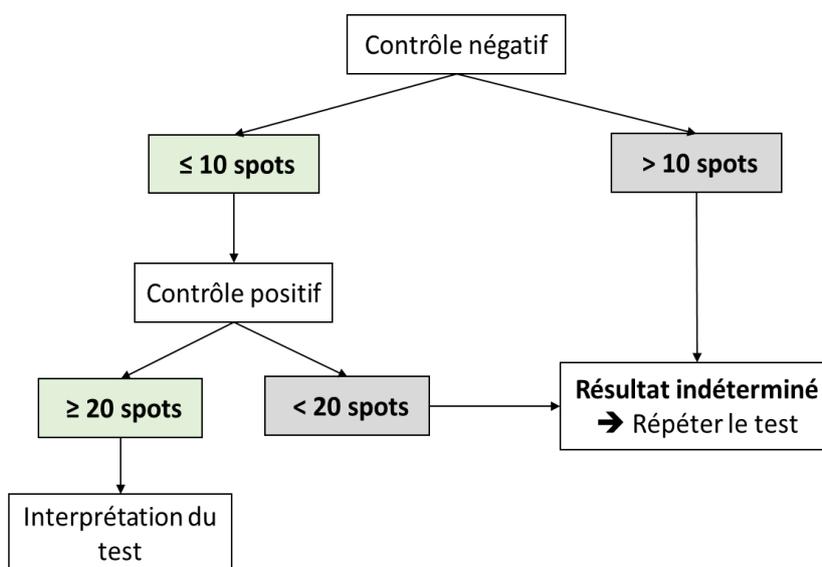


Figure 35: Algorithme d'interprétation du test ELISpot COVID maison.

### III. Recueil d'informations cliniques

Les critères épidémiologiques (sexe, âge) ainsi que les caractéristiques cliniques (symptômes et évolution clinique) ont été recueillis à partir des dossiers médicaux informatisés (Sillage®) et des systèmes informatiques du laboratoire (Molis®).

Les informations cliniques recueillies comme les comorbidités pouvant correspondre à des facteurs de risque tels que ci-dessous ont été extraits à partir du Case Report Form (CRF) :

- Les pathologies chroniques : les maladies cardio-vasculaires (l'hypertension artérielle, le diabète, l'insuffisance cardiaque, les antécédents d'accident vasculaire cérébral (AVC)), les maladies pulmonaires, rénales, la cirrhose, le cancer
- Le statut d'immunodépression (patient greffé, patient avec une hémopathie, infection au VIH, prise de traitement immunosuppresseur)
- Le statut tabagique
- L'obésité (via l'IMC)
- La grossesse

### IV. Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées par l'équipe de Biostatisticiens du CHU de Lille (M. Julien Labreuche, Pr. Alain Duhamel, Mme Valérie Deken).

Concernant la mise en place du test ELISpot COVID, les variables continues sont exprimées sous forme de médiane (intervalle interquartile IQR ou intervalle) et les variables catégorielles sous forme de nombres (pourcentage). Les comparaisons selon la gravité des patients atteints du SARS-CoV-2 ont été effectuées à l'aide du test de Kruskal-Wallis pour les variables continues (suivi des tests de Dunn post hoc) et du test du chi carré pour les variables catégorielles. La valeur seuil optimale pour le nombre de spots en réponse au mix MNS pour différencier les témoins sains des patients atteints du SARS-CoV-2 a été déterminée à l'aide de la courbe ROC en maximisant l'indice de Youden ; les valeurs de sensibilité et de spécificité de la valeur seuil optimale ont été calculées avec leurs intervalles de confiance à 95 % (IC à 95 %) (estimés à l'aide de la méthode exacte de Clopper-Pearson). Les tests statistiques ont été effectués au niveau  $\alpha$  bilatéral de 0,05.

Concernant l'étude de suivi de l'immunité (IMMUNOCOV), les variables qualitatives ont été décrites en termes de fréquences et de pourcentages. Les variables quantitatives ont été décrites par la moyenne et l'écart type ou par la médiane et l'intervalle interquartile en cas de distribution non Gaussienne. La normalité des distributions a été vérifiée graphiquement et à l'aide du test de Shapiro-Wilk.

Dans un premier temps, le nombre de spots en réponse aux Ag M, Ag S et mix MNS ont été comparés entre les trois visites (V0, V1 et V2) par un modèle linéaire mixte incluant le temps (visite) comme une variable catégorielle à 3 modalités, avec une matrice de covariance non structurée pour tenir compte de la corrélation entre les mesures répétées ; ce modèle permet également de prendre en compte les données manquantes sous l'hypothèse de données manquantes aléatoires. Les comparaisons deux à deux par rapport la première visite ont été réalisées à l'aide de contrastes linéaires. Pour satisfaire la normalité des résidus des modèles linéaires mixtes, une transformation logarithmique du nombre de spots a été utilisée.

Dans un second temps, les nombres de spots (Ag M, Ag S, mix MNS) ont été comparés entre les trois visites en tenant compte de la sévérité de la maladie en incluant dans le modèle linéaire mixte, le temps, la sévérité et l'interaction entre le temps et la sévérité ; les comparaisons post-hoc entre les visites selon chaque grade de sévérité, et les comparaisons post-hoc entre les grades de sévérité selon chaque visite ont été réalisées à l'aide de contrastes linéaires. Le niveau de significativité a été fixé à 5%. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel SAS (SAS Institute version 9.4). Les figures présentées dans ce mémoire ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 9.2.

# Résultats

La première partie des résultats explique la mise au point du test ELISpot COVID maison au sein de l'Institut d'immunologie. La deuxième partie des résultats correspond à l'utilisation de ce test dans le cadre du suivi de l'immunité T.

## I. Mise au point du test ELISpot COVID maison

### A. *Faisabilité du test*

#### a. **Caractéristiques de la population testée**

Afin de montrer la faisabilité du test ELISpot COVID maison, nous avons d'abord étudié une cohorte de 60 patients confirmés positifs au COVID-19 par RT-PCR et 31 témoins négatifs, prélevés avant la crise sanitaire du COVID-19. En suivant le protocole expérimental du test ELISpot COVID précédemment décrit, utilisant les pools de peptides M, N, S et le mix MNS, nous obtenons une quantification des lymphocytes T spécifiques réactifs aux peptides antigéniques du SARS-CoV-2, par l'apparition de spots d'IFN $\gamma$  chez les 60 patients atteints du SARS-CoV-2. Les principales caractéristiques des patients figurent dans le Tableau 3. Le délai médian (intervalle) entre le début des symptômes et le prélèvement était de 36 (IQR, *intervalle interquartile*, 10 – 70) jours (Tableau 3) et seuls 5 patients ont été prélevés avant J21. Les patients ont été classés selon leur forme clinique : *légère* (n=26), *modérée* (n=10) ou *sévère* (n=24). Les patients sévères étaient plus âgés, plus susceptibles d'être des hommes et ont été prélevés plus tard que les patients légers et modérés.

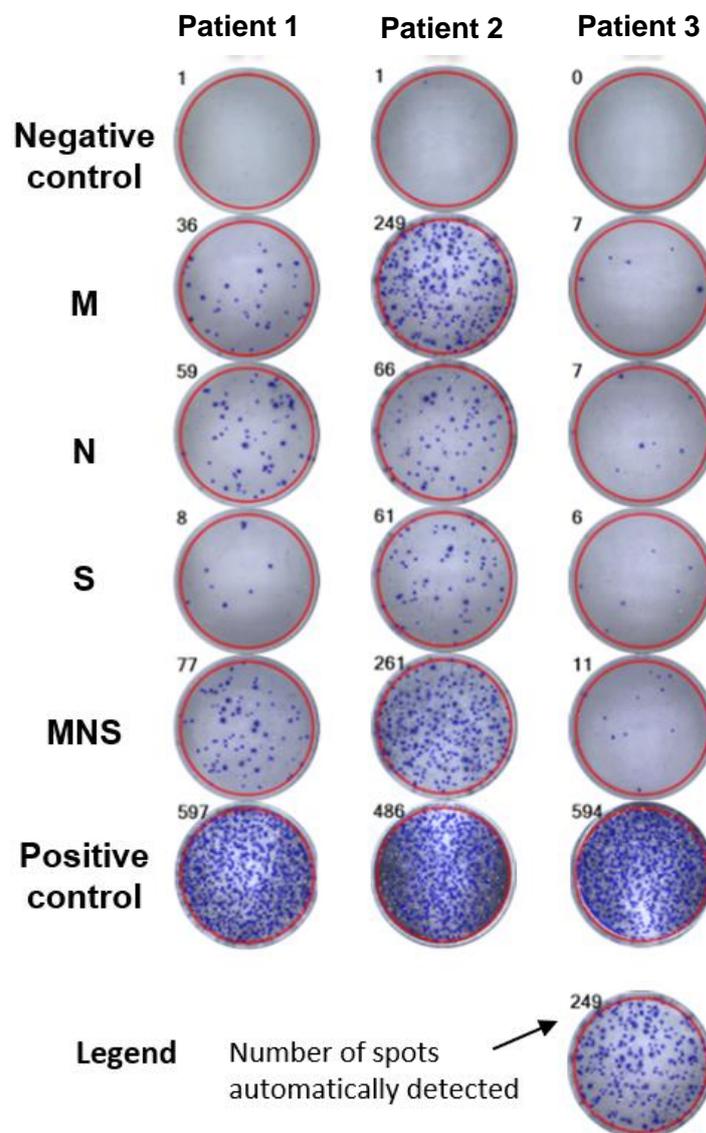
	Tous patients inclus (n=60)	Forme clinique légère (n=26)	Forme clinique modérée (n=10)	Forme clinique sévère (n=24)	p-value
Age (ans)	49 (20;92)	35 (29;47)	53 (37;64)	63 (51;72)	<0,0001
Sexe (masculin)	29 (48,3)	5 (19,2)	3 (30)	21 (87,5)	<0,0001
Délai après le début des symptômes					
Médiane (IQR)	36 (28;53)	32 (25;37)	34 (28;57)	52 (36;56)	0,001
Intervalle	10 – 70	10 – 59	15 – 70	13 – 64	

**Tableau 3: Principales caractéristiques des patients inclus lors de la réalisation du test ELISpot COVID**

Les données sont présentées sous forme de valeurs médianes (IQR, *intervalle interquartile*) en jours ou de valeurs n(%). Les *p-values* ont été calculées à l'aide du test de Kruskal-Wallis ou du test Chi-deux.

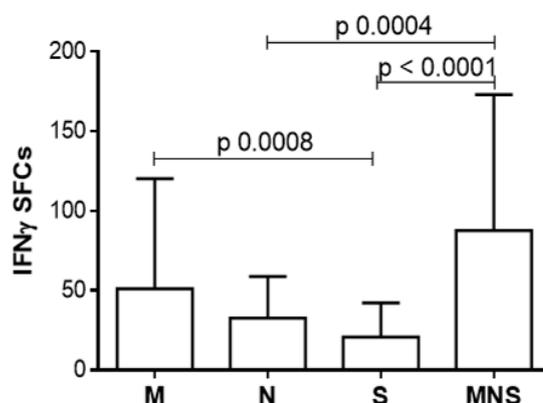
## b. Résultats du test ELISpot COVID maison

Les résultats du test ELISpot COVID maison sont mesurés de façon automatisée avec la présence de spots (tâches violettes) pour chacun des puits contenant les pools de peptides et le mix MNS, ainsi que dans les puits contenant les contrôles positif et négatif. Il est observé une hétérogénéité de réponse avec des variations du nombre de spots d'un pool de peptides à un autre chez un patient donné, ainsi que selon les patients. La Figure 36 permet de visualiser cette hétérogénéité de réponse avec l'exemple des résultats ELISpot COVID de trois patients.



**Figure 36 : Détection automatisée des spots IFN $\gamma$  dans les puits après 16 à 20h de stimulation. Illustration de trois schémas représentatifs de réponse.** Negative control : Témoin négatif (puits sans antigène/mitogène). Positive control : Témoin positif (puits avec PHA). M : Antigène issu de la protéine M. N : Antigène issu de la protéine N. S : Antigène issu de la protéine S. MNS : Mélange des 3 protéines M, N et S. Les trois patients testés présentent une réponse adaptative au SARS-CoV-2.

Parmi les différents pools de peptides testés, il a été détecté un nombre de spots significativement plus important pour l'antigène M ( $p=0.0008$ ) comparativement aux antigènes N et S. Ainsi il est observé une amplitude de réponse plus élevée avec le pool de peptides M (Figure 37). De même, il y a un nombre de spots significativement plus important pour le mix MNS ( $p<0.001$  pour toutes les comparaisons), comparativement à chacun des pools de peptides seuls (Ag M, Ag N, Ag S), ce qui semble montrer que le mix MNS a induit la réponse de lymphocytes T *in vitro* la plus élevée par rapport à chacun des pools de peptides pris séparément.



**Figure 37 : Comparaison du nombre de spots IFN $\gamma$ -SFCs (*Spot Forming Cells*) détectés selon l'antigène (pools de peptide M, N, S ou mix MNS) testé.**

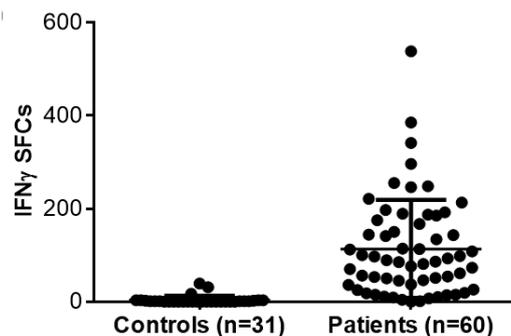
Les données sont présentées sous forme de valeurs médianes (+IQR) et de *P-values* comparant les antigènes testés à partir des tests de Dunn (post hoc pour le test de Kruskal-Wallis). *P* significatif si  $p<0.05$ .

## **B. Évaluation de la sensibilité et spécificité du test ELISpot COVID**

### **a. Détermination de la sensibilité, spécificité et du seuil de positivité**

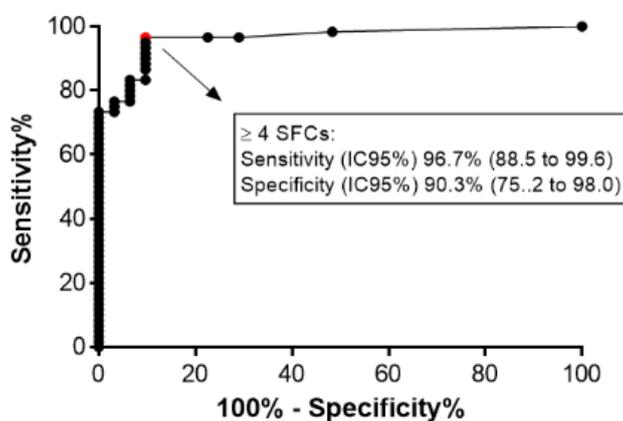
La sensibilité et la spécificité sont des propriétés permettant de déterminer la capacité d'un test à catégoriser les patients. La sensibilité est déterminée sur la population de patients dont le statut « malade » est confirmé par la RT-PCR COVID, soit sur 60 patients. Il s'agit de la probabilité d'avoir un test ELISpot positif chez ces patients (vrais positifs), porteurs d'une infection à SARS-CoV-2. La spécificité est déterminée sur la population de patients dont le statut « non malade » est connu, soit sur 31 témoins négatifs (contrôles). Il s'agit de la probabilité d'avoir un test ELISpot négatif chez ces témoins (vrais négatifs), non porteurs d'une infection à SARS-CoV-2.

Parmi les 60 patients « malades », des spots représentant les lymphocytes T réactifs contre les Ag M, N, S et le mix MNS ont été détectés chez  $n = 60$  (100%),  $n = 56$  (93,3%),  $n = 55$  (91,7%) et  $n = 58$  (96,7 %), respectivement. Nous avons testé 31 prélèvements de PBMC cryoconservés et collectés avant la pandémie de COVID-19 (échantillons témoins) en utilisant le mix MNS (Figure 38). Trois des échantillons de PBMC (9,7 %) ont été testés positifs pour les lymphocytes T réactifs contre le mix MNS.



**Figure 38 : Nombre de spots détectés par le test ELISpot COVID maison en réponse au mix MNS, chez les patients SARS-CoV-2 confirmés et les contrôles (témoins négatifs). IFN $\gamma$  SFCs: Interferon  $\gamma$  Spot Forming Cells**

À partir de la courbe ROC, représentée dans la Figure 39, nous avons estimé qu'un nombre de spots (IFN $\gamma$ -SFCs)  $\geq 4$  était une valeur de seuil optimale, nous permettant de fixer les valeurs de sensibilité et spécificité. Parmi les 60 patients confirmés positifs, 58 avaient un nombre de spots supérieur ou égal à la valeur seuil fixée (seuil à 4 spots), soit une sensibilité à 96,7% avec un intervalle de confiance à 95% (IC95%) entre 88,5 – 99,6%. Sur 31 contrôles, 28 ont obtenu un nombre de spots inférieur à 4, soit une spécificité à 90,3% avec un IC95% entre 75,2 – 98,0%.



**Figure 39 : Courbe ROC du test ELISpot COVID maison utilisant le mix MNS. La courbe ROC permet de fixer un seuil optimal à 4 SFCs.**

Ces résultats de sensibilité et spécificité ont été confirmés par la suite dans une cohorte additionnelle de 112 patients confirmés SARS-CoV-2 positifs, en utilisant le mix MNS. La courbe ROC appliquée à cette cohorte de confirmation a donné une sensibilité similaire de 95,5 % (IC à 95 %, 89,9–98,5 %) pour un seuil  $\geq 4$  spots.

## b. Interprétation biologique des résultats d'ELISpot COVID

L'interprétation biologique des résultats d'ELISpot COVID se fait selon l'algorithme de la Figure 40. Après la vérification des contrôles négatif et positif selon la procédure détaillée précédemment, le test peut être interprété avec le nombre de spots du mix MNS. De la même manière que pour le contrôle négatif, un duplicat du mix MNS étant déposé, c'est la moyenne du nombre de spots dans les deux duplicats qui est prise en compte pour l'interprétation. Le seuil de 4 spots précédemment fixé par la courbe ROC est pris en compte. Si la moyenne des puits contenant le mix MNS est supérieure ou égale à 4 spots, le test ELISpot est considéré positif ; négatif dans le cas contraire. Une réponse positive à l'ELISpot signifie que le patient présente une réponse T anti SARS-CoV-2. Inversement, en cas de réponse négative, il est considéré une absence de réponse T anti SARS-CoV-2 chez le patient. L'utilisation de cet algorithme d'interprétation nous permet d'étudier et suivre quantitativement la cinétique des spots et la réponse T anti SARS-CoV-2 au cours du temps.

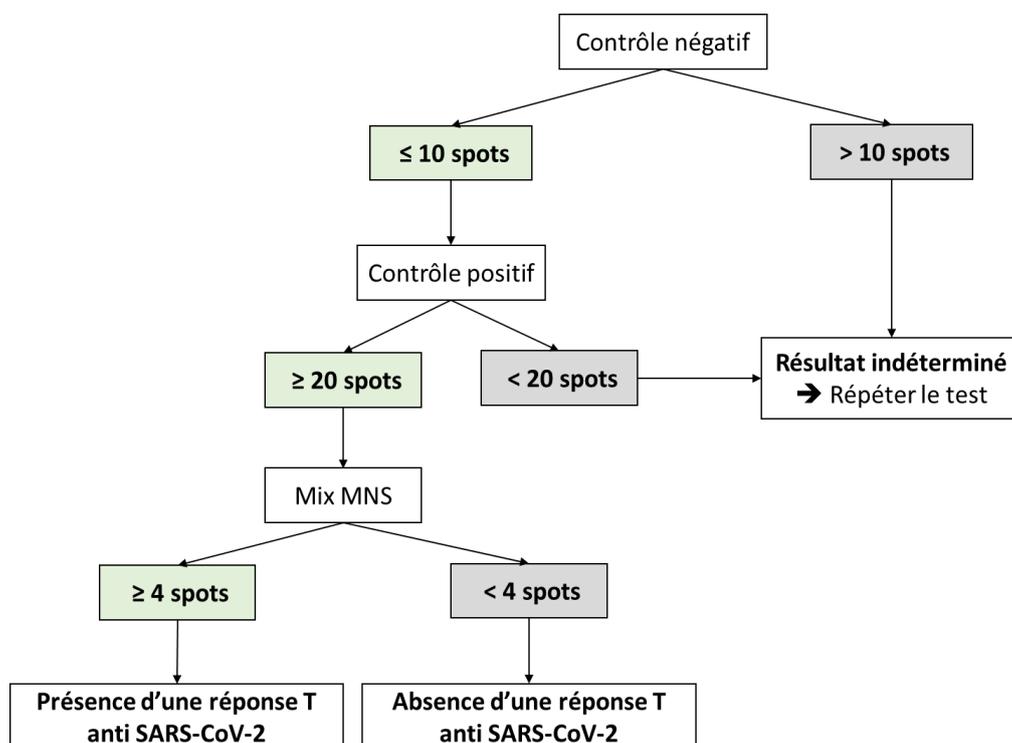
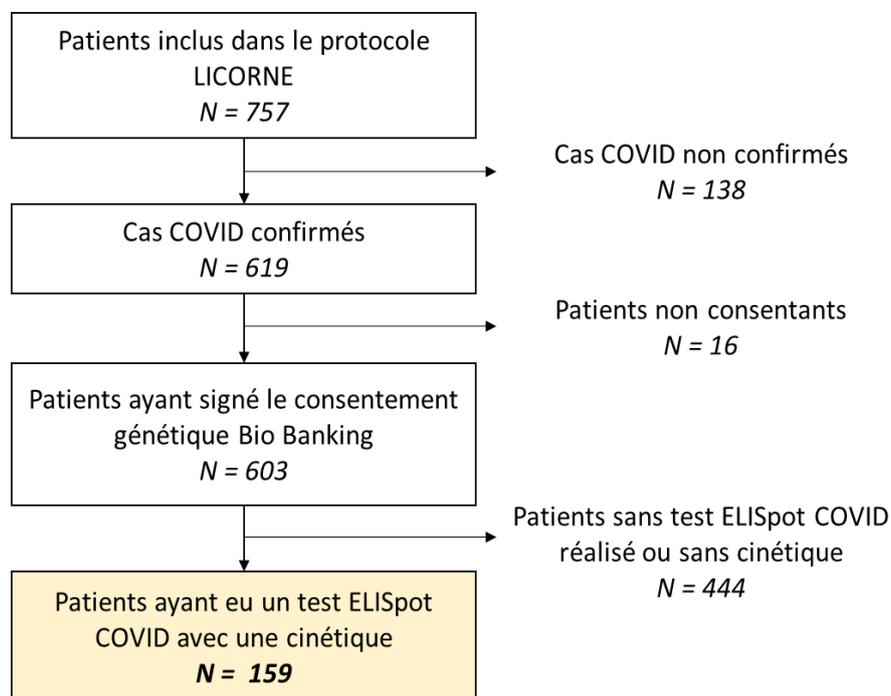


Figure 40: Algorithme d'interprétation du test ELISpot COVID maison.

## II. Suivi de l'immunité cellulaire avec le test ELISpot COVID

### A. Population d'étude

Afin de suivre l'immunité cellulaire avec le test ELISpot COVID mis en place par le laboratoire, une cohorte de patients issue du protocole LICORNE a été étudiée. Au total, 159 patients ont été inclus dans l'étude de suivi de l'immunité cellulaire appelée IMMUNOCOV. Tous les patients ne rentrant pas dans les critères d'inclusion ont été écartés de l'étude IMMUNOCOV, selon l'organigramme ci-dessous (Figure 41).



**Figure 41: Organigramme de l'inclusion des patients dans l'étude IMMUNOCOV.**

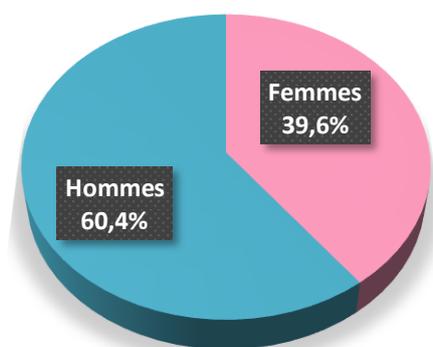
Les patients ont été inclus de manière prospective, depuis le 26 février 2020 correspondant à la première vague épidémique de COVID-19, jusqu'au 17 décembre 2020. Durant cette période, 757 patients ont été inclus dans le protocole LICORNE, dont 619 (82%) ont eu un diagnostic clinique de COVID-19 confirmé par une RT-PCR COVID-19 positive. Sur les 619 cas COVID confirmés, 603 (97%) ont signé le consentement génétique Bio Banking nous permettant le recueil et l'utilisation des données clinico-biologiques. Sur les 603 patients consentants, seuls 159 (26%) ont eu un test ELISpot COVID avec une cinétique, permettant le suivi de l'immunité cellulaire jusqu'à 6 mois post-infection.

Les 444 patients (74%) non inclus dans la population d'étude ont été écartés soit par :

- Absence de prélèvement pour un test ELISpot COVID pendant toute la durée d'inclusion
- Réalisation d'un seul test ELISpot COVID ne permettant pas d'étude cinétique pour diverses raisons (décès du patient dans le mois suivant l'infection, prélèvement avec une quantité de PBMC insuffisante pour la réalisation du test, pas de cinétique à long terme).

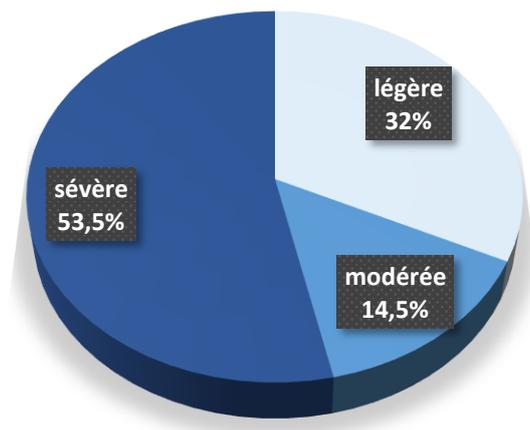
## **B. Caractéristiques des patients**

Sur les 159 patients de la cohorte, 96 sont de sexe masculin, et 63 de sexe féminin, représentant respectivement, 60,4% et 39,6% de la population d'étude (Figure 42). Le sex ratio Hommes/Femmes est 1,52.



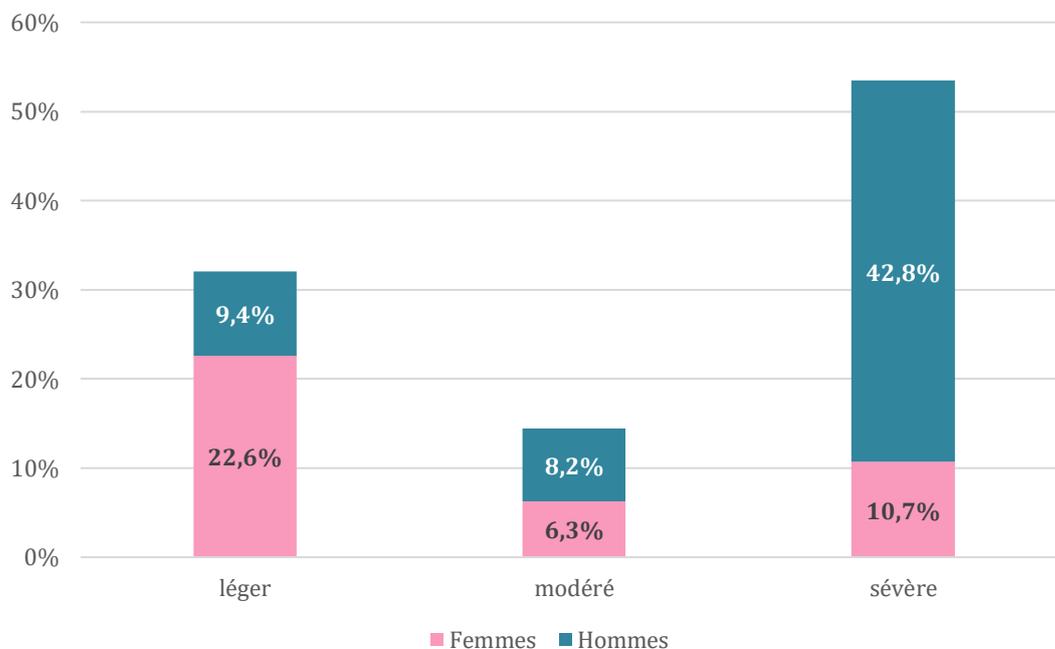
**Figure 42: Répartition des patients selon le sexe.**

Les 159 patients ont ensuite été répartis en trois catégories selon leur forme clinique à l'admission : *légère*, *modérée* ou *sévère* (Figure 43). Sur les 159 patients inclus, 51 avaient une forme clinique légère, 23 avaient une forme modérée et 85 une forme sévère, représentant 32%, 14,5% et 53,5% respectivement. Ainsi plus de la moitié des patients inclus présentaient à l'admission une infection COVID-19 sévère, et un tiers des patients avaient une infection COVID-19 légère.



**Figure 43: Répartition des patients selon la forme clinique (légère, modérée ou sévère).**

La répartition des hommes et des femmes selon la forme clinique est représentée dans la Figure 44 ci-dessous :



**Figure 44: Répartition des hommes et des femmes dans chaque groupe clinique.**

Les hommes semblent être plus atteints par une forme sévère de COVID-19 que les femmes, alors que les femmes semblent plutôt avoir une forme légère de la maladie.

Les caractéristiques cliniques d'intérêt des patients IMMUNOCOV sont présentées dans le Tableau 4.

Variables			Classification forme clinique			
Caractéristique	Unité	Modalités	Tous patients inclus N=159	Légère N=51	Modérée N=23	Sévère N=85
<b>Sexe</b>	N(%)	Homme	96/159 (60.4)	15/51 (29.4)	13/23 (56.5)	68/85 (80.0)
		Femme	63/159 (39.6)	36/51 (70.6)	10/23 (43.5)	17/85 (20.0)
<b>Age</b>	N	N	159	51	23	85
		Moyenne ± Ecart-type	52.4 ± 17.0	34.6 ± 10.4	58.7 ± 14.1	61.3 ± 12.0
		Médiane (IQR)	54.0 (37.0 ; 66.0)	30.0 (27.0 ; 44.0)	60.0 (48.0 ; 71.0)	63.0 (53.0 ; 71.0)
		Minimum   Maximum	21.0   82.0	22.0   60.0	28.0   80.0	21.0   82.0
<b>IMC</b>	N(%)	IMC < 25kg/m <sup>2</sup>	17/138 (12.3)	1/34 (2.9)	8/21 (38.1)	8/83 (9.6)
		25 ≤ IMC < 30 kg/m <sup>2</sup>	60/138 (43.5)	30/34 (88.2)	4/21 (19.0)	26/83 (31.3)
		30 ≤ IMC < 35 kg/m <sup>2</sup>	38/138 (27.5)	3/34 (8.8)	6/21 (28.6)	29/83 (34.9)
		35 ≤ IMC < 40 kg/m <sup>2</sup>	14/138 (10.1)	0/34 (0.0)	1/21 (4.8)	13/83 (15.7)
		IMC ≥ 40 kg/m <sup>2</sup>	9/138 (6.5)	0/34 (0.0)	2/21 (9.5)	7/83 (8.4)
		Données manquantes	21	17	2	2
<b>Hypertension artérielle traitée</b>	N(%)	Non	102/159 (64.2)	49/51 (96.1)	10/23 (43.5)	43/85 (50.6)
		Oui	57/159 (35.8)	2/51 (3.9)	13/23 (56.5)	42/85 (49.4)
<b>Antécédents d'AVC</b>	N(%)	Non	156/159 (98.1)	51/51 (100.0)	22/23 (95.7)	83/85 (97.6)
		Oui	3/159 (1.9)	0/51 (0.0)	1/23 (4.3)	2/85 (2.4)
<b>Insuffisance cardiaque chronique</b>	N(%)	Non	154/155 (99.4)	51/51 (100.0)	23/23 (100.0)	80/81 (98.8)
		Oui	1/155 (0.6)	0/51 (0.0)	0/23 (0.0)	1/81 (1.2)
		Données manquantes	4	0	0	4
<b>Diabète</b>	N(%)	Non	127/158 (80.4)	50/51 (98.0)	16/23 (69.6)	61/84 (72.6)
		Oui	31/158 (19.6)	1/51 (2.0)	7/23 (30.4)	23/84 (27.4)
		Données manquantes	1	0	0	1
<b>Néoplasie maligne active</b>	N(%)	Non	158/159 (99.4)	51/51 (100.0)	23/23 (100.0)	84/85 (98.8)
		Oui	1/159 (0.6)	0/51 (0.0)	0/23 (0.0)	1/85 (1.2)
<b>Maladie pulmonaire chronique</b>	N(%)	Non	136/158 (86.1)	46/51 (90.2)	23/23 (100.0)	67/84 (79.8)
		Oui	22/158 (13.9)	5/51 (9.8)	0/23 (0.0)	17/84 (20.2)
		Données manquantes	1	0	0	1
<b>Maladie rénale chronique</b>	N(%)	Non	151/157 (96.2)	50/51 (98.0)	20/22 (90.9)	81/84 (96.4)
		Oui	6/157 (3.8)	1/51 (2.0)	2/22 (9.1)	3/84 (3.6)
		Données manquantes	2	0	1	1
<b>Cirrhose</b>	N(%)	Non	159/159 (100.0)	51/51 (100.0)	23/23 (100.0)	85/85 (100.0)
<b>Immunodépression médicamenteuse</b>	N(%)	Non	154/158 (97.5)	49/51 (96.1)	22/23 (95.7)	83/84 (98.8)
		Oui	4/158 (2.5)	2/51 (3.9)	1/23 (4.3)	1/84 (1.2)
		Données manquantes	1	0	0	1
<b>Immunodépression liée à une infection VIH</b>	N(%)	Non	158/158 (100.0)	51/51 (100.0)	23/23 (100.0)	84/84 (100.0)
		Données manquantes	1	0	0	1
<b>Immunodépression consécutive à une greffe</b>	N(%)	Non	154/158 (97.5)	51/51 (100.0)	20/23 (87.0)	83/84 (98.8)
		Oui	4/158 (2.5)	0/51 (0.0)	3/23 (13.0)	1/84 (1.2)
		Données manquantes	1	0	0	1
<b>Immunodépression liée à hémopathie maligne</b>	N(%)	Non	157/158 (99.4)	51/51 (100.0)	23/23 (100.0)	83/84 (98.8)
		Oui	1/158 (0.6)	0/51 (0.0)	0/23 (0.0)	1/84 (1.2)
		Données manquantes	1	0	0	1

Variables			Classification forme clinique			
Caractéristique	Unité	Modalités	Tous patients inclus N=159	Légère N=51	Modérée N=23	Sévère N=85
Tabagisme	N(%)	Non-fumeur	67/116 (57.8)	23/31 (74.2)	15/20 (75.0)	29/65 (44.6)
		Actif	10/116 (8.6)	6/31 (19.4)	1/20 (5.0)	3/65 (4.6)
		Sevré	39/116 (33.6)	2/31 (6.5)	4/20 (20.0)	33/65 (50.8)
		Données manquantes	43	20	3	20
Grossesse	N(%)	Non	63/63 (100.0)	36/36 (100.0)	10/10 (100.0)	17/17 (100.0)

**Tableau 4: Principales caractéristiques cliniques d'intérêt des patients inclus dans IMMUNOCOVID.**  
Les données sont présentées sous forme de valeurs *N (%)*. IQR : *intervalle interquartile* (25<sup>e</sup> percentile ; 75<sup>e</sup> percentile).

### C. Résultats de suivi du nombre de spots selon le temps et la forme clinique

Dans cette partie, seuls les résultats du suivi du nombre de spots avec l'Ag M, l'Ag S et le mix MNS sont présentés. Le suivi du nombre de spots avec l'Ag N n'a pas été réalisé sur toute la durée de l'étude, entraînant un nombre important de données manquantes ne permettant pas l'analyse statistique.

#### a. Suivi du nombre de spots en fonction du temps

Les visites de suivi des patients ont été regroupées en V0, V1 et V2 comme décrit précédemment. A la visite V0, 124 patients sur 159 (78%) étaient présents, contre 131 (82,4%) à V1 et 91 (57,2%) à la dernière visite V2. La distribution des délais de prélèvements depuis le début des symptômes est présentée dans le Tableau 5.

	V0 (n=124)	V1 (n=131)	V2 (n=91)
Délai après le début des symptômes (jours)			
Médiane (IQR)	37 (33;39)	98 (94;101)	186 (181;208)
Intervalle	15 – 45	63 – 113	181 – 208

**Tableau 5: Distribution des délais de prélèvements des patients IMMUNOCOVID en fonction des visites.** Les données sont présentées sous forme de valeurs *n*. IQR : *intervalle interquartile* (25<sup>e</sup> percentile ; 75<sup>e</sup> percentile). L'intervalle comprend la valeur minimale et maximale du nombre de jours.

Comme montré sur la Figure 45, le nombre de spots avec l'Ag M diminue au cours du temps ( $p < 0.0001$ ), avec un nombre plus faible (test post-hoc,  $p < 0.0001$ ) à V1 (médiane=39 ; IQR, 20 à 82) et à V2 (médiane=23 ; IQR, 11 à 59) comparativement à V0 (médiane=74 ; IQR, 35 à 134).

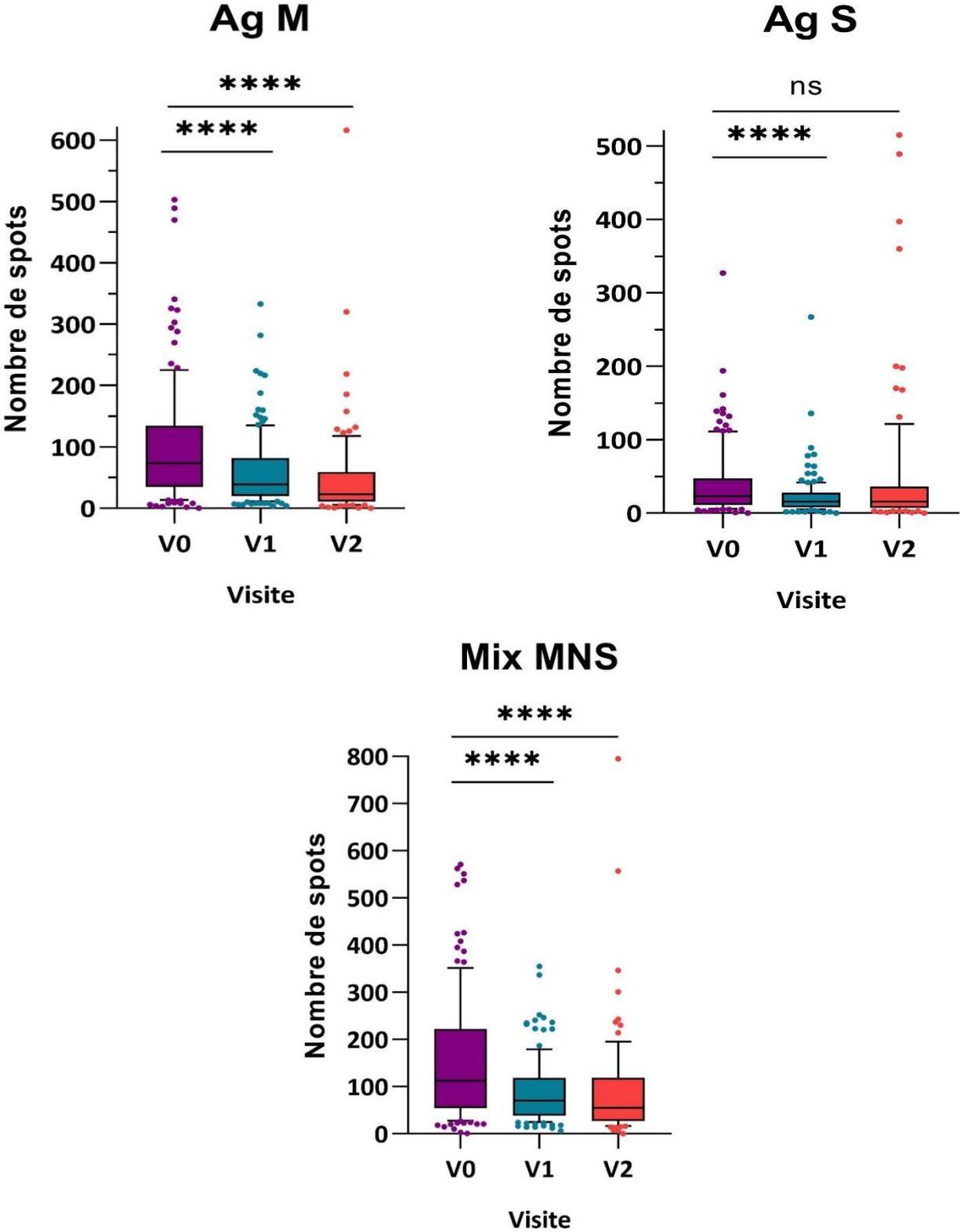


Figure 45: Distribution graphique du nombre de spots avec l'Ag M, l'Ag S et le mix MNS selon les visites (V0, V1, V2). La significativité des tests post-hoc est représentée comme ns : non significatif et P significatif si \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$  ou \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ .

Concernant l'Ag S, le nombre de spots diminue à V1 (médiane=16 ; IQR : 8 à 28) ( $p<0.0001$ ), mais reste stable à V2 (médiane=16 ; IQR, 7 à 36) comparativement à V0 (médiane=23 ; IQR, 12 à 47) (test post-hoc,  $p<0.0001$  pour V1 et  $p=0.0596$  pour V2).

Concernant le mix MNS, le nombre de spots diminue au cours du temps ( $p<0.001$ ), avec un nombre plus faible (test post-hoc,  $p<0.001$ ) à V1 (médiane=39 ; IQR, 20 à 82) et à V2 (médiane=23 ; IQR, 11 à 59) comparativement à V0 (médiane=74 ; IQR, 35 à 134) (Tableau 6).

	V0 (n=124)	V1 (n=131)	V2 (n=91)
Ag M			
Médiane (IQR)	74 (35;134)	39 (20;82)	23 (11;59)
Intervalle	0 – 503	4 – 333	0 – 616
Ag S			
Médiane (IQR)	23 (12;47)	16 (8;28)	16 (7;36)
Intervalle	0 – 327	0 – 267	0 – 515
Mix MNS			
Médiane (IQR)	112 (55;222)	70 (38;118)	55 (27;119)
Intervalle	1 – 571	6 – 355	0 – 795

**Tableau 6: Caractéristiques de la distribution du nombre de spots selon l'Ag utilisé pour la stimulation et les visites, et selon la forme clinique.**

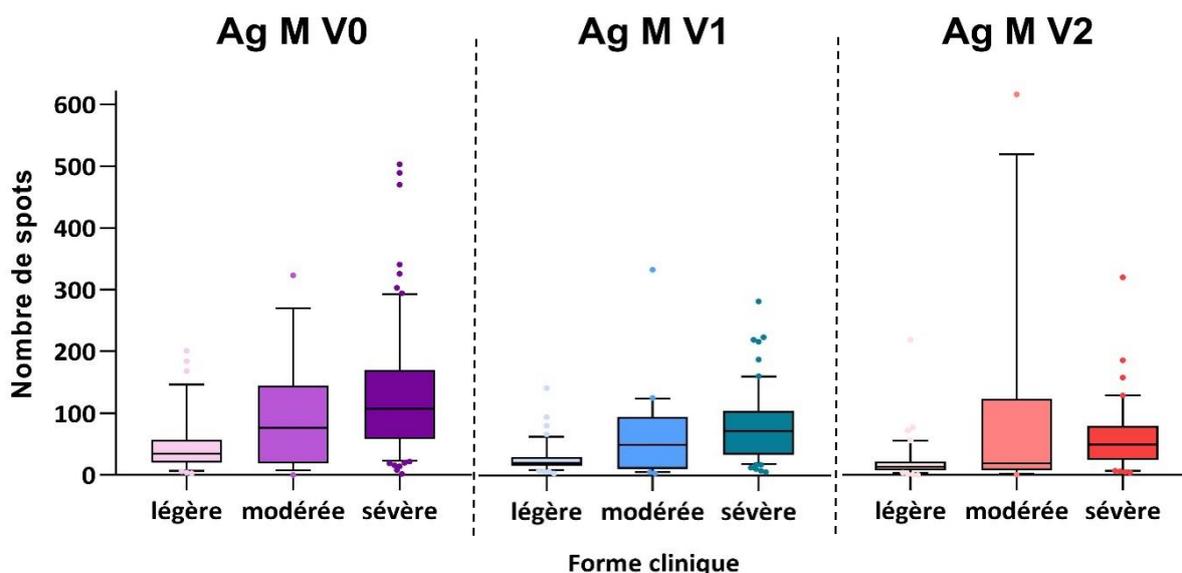
Les données sont présentées sous forme de valeurs médianes (IQR, *intervalle interquartile*). L'intervalle comprend la valeur minimale et maximale du nombre de spots.

## b. Suivi du nombre de spots selon la forme clinique

En stratifiant l'analyse selon la forme clinique de la maladie (légère, modérée ou sévère), l'évolution du nombre de spots avec l'Ag M n'est pas différente selon la forme clinique ( $p$  d'interaction=0.93), avec une différence significative entre les trois visites, quel que soit la forme clinique ( $p<0.001$  pour les formes légères et sévères, et  $p=0.018$  pour les formes modérées).

Comme montré sur la Figure 46, le nombre de spots avec l'Ag M diffère significativement selon la forme clinique de la maladie ( $p<0.001$ ) quel que soit le temps de suivi, avec un nombre plus important pour les formes sévères. Les tests post-hoc deux à deux mettent en évidence une différence significative entre les formes sévères et légères quel que soit le temps ( $p<0.001$  pour toute les comparaisons), entre les formes sévères et modérés aux deux premières visites V0 et V1 ( $p<0.05$ ), et entre les formes modérées et légères à la visite V2 ( $p=0.039$ ).

De même, en comparant le nombre de spots avec l'Ag M aux cours des différentes visites (V0, V1 et V2) dans une même forme clinique, les tests post-hoc deux à deux mettent en évidence une différence significative du nombre de spots entre la première visite V0 et la dernière visite V2 quel que soit le groupe clinique ( $p < 0.001$  pour les formes légères et sévères,  $p = 0.006$  pour les formes modérées) ainsi qu'entre la première visite V0 et la deuxième V1, pour les formes légères ( $p = 0.012$ ) et sévères ( $p < 0.001$ ), mais pas pour les formes modérées.



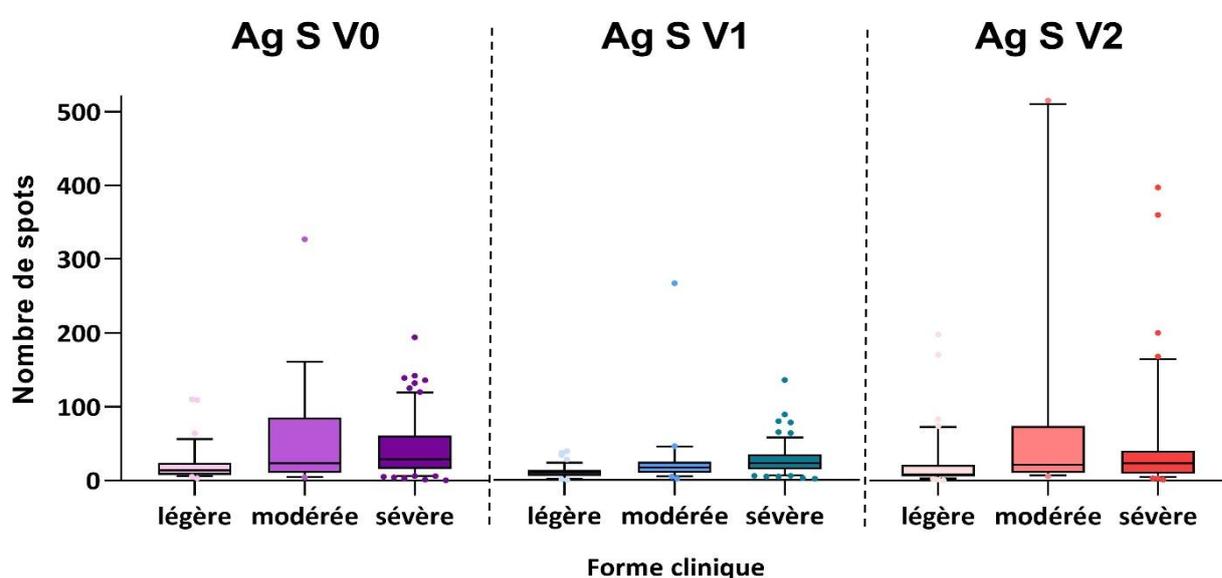
**Figure 46: Distribution du nombre de spots en réponse à l'Ag M selon la forme clinique par visite.** V0, V1 et V2 correspondent aux temps de visite. La boîte à moustache représente le quartile 1, la médiane et le quartile 3. Les moustaches représentent les 10<sup>e</sup> et 90<sup>e</sup> percentiles.

Concernant l'Ag S, l'évolution du nombre de spots n'est pas différente selon la forme clinique ( $p$  d'interaction=0.64), avec une différence significative entre les trois visites pour les formes légères et sévères ( $p < 0.001$  pour les formes légères et  $p = 0.031$  pour les formes sévères), mais sans différence significative entre les trois visites pour les formes modérées ( $p = 0.135$ ).

Comme montré sur la Figure 47, le nombre de spots avec l'Ag S diffère significativement selon la forme clinique de la maladie ( $p < 0.001$ ) quel que soit le temps de suivi. Les tests post-hoc deux à deux mettaient en évidence une différence significative entre les formes sévères et légères quel que soit le temps de visite ( $p < 0.005$  pour V0,  $p < 0.001$  pour V1,  $p = 0.016$  pour V2), et entre les formes légères et modérées à la visite V2 ( $p = 0.003$ ), mais pas de différence

significative entre les formes modérées et sévères quel que soit le temps de visite ( $p > 0.05$  pour toutes les comparaisons).

De même, en comparant le nombre de spots en réponse à l'Ag S aux cours des différentes visites (V0, V1 et V2) dans une même forme clinique, les tests post-hoc deux à deux mettent en évidence une différence significative du nombre de spots entre la première visite V0 et la deuxième V1, pour les formes légères ( $p < 0.001$ ) et sévères ( $p = 0.009$ ), mais pas pour les formes modérées. Il n'est pas mis en évidence de différence significative entre la première visite V0 et la dernière V2 pour aucun des groupes cliniques (léger, modéré, sévère).



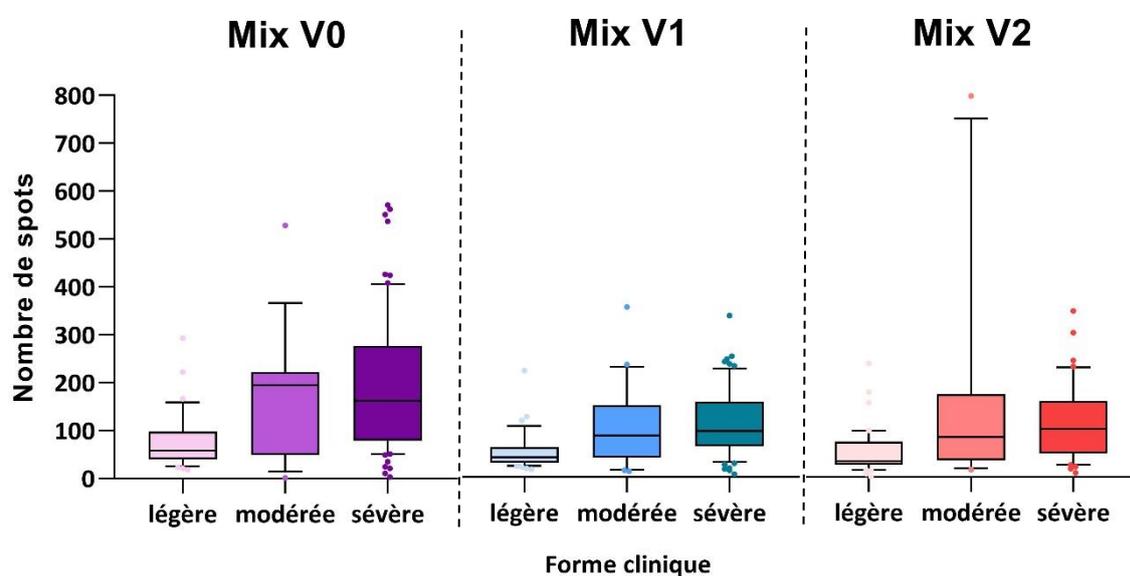
**Figure 47: Distribution du nombre de spots en réponse à l'Ag S selon la forme clinique par visite.** V0, V1 et V2 correspondent aux temps de visite. La boîte à moustache représente le quartile 1, la médiane et le quartile 3. Les moustaches représentent les 10<sup>e</sup> et 90<sup>e</sup> percentiles.

Concernant le mix MNS, l'évolution du nombre de spots n'est pas différente selon la forme clinique ( $p$  d'interaction=0.66), avec une différence significative entre les trois visites pour les formes légères et sévères ( $p = 0.003$  pour les formes légères,  $p < 0.001$  pour les formes sévères), mais sans différence significative pour les formes modérées ( $p = 0.454$ ).

Comme montré sur Figure 48, le nombre de spots avec le mix MNS diffère significativement selon la forme clinique de la maladie ( $p < 0.001$ ) quel que soit le temps de suivi. Les tests post-hoc deux à deux mettent en évidence une différence significative entre les formes sévères et légères quel que soit le temps ( $p < 0.001$  pour toute les comparaisons) et entre les formes

modérées et légères aux deux dernières visites V1 et V2 ( $p=0.01$  pour V1,  $p=0.041$  pour V2), mais pas de différence significative entre les formes modérées et sévères, quel que soit le temps ( $p>0.05$  pour toutes les comparaisons).

De même, en comparant le nombre de spots en réponse au mix MNS au cours des différentes visites (V0, V1 et V2) dans une même forme clinique, les tests post-hoc deux à deux mettent en évidence une différence significative du nombre de spots entre la première visite V0 et la dernière visite V2, ainsi qu'entre la première visite V0 et la deuxième V1, pour les formes légères ( $p=0.006$  pour V1 et V2,  $p=0.001$  pour V1 et V2) et sévères ( $p<0.001$  pour toutes les comparaisons), mais pas pour les formes modérées.



**Figure 48: Distribution du nombre de spots en réponse au mix MNS selon la forme clinique par visite.** V0, V1 et V2 correspondent aux temps de visite. La boîte à moustache représente le quartile 1, la médiane et le quartile 3. Les moustaches représentent les 10<sup>e</sup> et 90<sup>e</sup> percentiles.

# Discussion

---

Le SARS-CoV-2 est le virus à l'origine de la pandémie mondiale qui nous a tous bouleversés, depuis son apparition à Wuhan en décembre 2020. Aujourd'hui, deux ans après, cette menace n'est pas encore écartée et de nombreuses questions restent en suspens. Devant l'urgence diagnostique et thérapeutique, tous les professionnels de santé ont activement contribué à lutter contre cette pandémie, par le développement des tests diagnostiques (moléculaires, antigéniques, sérologiques), la réorganisation des services hospitaliers avec la mise en place de plan blanc et la priorisation des patients COVID-19, la prise en charge thérapeutique des patients hospitalisés (notamment en réanimation) avec la création de protocoles clinico-biologiques et thérapeutiques... De nombreuses équipes ont développé des projets de recherche fondamentale, clinique et translationnelle, visant à comprendre la physiopathologie du SARS-CoV-2, pour *in fine* permettre la production de vaccins et de médicaments adaptés à la maladie.

## **A. Réponse immunitaire suite à l'infection par le SARS-CoV-2**

Pour améliorer la compréhension de la physiopathologie du SARS-CoV-2, il est important d'étudier les réponses immunitaires induites à la suite de cette infection virale et quelle est la protection que ces réponses immunitaires peuvent apporter à long terme. La protection à long terme contre les agents infectieux, tels que le virus SARS-CoV-2, est médiée par les lymphocytes T et par les anticorps du système immunitaire adaptatif (164). Il a été montré qu'une réponse immunitaire adaptative est généralement induite dans les deux semaines suivant l'infection par le SARS-CoV-2, mais un certain nombre d'études ont montré qu'une réponse humorale (production d'anticorps) n'est pas toujours présente ou peut être retardée (213,214). Selon les publications actuelles, certaines personnes dont le test de dépistage du SARS-CoV-2 par RT-PCR s'est révélé positif pourraient ne pas présenter d'anticorps détectables (213). Notamment, de faibles niveaux d'anticorps spécifiques du SARS-CoV-2 ont été fréquemment observés chez des personnes qui souffraient d'une maladie COVID-19 légère ou asymptomatique (215,216). Certaines données suggèrent également que chez certains individus, les anticorps diminuent de manière significative après l'infection et à un rythme encore plus rapide que celui observé pour les infections à MERS-CoV et SARS-CoV-1 (217,218).

En revanche, plusieurs publications ont montré que les réponses des cellules T aux coronavirus humains, y compris le SARS-CoV-1 et le SARS-CoV-2, peuvent être fortes et durables (219), certaines personnes qui ont été infectées par le SARS-CoV-1 il y a 17 ans présentent encore aujourd'hui une réponse lymphocytaire T (220). Ces résultats, ainsi que les études qui ont démontré le rôle essentiel des cellules T dans la clairance virale et la récupération après une infection par le SARS-CoV-2 (221), suggèrent que l'immunité à médiation cellulaire pourrait constituer un aspect important de la réponse immunitaire à l'infection par le SARS-CoV-2 (94).

Tan *et al.* ont analysé la cinétique de la réponse des lymphocytes T spécifiques du SARS-CoV-2 pendant la phase aiguë de l'infection par RT-PCR positive, et ont constaté que les cellules T spécifiques étaient d'abord détectées vers les jours 5-7 après l'apparition des symptômes, avec des fréquences augmentant progressivement jusqu'aux alentours du jour 15 (221). Ils ont également observé une corrélation positive entre la détection précoce des lymphocytes T spécifiques du SARS-CoV-2 et le contrôle précoce de l'infection, ce qui entraîne une évolution moins grave de la maladie et une clairance virale rapide. De même, Weiskopf *et al.* ont démontré que la réponse T CD4 et CD8 spécifique du SARS-CoV-2 peut être détectée dans le sang des patients atteints de COVID-19 sévère dans les deux premières semaines suivant l'apparition des symptômes (222). Cela indique que, bien qu'il ait été signalé que le SARS-CoV-2 sévère entraîne une lymphopénie (223), des lymphocytes T spécifiques du SARS-CoV-2 sont néanmoins générés au cours de la réponse précoce à l'infection. En outre, une étude récente de Rydzynski Moderbacher *et al.* a montré que les cellules T CD4 spécifiques du SARS-CoV-2 pouvaient être détectées dès le quatrième jour suivant l'apparition des symptômes (197). À l'instar de Tan *et al.*, cette étude a également montré que l'émergence précoce de lymphocytes T CD4 et CD8 spécifiques du SARS-CoV-2 était associée à une meilleure évolution de la maladie. Ensemble, ces résultats ne se limitent pas à souligner l'importance de la réponse T dans la mise en place de la réponse immunitaire contre le SARS-CoV-2 dans la phase aiguë de l'infection, ils suggèrent également que la détection des lymphocytes T pendant l'infection aiguë par le SARS-CoV-2 pourrait fournir des informations plus détaillées sur la réponse immunitaire d'un individu.

## **B. Le test ELISpot COVID**

Le premier objectif de ces travaux de thèse a été d'étudier et proposer un nouvel outil diagnostique et complémentaire pour le suivi immunologique des patients COVID-19, notamment dans le cadre du suivi de la réponse cellulaire T spécifique anti-SARS-CoV-2. Parmi les méthodes disponibles pour quantifier cette réponse T, figure l'ELISpot. Cette technique est très sensible pour détecter les lymphocytes T spécifiques d'un antigène, même présentes en faible proportion dans le sang périphérique, et qui sécrètent des molécules effectrices telles que l'IFN $\gamma$ , en réponse à une stimulation antigénique (224). Les données disponibles dans la littérature suggèrent que la majorité des personnes infectées par le SARS-CoV-2 produisent des cellules T spécifiques du SARS-CoV-2, fonctionnelles, produisant de l'IFN $\gamma$ , qui peuvent être détectées dans le sang périphérique dès 2 à 4 jours après l'apparition des symptômes (94). Par conséquent, l'ELISpot COVID est un outil important pour évaluer à la fois les réponses T CD4+ et T CD8+ chez les patients infectés par le SARS-CoV-2. Il s'appuie sur la plateforme T-SPOT (Oxford Immunotec®) utilisée dans le monde entier pour les tests de réponse cellulaire à la tuberculose et au cytomégalovirus, ainsi que développé en parallèle par la société pour le SARS-CoV-2 (T-SPOT *Discovery* SARS-CoV-2) (225,226). Fort de son expérience dans les tests ELISpot grâce à la mise en place d'une plateforme automatisée pour les tests IGRAs dans le cadre du dépistage de la tuberculose latente (227), l'Institut d'immunologie du CHU de Lille a été parmi les premiers à mettre en place spécifiquement une technique ELISpot « maison » adaptée au virus SARS-CoV-2, au début de l'année 2021 dès la première vague de COVID-19.

### ***Concernant la mise en place de la technique et la cohorte initiale***

Nous avons d'abord mis en place la technique en utilisant les principaux antigènes du SARS-CoV-2 (Ag M, N et S) sous forme de pools de peptides chevauchants ainsi qu'un mélange des trois (mix MNS), afin de tester la faisabilité du test sur une première cohorte de 60 patients COVID-19 positifs confirmés par RT-PCR, en comparaison à 31 témoins négatifs, prélevés avant le début de la pandémie de COVID-19. Sur les 60 patients testés, tous (100%) présentaient des spots en réponse à au moins un des antigènes testés. Parmi ces 60 patients, nous avons identifié des variations dans l'amplitude de réponse contre les pools de peptides M, N et S avec respectivement 100%, 93,3% et 91,7% de réponse. Cette différence pourrait principalement s'expliquer par la nature différente des antigènes sélectionnés : nous avons utilisé la séquence complète de la protéine pour les pools de peptides chevauchants M et N,

mais des domaines sélectionnés pour le pool de peptides S. De plus, ces variations pourraient également s'expliquer par des différences *in vivo*, au niveau de la capture de l'antigène et de la présentation antigénique par les cellules dendritiques, compte tenu de la nature des modifications post-traductionnelles, notamment la phosphorylation (protéine N) ou la glycosylation (protéines M et S). Par conséquent, nous avons fait le choix d'utiliser un mélange des trois antigènes viraux (mix MNS) pour évaluer la présence de LT réactifs anti-SARS-CoV-2 dans les échantillons témoins. Tous ces sujets témoins étaient séronégatifs pour les anticorps anti-S1, anti-N et anti-RBD du SARS-CoV-2. Avec cette approche, nous avons détecté des LT réactifs au mix MNS dans seulement trois des 31 échantillons témoins (9,7%) et une seconde analyse (données non présentées) a montré que les LT étaient réactifs vis-à-vis des Ag M et S chez les 3 témoins positifs, et à l'Ag N chez un seul témoin, avec un faible nombre de spots dans chaque cas. Ces résultats positifs au test ELISpot COVID peuvent être dus à une réactivité croisée avec d'autres coronavirus (228). Contrairement à ce qui est observé pour les anticorps, il est retrouvé une réactivité croisée notable de la réponse spécifique T CD4+ anti-SARS-CoV-2, et de manière moins importante T CD8+, à l'égard d'autres coronavirus (HCoV-OC43 et NL63). Cette réactivité croisée a été observée par d'autres auteurs, notamment Le Bert *et al.* qui montrent que le type de protéine contre lequel est dirigée la réponse T est différent chez les patients ayant présenté une infection à SARS-CoV-2 comparativement à ceux qui n'ont pas été infectés (220). Cette réactivité croisée pourrait avoir des propriétés protectrices potentielles contre l'infection par le SARS-CoV-2, mais cela reste à démontrer. La présence de lymphocytes T à réaction croisée préexistants chez les patients atteints du SARS-CoV-2 a également été mise en évidence dans plusieurs études (140,220,229,230). Braun *et al.* ont rapporté la détection de T CD4+ spécifiques chez 23 des 68 donneurs sains (35%) et principalement contre les épitopes C-terminaux du SARS-CoV-2 (230). Cependant, le seuil de détection d'une réponse lymphocytaire T, n'était pas mentionné. A l'inverse de notre étude, ces sujets témoins ont été prélevés pendant la pandémie et ont été définis comme des sujets asymptomatiques séronégatifs (l'infection par le SARS-CoV-2 avait été exclue par RT-PCR chez 10 donneurs sains et par des tests sérologiques répétés au moins 28 jours après le premier prélèvement, ce qui est non négligeable compte tenu de la faible sensibilité de la RT-PCR et de la détection tardive des anticorps chez les patients asymptomatiques (231,232). Grifoni *et al.* ont également détecté des lymphocytes T réactifs aux protéines S, M et aux ORF jusqu'à chez 60 % des donneurs sains (140). Les PBMC cryoconservés collectés avant la pandémie ont été choisis comme témoins, comme dans nos travaux et dans d'autres (229), considérant qu'ils

peuvent être plus pertinents et représentatifs que les sujets asymptomatiques séronégatifs collectés pendant la pandémie.

### ***Concernant les résultats du test ELISpot obtenus dans la cohorte initiale***

Malgré la disparité en termes de fréquences de LT réactifs en réponse aux pools de peptides du SARS-CoV-2 utilisés, il a été observé par la suite une forte corrélation entre les trois pools de peptides (données non présentées). Des résultats similaires ont été publiés dans un rapport préliminaire sur 57 échantillons prélevés chez 28 patients dans les 21 jours suivant le diagnostic de SARS-CoV-2 (233). En association à nos données, ces résultats suggèrent qu'un patient peut acquérir et maintenir *in vivo*, une réponse cellulaire similaire contre les trois protéines, au moins pendant les premières semaines suivant l'infection (le délai médian entre le début des symptômes et le prélèvement étant à 36 jours dans notre étude). De plus, nos résultats soulignent que même si la protéine S peut être une cible majeure pour les stratégies vaccinales, les protéines M et N présentent également un intérêt dans le suivi de l'immunité anti-SARS-CoV-2. En effet, les LT réactifs aux pools de peptides M et N ont été détectés chez 100% et 93,3% des patients respectivement, contre 91,7 % pour le pool de peptides S et 96,7% pour le mix MNS. De plus, nos résultats ont montré une amplitude de réponse significativement plus élevée avec le pool de peptides M, comparé aux autres pools, ainsi qu'une amplitude de réponse significativement plus élevée pour le mix MNS par rapport aux pools de peptides pris séparément. Ainsi, compte tenu de ces résultats et de la forte corrélation entre les trois pools de peptides et le mix (données non montrées) et l'intérêt pratique d'utiliser un seul puits antigénique (plutôt que trois), l'évaluation de la sensibilité et de la spécificité a été réalisée avec le mix MNS pour le suivi de la réponse cellulaire des patients SARS-CoV-2 dans la future pratique de routine.

### ***Concernant la détermination du seuil et des paramètres de sensibilité et spécificité***

L'interprétation d'un résultat positif ou négatif qui permet de définir les paramètres de sensibilité et spécificité, doit être discutée dans la mesure où il n'existe pas de critères consensuels définis pour déterminer qu'une réponse est positive pour un test ELISpot COVID. En ce sens, nous avons envisagé diverses méthodes pour déterminer un seuil :

- Nous avons d'abord considéré qu'un résultat était « positif » lorsque le nombre de spots dans le puits stimulé était au moins le double du nombre de spots observé dans le puits négatif (cellules non stimulées) (220,234).

- Nous avons également considéré un résultat comme « positif » lorsque le nombre de spots dans le puits stimulé était supérieur à la moyenne de tous les contrôles négatifs + trois écarts-types (données non présentées).
- Enfin, nous avons utilisé une courbe ROC pour définir le seuil optimal de sensibilité et de spécificité.

Sur la base de ces trois méthodes, la spécificité était comparable et seuls trois échantillons témoins (9,7%) ont été considérés comme positifs. Comme expliqué précédemment, compte tenu de ces résultats et de l'absence d'anticorps anti-N, anti-S1 et anti-RBD chez les sujets témoins, nos données peuvent suggérer une réactivité croisée avec d'autres coronavirus humains. La spécificité du test ELISpot COVID dépend essentiellement de l'antigène utilisé pour la stimulation. Ainsi, compte tenu des résultats précédemment discutés, nous avons fait le choix d'utiliser le mix MNS pour la stimulation, nous permettant d'obtenir des paramètres de sensibilité et spécificité performants (96,7% et 90,3% respectivement), confirmés dans une cohorte additionnelle de 112 patients. Par conséquent, notre test ELISpot COVID maison semble être un outil fiable pour évaluer la réponse cellulaire T dans des cohortes plus larges.

### ***C. Le suivi de l'immunité cellulaire T***

Le deuxième objectif des travaux de thèse a été d'utiliser cet outil mis en place (ELISpot COVID maison) afin de suivre le devenir de l'immunité adaptative T spécifique des patients atteints de COVID-19 du CHU de Lille lors de l'année 2020 et 2021, dans le temps et selon la forme clinique des patients (légère, modérée, sévère) et la corrélation avec la sérologie, à 3 mois et 6 mois après le début des symptômes. Notre but était d'évaluer le maintien de la réponse cellulaire T à distance de l'infection et faire le lien avec la sévérité clinique de l'infection. De ce fait, afin de répondre à ces problématiques, nous avons étudié une nouvelle cohorte (IMMUNOCOV), qui regroupe des patients faisant partie du protocole LICORNE.

#### ***Concernant le maintien de la réponse cellulaire T dans le temps***

Dans la cohorte IMMUNOCOV, les patients ont été suivis depuis l'inclusion jusqu'à 6 mois après le début des symptômes. Ces patients étaient majoritairement des hommes (60,4% versus 39,6%) avec un sex ratio estimé à 1,52. L'analyse de la réponse immunitaire des patients a été suivie pendant 3 périodes principales V0, V1 et V2, avec respectivement 124 patients (78%), 131 (82,4%) et 91 (57,2%). Ces travaux montrent une persistance de

l'immunité cellulaire T chez tous les patients inclus, à la dernière visite V2, avec des spots détectés peu importe la stimulation antigénique initiale (Ag M, Ag S ou mix MNS). Ces résultats corroborent ceux obtenus par d'autres équipes qui ont montré que l'immunité des cellules T spécifiques du SARS-CoV-2 se maintient 6 à 9 mois après la primo-infection, indiquant que les réponses cellulaires T peuvent survivre aux réponses anticorps transitoires à l'infection par le SARS-CoV-2 (219,235). Cependant malgré une persistance de cette immunité cellulaire T, elle semble significativement diminuer entre la première visite V0 (à 1 mois) et la dernière V2 (à 6 mois) avec des spots médians allant respectivement de 74 à 23 pour l'Ag M et de 74 à 39 pour le mix MNS. Cette diminution n'est pas significativement observée avec l'Ag S, avec des spots médians identiques entre V1 et V2.

### ***Concernant le lien entre l'infection clinique et l'immunité cellulaire T***

Il est important de comprendre comment la réponse des lymphocytes T se développe, suite à une infection par le SARS-CoV-2 en fonction de la gravité de la maladie. À cette fin, nous avons suivi de manière prospective la cohorte de patients IMMUNOCOV. Les 159 patients ont été classifiés selon la sévérité clinique de l'infection COVID-19 avec 51 (32%) patients avec une forme légère, 23 (14,5%) avec une forme modérée et 85 (53,5%) avec une forme sévère. Les patients les plus graves semblent être plutôt des hommes, avec une prédominance masculine (80% de patients de sexe masculin) dans le groupe *sévère*, cependant une analyse statistique permettrait de le confirmer. Cette tendance a également été retrouvée dans la cohorte initiale lors de la mise en place du test ELISpot COVID maison dans laquelle les patients les plus sévères étaient plutôt des hommes âgés (236). L'âge médian dans chaque groupe *léger*, *modéré* et *sévère* était respectivement de 30, 60 et 63 ans dans l'étude IMMUNOCOV. Bien que des analyses statistiques soient nécessaires pour le confirmer, ces résultats vont dans le même sens que d'autres études qui rapportent que l'âge est un facteur de risque important de sévérité de la maladie, notamment l'étude de cohorte nationale menée par le GIS Epiphare (CNAM/ANSM) portant sur 66 millions de personnes. L'étude confirmait que les hommes étaient plus à risque d'hospitalisation et de décès que les femmes, avec un risque multiplié respectivement par 1,4 et 2,1 (237) et que les risques d'hospitalisation ou de décès des suites du COVID-19 augmentaient de façon exponentielle avec l'âge avec un risque doublé pour les 60-64 ans, par rapport aux 40-44 ans, triplé chez les 70-74 ans, et multiplié par 6 et par 12, respectivement chez les 80-84 ans chez les 90 ans et plus (237).

Nous avons souhaité comparer la réponse cellulaire T en fonction de la forme clinique des patients et des visites. Cette étude a montré une différence significative du nombre de spots détectés selon la forme clinique, et ce quel que soit le temps de suivi, et pour chacun des antigènes utilisés (Ag M, Ag S et mix MNS). Il est observé une réponse T plus forte pour les formes sévères en réponse à l'Ag M mais pas en réponse au mix MNS ni à l'Ag S. Ainsi, le groupe de patients sévères développe une réponse T vis-à-vis de l'Ag M, significativement plus importante à chaque visite par rapport aux groupes léger et modéré, malgré une diminution de cette réponse au cours des visites. En comparant selon la forme clinique, ces résultats ont montré une différence significative entre la réponse T détectée chez les formes sévères et les formes légères, et ce quel que soit le temps de suivi et l'antigène utilisé, suggérant que les patients infectés par une forme légère développent une réponse cellulaire T moins intense que les patients sévères à chaque visite. Cette différence significative s'observe également entre les formes sévères et modérées uniquement aux deux premières visites V0 et V1 avec l'Ag M et le mix MNS (mais pas avec l'Ag S), mais plus au-delà de 6 mois post-symptômes (visite V2) suggérant que malgré une forte réponse T en début d'infection chez les patients sévères, cette réponse T diminue au-delà de 6 mois pour être à un état comparable à la réponse observée chez les patients de forme clinique modérée. La comparaison au sein d'un même groupe de forme clinique a montré une différence significative de la réponse T dans le temps, avec une diminution de cette réponse T dans tous les groupes cliniques. Ainsi, quelle que soit l'infection clinique de départ (légère, modérée ou sévère), la réponse cellulaire T se maintient mais diminue significativement entre le premier mois et le sixième mois après le début des symptômes.

Entre les deux premières visites, nos travaux ont mis en évidence une différence significative entre les formes légères et sévères avec chacun des antigènes utilisés (M, S et mix MNS), mais pas pour les formes modérées. Dans les formes modérées, il n'a pas été retrouvé de différence significative avec les formes sévères, et ce quel que soit le temps de visite (avec l'Ag S) et ni au cours du temps. De plus avec l'Ag S, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre la première et la dernière visite pour tous les groupes. Les résultats observés dépendent de la stimulation antigénique utilisée, et comme décrit précédemment, la nature des pools de peptides utilisés pourrait expliquer la différence de réponse observée entre les Ag M et S.

## **Concernant le suivi de l'immunité cellulaire et la protection conférée**

Une étude de cohorte prospective réalisée par *Public Health England* au début de la pandémie de COVID-19 a confirmé l'importance de suivre les cellules T dans l'infection par le SARS-CoV-2. Dans cette étude, 2826 personnes identifiées comme des travailleurs essentiels ont été testées lors de l'inscription pour détecter les IgG anti-S (EuroImmune AG) et les cellules T réactives au SARS-CoV-2 au moyen du test T-SPOT.COVID (Oxford Immunotec) exclusivement destiné à la recherche (226). Parmi cette cohorte, 154 ont été recrutés sur la base d'un test RT-PCR antérieur positif confirmant l'infection par le SARS-CoV-2. 5,8 % de cette population précédemment positive par RT-PCR étaient séronégatifs, mais 88,9 % de ces sujets ont présenté des réponses fortes des cellules T qui ont été détectées avec le test T-SPOT.COVID. Ce résultat indique que certaines personnes infectées peuvent générer des réponses immunitaires à médiation cellulaire (cellules T) en l'absence d'une réponse humorale (anticorps). Cela correspond aux études réalisées chez les contacts familiaux de personnes infectées par le SARS-CoV-2, qui ont montré que les contacts étaient environ 50 % plus susceptibles de développer des cellules T spécifiques du SARS-CoV-2 que des anticorps après l'exposition (198,238). Associés ensemble, ces résultats suggèrent que les cellules T peuvent être un indicateur plus sensible de l'exposition passée au SARS-CoV-2 que les réponses anticorps. Dans le cadre de la même étude de *Public Health England*, les 2672 autres participants à l'étude ont fait l'objet d'un suivi pour vérifier l'apparition ultérieure d'une infection au SARS-CoV-2 confirmée par RT-PCR (226). Ce suivi a fourni la première indication que les cellules T spécifiques du SARS-CoV-2 peuvent être associées à une protection contre la réinfection, car les personnes présentant un nombre élevé de cellules T réactives détectées par le test T-SPOT.COVID étaient nettement moins susceptibles de développer une infection par le SARS-CoV-2 confirmée par RT-PCR pendant la période de suivi. Ces résultats préliminaires corroborent les études sur les primates qui ont démontré que la déplétion des cellules T chez les singes qui s'étaient rétablis du SARS-CoV-2 entraînait une réinfection lors d'une nouvelle exposition au virus, même si les réponses anticorps spécifiques du SARS-CoV-2 restaient intactes. En revanche, les singes qui avaient conservé des cellules T spécifiques du SARS-CoV-2 ont réussi à éviter la réinfection (239). À l'instar des études précédentes, cette étude animale a également observé un déclin des réponses en anticorps après l'infection, ce qui a amené les auteurs à conclure que les cellules T pourraient être nécessaires à la protection à long terme contre le virus.

Ces résultats indiquent que les cellules T jouent un rôle essentiel dans les réponses immunitaires contre l'infection naturelle par le SARS-CoV-2, et il est donc important que des réponses fortes des cellules T soient induites en réponse aux vaccins contre le SARS-CoV-2 (240). Des cellules T spécifiques du SARS-CoV-2 ont été détectées en réponse à de nombreux vaccins actuellement envisagés (241–243) et il est de plus en plus important de détecter et de surveiller ces réponses (240).

#### ***D. Limites de l'étude***

Notre étude comporte certaines limites. En effet, le test ELISpot COVID maison ne nous a pas permis de faire la distinction entre les réponses spécifiques des lymphocytes T CD4+ et T CD8+. Nous n'avons aucune information concernant le type exact de cellules T productrices d'IFN $\gamma$ , suite à la stimulation antigénique. De plus, avec ce test nous n'avons pas été en mesure d'évaluer l'état d'activation *in vivo* des cellules immunitaires. Cependant, notre priorité était d'une part, de mettre en place un outil permettant d'étudier et de suivre la réponse cellulaire dans une large cohorte de patients atteints du SARS-CoV-2 avec une méthode standardisée, en utilisant un seuil fiable de résultats positifs ; puis dans un deuxième temps, d'utiliser cet outil pour suivre le devenir de l'immunité cellulaire des patients plusieurs mois après une infection naturelle au SARS-CoV-2. Le test ELISpot COVID a ainsi permis d'accroître la compréhension scientifique de l'immunité, mais les implications pour l'interprétation après vaccination et la corrélation avec l'immunité protectrice restent à déterminer. Par manque de temps, nous n'avons pas pu faire de corrélation avec la sérologie et analyser en parallèle le maintien de l'immunité humorale, ni faire de corrélation statistique avec les comorbidités associées des patients inclus dans l'étude.

#### ***E. Perspectives***

Les perspectives de ces travaux en thèse sont nombreuses, dans la mesure où la menace d'une recrudescence des cas d'infection au SARS-CoV-2 n'est pas écartée et que beaucoup de questions restent en suspens et en attente de réponses. Beaucoup de projets de recherche sont en cours pour apporter davantage d'informations dans la compréhension de la

physiopathologie de la maladie et des réponses immunitaires associées. La littérature scientifique ne cesse d'être fournie en publications scientifiques à ce sujet.

Je ne citerai que quelques perspectives, dont la première serait une comparaison entre les données de l'immunité cellulaire et humorale. En effet, il aurait été intéressant de suivre de la même manière que décrit dans cette étude IMMUNOCOV, et en parallèle de l'immunité cellulaire par l'ELISpot COVID, la persistance des anticorps spécifiques des patients infectés par le SARS-CoV-2 par la sérologie, dans les 6 mois post-infection. Cela a été fait dans d'autres études, avec un suivi de l'immunité cellulaire T par ELISpot COVID et de la sérologie jusqu'à 36 semaines du diagnostic de COVID-19 (244). Cela nous aurait éventuellement permis d'apporter une information supplémentaire et de conforter certaines études qui montrent que la réponse lymphocytaire T, appréciée par l'ELISpot COVID, semble plus importante et se maintenir plus longtemps que la réponse humorale. En effet, dans l'étude de Kruse *et al.*, il a été montré que huit semaines après le diagnostic de COVID-19, des lymphocytes T ont été détectés par ELISpot COVID chez 56 patients sur 67 (83,6%) surpassant la sérologie (52,2%) et une réponse cellulaire T continuait à être détectée chez environ trois quarts des patients infectés, dans la période allant de 20 à 36 semaines après le diagnostic de COVID-19, tandis que des réponses humorales avec des IgG anti-N n'ont été observées chez aucun patient de l'étude à cette même période (244).

L'étude IMMUNOCOV a permis de suivre des patients infectés par le SARS-CoV-2 inclus dans le protocole LICORNE jusqu'à 6 mois après leurs symptômes, cependant une étude à plus long terme, allant notamment jusqu'à 9 mois (36 semaines) comme l'ont fait certaines équipes (244), voire à plus long terme (12 mois) aurait également été intéressante à mener. Cela impliquerait un suivi plus strict des patients avec le moins de perdus de vue possible, afin de garantir une cohorte (avec un nombre de patients suffisant) représentative de la population. De plus, face à l'émergence de variants du SARS-CoV-2, la durabilité de la réponse T va également dépendre des mutations du virus. Nous ne savons pas comment évolue cette réponse T et si elle sera durable en fonction des variants du virus, et il serait intéressant de l'explorer.

En décembre 2020, juste après la fin d'inclusion des patients dans le protocole LICORNE, le premier vaccin anti SARS-CoV-2 est arrivé sur le marché en France (le vaccin Pfizer/BioNTech

Comirnaty®). Dans la continuité de mes travaux de thèse et de l'étude IMMUNOCOV, des travaux du laboratoire ont permis de démontrer l'intérêt du test ELISpot COVID également dans le cadre du statut vaccinal, dont l'objectif était d'évaluer la réponse cellulaire T spécifique et humorale de la mémoire, induite après vaccination anti-SARS-CoV-2 (vaccin à ARNm BNT162b de Pfizer/BioNTech) chez le sujet âgé. Cette étude appelée MONITOCOV-Aging (NCT04760704) a été réalisée sur une cohorte de patients âgés hospitalisés en établissements de soins de longue durée qui ont été vaccinés selon le schéma vaccinal recommandé au moment de l'étude, soit 2 doses à 3 semaines d'intervalle (245). Les résultats de cette étude ont rapporté que les personnes âgées naïves au COVID-19 avaient un faible taux de T CD4+ et T CD8+ spécifiques en plus d'une réponse anticorps altérée, mais que malgré les altérations physiologiques de l'immunité, la vaccination est très efficace pour stimuler la réponse mémoire naturelle antérieure chez les personnes âgées guéries du COVID-19. À l'arrivée de la 3e dose, ces travaux ont continué avec pour but le suivi des réponses humorale et cellulaire T, suite à la 3e injection 9 mois plus tard, permettant d'étudier la durabilité de la réponse cellulaire T vaccinale, ainsi que la réponse post-boost (à 1 mois et 3 mois post 3e dose) selon le variant Delta ou Omicron, qui étaient les variants majoritaires au moment de l'étude. Les résultats ont été récemment décrits dans un article accepté et publié prochainement.

Ainsi, fort de cette expérience, une autre perspective intéressante serait de comparer les résultats de l'immunité naturelle anti-SARS-CoV-2 (travaux réalisés dans cette thèse), aux résultats de l'immunité induite par la vaccination anti-SARS-CoV-2 (travaux de l'étude MONITOCOV-Aging).

# Conclusion

---

La pandémie de COVID-19 restera un des événements importants qui aura marqué notre ère, avec une crise sanitaire mondiale et un impact socio-économique importants (confinements de la population, personnels soignants ultra sollicités, services de réanimations surchargés, millions de décès...). Le virus SARS-CoV-2 à l'origine de cette pandémie a subi de multiples mutations entraînant l'apparition de variants et rendant d'autant plus difficile la gestion de la crise sanitaire. L'un des éléments majeurs déterminant l'issue de cette infection virale est sans nul doute l'interaction entre le SARS-CoV-2 et le système immunitaire. Les travaux de recherche menés sur ce virus ainsi que sur les coronavirus antérieurs, notamment le SARS-CoV-1 ont permis d'améliorer la compréhension de la physiopathologie de cette infection et les modalités de réponse du système immunitaire.

Nous avons souhaité évaluer la réponse immunitaire adaptative des patients infectés par le SARS-CoV-2 au CHU de Lille, et proposer un nouvel outil diagnostique permettant le suivi immunologique des patients COVID-19 à long terme. Le test ELISpot COVID est une méthode fiable pour explorer de grandes cohortes de patients, avec une sensibilité et spécificité excellentes, de 96,7% et 90,3% respectivement. Cette technique est maintenant utilisée pour l'évaluation de l'immunité naturelle et vaccinale dans plusieurs études. Cet outil nous a permis de suivre la réponse cellulaire T des patients dans le temps jusqu'à 6 mois après le début des symptômes, et d'évaluer la corrélation avec la forme clinique (légère, modérée ou sévère) des patients inclus. Nous avons mis en évidence que les patients sévères développaient une réponse spécifique des lymphocytes T plus élevée contre l'infection par le SARS-CoV-2. Cette réponse immunitaire perdure dans le temps, au moins jusqu'à 6 mois après le début des symptômes, mais diminue significativement avec le temps, quelle que soit la forme clinique initiale. Dans notre étude, il a été montré qu'il existe une corrélation entre la sévérité clinique et la réponse immunitaire adaptative. Ainsi notre étude apporte de nouvelles informations sur le devenir de la réponse adaptative chez les patients COVID-19 après une infection naturelle, et d'autres études sont nécessaires pour aller plus loin dans la compréhension des réponses immunitaires, notamment en lien avec la réponse humorale, ainsi que pour évaluer si une immunité cellulaire plus élevée pourrait être protectrice contre les nouvelles infections.

# Bibliographie

---

1. Cui J, Li F, Shi ZL. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol.* mars 2019;17(3):181-92.
2. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med.* 20 févr 2020;382(8):727-33.
3. Yin Y, Wunderink RG. MERS, SARS and other coronaviruses as causes of pneumonia. *Respirol Carlton Vic.* févr 2018;23(2):130-7.
4. Coronaviridae - Positive Sense RNA Viruses - Positive Sense RNA Viruses (2011) - ICTV [Internet]. [cité 30 sept 2021]. Disponible sur: [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_9th\\_report/positive-sense-rna-viruses-2011/w/posrna\\_viruses/222/coronaviridae](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/positive-sense-rna-viruses-2011/w/posrna_viruses/222/coronaviridae)
5. Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature.* mars 2020;579(7798):270-3.
6. Wu Y, Ho W, Huang Y, Jin DY, Li S, Liu SL, et al. SARS-CoV-2 is an appropriate name for the new coronavirus. *Lancet Lond Engl.* 2020;395(10228):949-50.
7. Wong G, Liu W, Liu Y, Zhou B, Bi Y, Gao GF. MERS, SARS, and Ebola: The Role of Super-Spreaders in Infectious Disease. *Cell Host Microbe.* 14 oct 2015;18(4):398-401.
8. Coronavirus disease (COVID-19) – World Health Organization [Internet]. [cité 20 sept 2021]. Disponible sur: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>
9. Ren LL, Wang YM, Wu ZQ, Xiang ZC, Guo L, Xu T, et al. Identification of a novel coronavirus causing severe pneumonia in human: a descriptive study. *Chin Med J (Engl).* 5 mai 2020;133(9):1015-24.
10. Wu F, Zhao S, Yu B, Chen YM, Wang W, Song ZG, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature.* 2020;579(7798):265-9.
11. de Wit E, van Doremalen N, Falzarano D, Munster VJ. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. *Nat Rev Microbiol.* août 2016;14(8):523-34.
12. Zhang T, Wu Q, Zhang Z. Probable Pangolin Origin of SARS-CoV-2 Associated with the COVID-19 Outbreak. *Curr Biol CB.* 6 avr 2020;30(7):1346-1351.e2.
13. Lam TTY, Jia N, Zhang YW, Shum MHH, Jiang JF, Zhu HC, et al. Identifying SARS-CoV-2-related coronaviruses in Malayan pangolins. *Nature.* juill 2020;583(7815):282-5.
14. Kirtipal N, Bharadwaj S, Kang SG. From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis.* nov 2020;85:104502.

15. Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh CL, Abiona O, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*. 13 mars 2020;367(6483):1260-3.
16. Wang Q, Zhang Y, Wu L, Niu S, Song C, Zhang Z, et al. Structural and Functional Basis of SARS-CoV-2 Entry by Using Human ACE2. *Cell*. 14 mai 2020;181(4):894-904.e9.
17. Xiao K, Zhai J, Feng Y, Zhou N, Zhang X, Zou JJ, et al. Isolation of SARS-CoV-2-related coronavirus from Malayan pangolins. *Nature*. juill 2020;583(7815):286-9.
18. Tang X, Wu C, Li X, Song Y, Yao X, Wu X, et al. On the origin and continuing evolution of SARS-CoV-2. *Natl Sci Rev*. 1 juin 2020;7(6):1012-23.
19. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet Lond Engl*. 2020;395(10223):497-506.
20. Xiong C, Jiang L, Chen Y, Jiang Q. Evolution and variation of 2019-novel coronavirus [Internet]. 2020 janv [cité 20 sept 2021] p. 2020.01.30.926477. Disponible sur: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.01.30.926477v1>
21. Kim D, Lee JY, Yang JS, Kim JW, Kim VN, Chang H. The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. *Cell*. 14 mai 2020;181(4):914-921.e10.
22. Neuman BW, Chamberlain P, Bowden F, Joseph J. Atlas of coronavirus replicase structure. *Virus Res*. 19 déc 2014;194:49-66.
23. Génome du SRAS-Cov-2 ~ ViralZone [Internet]. [cité 10 mars 2022]. Disponible sur: <https://viralzone.expasy.org/9076>
24. Perlman S, Netland J. Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol*. 2009;7(6):439-50.
25. Juckel D, Dubuisson J, Belouzard S. Les coronavirus, ennemis incertains. *médecine/sciences*. 1 juin 2020;36(6-7):633-41.
26. Elecsys® Anti-SARS-CoV-2 S [Internet]. Diagnostics. [cité 10 mars 2022]. Disponible sur: <https://diagnostics.roche.com/ch/fr/products/params/electsys-anti-sars-cov-2-s.html>
27. Muchtaridi M, Fauzi M, Khairul Ikram NK, Mohd Gazzali A, Wahab HA. Natural Flavonoids as Potential Angiotensin-Converting Enzyme 2 Inhibitors for Anti-SARS-CoV-2. *Molecules*. janv 2020;25(17):3980.
28. BOS ECW, LUYTJES W, MEULEN HVD, KOERTEN HK, SPAAN WJM. The Production of Recombinant Infectious DI-Particles of a Murine Coronavirus in the Absence of Helper Virus. *Virology*. 1 avr 1996;218(1):52-60.
29. Satarker S, Nampoothiri M. Structural Proteins in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2. *Arch Med Res*. août 2020;51(6):482-91.
30. de Haan CAM, Rottier PJM. Molecular Interactions in the Assembly of Coronaviruses. *Adv Virus Res*. 2005;64:165-230.

31. McBride R, van Zyl M, Fielding BC. The coronavirus nucleocapsid is a multifunctional protein. *Viruses*. 7 août 2014;6(8):2991-3018.
32. Ijaz MK, Nims RW, McKinney J. SARS-CoV-2 mutational variants may represent a new challenge to society, but not to the virucidal armamentarium. *J Hosp Infect*. 1 juin 2021;112:121-3.
33. van Dorp L, Richard D, Tan CCS, Shaw LP, Acman M, Balloux F. No evidence for increased transmissibility from recurrent mutations in SARS-CoV-2. *Nat Commun*. 25 nov 2020;11(1):5986.
34. González-Candelas F, Shaw MA, Phan T, Kulkarni-Kale U, Paraskevis D, Luciani F, et al. One year into the pandemic: Short-term evolution of SARS-CoV-2 and emergence of new lineages. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis*. août 2021;92:104869.
35. Negi SS, Schein CH, Braun W. Regional and temporal coordinated mutation patterns in SARS-CoV-2 spike protein revealed by a clustering and network analysis. *Sci Rep*. 21 janv 2022;12(1):1128.
36. Suivi des variants du SARS-CoV-2 [Internet]. [cité 7 mars 2022]. Disponible sur: <https://www.who.int/fr/health-topics/health-promotion/tracking-SARS-CoV-2-variants>
37. Alm E, Broberg EK, Connor T, Hodcroft EB, Komissarov AB, Maurer-Stroh S, et al. Geographical and temporal distribution of SARS-CoV-2 clades in the WHO European Region, January to June 2020. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull*. août 2020;25(32).
38. Rambaut A, Holmes EC, O'Toole Á, Hill V, McCrone JT, Ruis C, et al. A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 lineages to assist genomic epidemiology. *Nat Microbiol*. nov 2020;5(11):1403-7.
39. Choi JY, Smith DM. SARS-CoV-2 Variants of Concern. *Yonsei Med J*. 1 nov 2021;62(11):961-8.
40. Groves DC, Rowland-Jones SL, Angyal A. The D614G mutations in the SARS-CoV-2 spike protein: Implications for viral infectivity, disease severity and vaccine design. *Biochem Biophys Res Commun*. 29 janv 2021;538:104-7.
41. Korber B, Fischer WM, Gnanakaran S, Yoon H, Theiler J, Abfalterer W, et al. Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence that D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus. *Cell*. 20 août 2020;182(4):812-827.e19.
42. Chaillon A, Smith DM. Phylogenetic Analyses of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) B.1.1.7 Lineage Suggest a Single Origin Followed by Multiple Exportation Events Versus Convergent Evolution. *Clin Infect Dis*. 15 déc 2021;73(12):2314-7.
43. Davies NG, Abbott S, Barnard RC, Jarvis CI, Kucharski AJ, Munday JD, et al. Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. *Science*. 9 avr 2021;372(6538):eabg3055.

44. Starr TN, Greaney AJ, Hilton SK, Ellis D, Crawford KHD, Dingens AS, et al. Deep Mutational Scanning of SARS-CoV-2 Receptor Binding Domain Reveals Constraints on Folding and ACE2 Binding. *Cell*. 3 sept 2020;182(5):1295-1310.e20.
45. Peacock TP, Goldhill DH, Zhou J, Baillon L, Frise R, Swann OC, et al. The furin cleavage site in the SARS-CoV-2 spike protein is required for transmission in ferrets. *Nat Microbiol*. juill 2021;6(7):899-909.
46. Tegally H, Wilkinson E, Giovanetti M, Iranzadeh A, Fonseca V, Giandhari J, et al. Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa. *Nature*. avr 2021;592(7854):438-43.
47. Tang JW, Toovey OTR, Harvey KN, Hui DDS. Introduction of the South African SARS-CoV-2 variant 501Y.V2 into the UK. *J Infect*. avr 2021;82(4):e8-10.
48. Khan A, Zia T, Suleman M, Khan T, Ali SS, Abbasi AA, et al. Higher infectivity of the SARS-CoV-2 new variants is associated with K417N/T, E484K, and N501Y mutants: An insight from structural data. *J Cell Physiol*. oct 2021;236(10):7045-57.
49. Ramanathan M, Ferguson ID, Miao W, Khavari PA. SARS-CoV-2 B.1.1.7 and B.1.351 spike variants bind human ACE2 with increased affinity. *Lancet Infect Dis*. août 2021;21(8):1070.
50. Fujino T, Nomoto H, Kutsuna S, Ujiie M, Suzuki T, Sato R, et al. Novel SARS-CoV-2 Variant in Travelers from Brazil to Japan - Volume 27, Number 4—April 2021 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. [cité 16 mars 2022]; Disponible sur: [https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/27/4/21-0138\\_article](https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/27/4/21-0138_article)
51. Faria NR, Mellan TA, Whittaker C, Claro IM, Candido D da S, Mishra S, et al. Genomics and epidemiology of a novel SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil [Internet]. medRxiv; 2021 [cité 16 mars 2022]. p. 2021.02.26.21252554. Disponible sur: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2021.02.26.21252554v1>
52. Sabino EC, Buss LF, Carvalho MPS, Prete CA, Crispim MAE, Fraiji NA, et al. Resurgence of COVID-19 in Manaus, Brazil, despite high seroprevalence. *Lancet Lond Engl*. 6 févr 2021;397(10273):452-5.
53. Genome Sequencing by INSACOG shows variants of concern and a Novel variant in India [Internet]. [cité 16 mars 2022]. Disponible sur: <https://pib.gov.in/pib.gov.in/Pressreleaseshare.aspx?PRID=1707177>
54. Variant\_of\_Concern\_VOC\_202012\_01\_Technical\_Briefing\_3.pdf [Internet]. [cité 16 mars 2022]. Disponible sur: [https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/959360/Variant\\_of\\_Concern\\_VOC\\_202012\\_01\\_Technical\\_Briefing\\_3.pdf](https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/959360/Variant_of_Concern_VOC_202012_01_Technical_Briefing_3.pdf)
55. News VOA. WHO: Delta Now Dominant COVID Variant Globally [Internet]. VOA. [cité 16 mars 2022]. Disponible sur: <https://www.voanews.com/a/who-delta-now-dominant-covid-variant-globally-/6240592.html>
56. Chen J, Wang R, Wang M, Wei GW. Mutations Strengthened SARS-CoV-2 Infectivity. *J Mol Biol*. 4 sept 2020;432(19):5212-26.

57. Deng X, Garcia-Knight MA, Khalid MM, Servellita V, Wang C, Morris MK, et al. Transmission, infectivity, and neutralization of a spike L452R SARS-CoV-2 variant. *Cell*. 24 juin 2021;184(13):3426-3437.e8.
58. Gao SJ, Guo H, Luo G. Omicron variant (B.1.1.529) of SARS-CoV-2, a global urgent public health alert! *J Med Virol*. 2022;94(4):1255-6.
59. Kannan S, Shaik Syed Ali P, Sheeza A. Omicron (B.1.1.529) - variant of concern - molecular profile and epidemiology: a mini review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. déc 2021;25(24):8019-22.
60. Mercadier JJ. Une seconde enzyme de conversion de l'angiotensine juste pour le cœur ? *médecine/sciences*. 1 févr 2003;19(2):141-3.
61. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*. 16 avr 2020;181(2):271-280.e8.
62. Coutard B, Valle C, de Lamballerie X, Canard B, Seidah NG, Decroly E. The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade. *Antiviral Res*. avr 2020;176:104742.
63. Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Velesler D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*. 16 avr 2020;181(2):281-292.e6.
64. Wölfel R, Corman VM, Guggemos W, Seilmaier M, Zange S, Müller MA, et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature*. mai 2020;581(7809):465-9.
65. Harrison AG, Lin T, Wang P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. *Trends Immunol*. 1 déc 2020;41(12):1100-15.
66. V'kovski P, Kratzel A, Steiner S, Stalder H, Thiel V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol*. mars 2021;19(3):155-70.
67. Wu P, Duan F, Luo C, Liu Q, Qu X, Liang L, et al. Characteristics of Ocular Findings of Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in Hubei Province, China. *JAMA Ophthalmol*. mai 2020;138(5):575-8.
68. van Doremalen N, Bushmaker T, Morris DH, Holbrook MG, Gamble A, Williamson BN, et al. Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. *N Engl J Med*. 17 mars 2020;NEJMc2004973.
69. Zheng S, Fan J, Yu F, Feng B, Lou B, Zou Q, et al. Viral load dynamics and disease severity in patients infected with SARS-CoV-2 in Zhejiang province, China, January-March 2020: retrospective cohort study. *The BMJ*. 21 avr 2020;369:m1443.
70. Lescure FX, Bouadma L, Nguyen D, Parisey M, Wicky PH, Behillil S, et al. Clinical and virological data of the first cases of COVID-19 in Europe: a case series. *Lancet Infect Dis*. juin 2020;20(6):697-706.
71. Wang W, Xu Y, Gao R, Lu R, Han K, Wu G, et al. Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. *JAMA*. 12 mai 2020;323(18):1843-4.

72. Dong L, Tian J, He S, Zhu C, Wang J, Liu C, et al. Possible Vertical Transmission of SARS-CoV-2 From an Infected Mother to Her Newborn. *JAMA*. 12 mai 2020;323(18):1846-8.
73. Vivanti AJ, Vauloup-Fellous C, Prevot S, Zupan V, Suffee C, Do Cao J, et al. Transplacental transmission of SARS-CoV-2 infection. *Nat Commun*. 14 juill 2020;11(1):3572.
74. Coronavirus et Covid-19 · Inserm, La science pour la santé [Internet]. [cité 10 mars 2022]. Disponible sur: <https://www.inserm.fr/dossier/coronavirus-sars-cov-et-mers-cov/>
75. Buitrago-Garcia D, Egli-Gany D, Counotte MJ, Hossmann S, Imeri H, Ipekci AM, et al. Occurrence and transmission potential of asymptomatic and presymptomatic SARS-CoV-2 infections: A living systematic review and meta-analysis. *PLoS Med*. sept 2020;17(9):e1003346.
76. Yanes-Lane M, Winters N, Fregonese F, Bastos M, Perlman-Arrow S, Campbell JR, et al. Proportion of asymptomatic infection among COVID-19 positive persons and their transmission potential: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2020;15(11):e0241536.
77. The Novel Coronavirus Pneumonia Emergency Response Epidemiology Team. The Epidemiological Characteristics of an Outbreak of 2019 Novel Coronavirus Diseases (COVID-19) — China, 2020. *China CDC Wkly*. 21 févr 2020;2(8):113-22.
78. Spinato G, Fabbris C, Polesel J, Cazzador D, Borsetto D, Hopkins C, et al. Alterations in Smell or Taste in Mildly Symptomatic Outpatients With SARS-CoV-2 Infection. *JAMA*. 26 mai 2020;323(20):2089-90.
79. Giacomelli A, Pezzati L, Conti F, Bernacchia D, Siano M, Oreni L, et al. Self-reported Olfactory and Taste Disorders in Patients With Severe Acute Respiratory Coronavirus 2 Infection: A Cross-sectional Study. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 28 juill 2020;71(15):889-90.
80. Tong JY, Wong A, Zhu D, Fastenberg JH, Tham T. The Prevalence of Olfactory and Gustatory Dysfunction in COVID-19 Patients: A Systematic Review and Meta-analysis. *Otolaryngol--Head Neck Surg Off J Am Acad Otolaryngol-Head Neck Surg*. juill 2020;163(1):3-11.
81. Synowiec A, Szczepański A, Barreto-Duran E, Lie LK, Pyrc K. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): a Systemic Infection. *Clin Microbiol Rev*. 17 mars 2021;34(2):e00133-20.
82. Guan WJ, Ni ZY, Hu Y, Liang WH, Ou CQ, He JX, et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N Engl J Med*. 30 avr 2020;382(18):1708-20.
83. Wu C, Chen X, Cai Y, Xia J, Zhou X, Xu S, et al. Risk Factors Associated With Acute Respiratory Distress Syndrome and Death in Patients With Coronavirus Disease 2019 Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA Intern Med*. 1 juill 2020;180(7):934-43.
84. Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet Lond Engl*. 28 mars 2020;395(10229):1054-62.

85. Allotey J, Stallings E, Bonet M, Yap M, Chatterjee S, Kew T, et al. Clinical manifestations, risk factors, and maternal and perinatal outcomes of coronavirus disease 2019 in pregnancy: living systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 1 sept 2020;370:m3320.
86. Alqahtani JS, Oyelade T, Aldhahir AM, Alghamdi SM, Almeahmadi M, Alqahtani AS, et al. Prevalence, Severity and Mortality associated with COPD and Smoking in patients with COVID-19: A Rapid Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE*. 11 mai 2020;15(5):e0233147.
87. Déclaration de l'OMS : tabagisme et COVID-19 [Internet]. [cité 12 déc 2021]. Disponible sur: <https://www.who.int/fr/news/item/11-05-2020-who-statement-tobacco-use-and-covid-19>
88. Sallis R, Young DR, Tartof SY, Sallis JF, Sall J, Li Q, et al. Physical inactivity is associated with a higher risk for severe COVID-19 outcomes: a study in 48 440 adult patients. *Br J Sports Med*. oct 2021;55(19):1099-105.
89. Havervall S, Rosell A, Phillipson M, Mangsbo SM, Nilsson P, Hober S, et al. Symptoms and Functional Impairment Assessed 8 Months After Mild COVID-19 Among Health Care Workers. *JAMA*. 18 mai 2021;325(19):2015-6.
90. Prevalence of long COVID symptoms and COVID-19 complications - Office for National Statistics [Internet]. [cité 17 janv 2022]. Disponible sur: <https://www.ons.gov.uk/peoplepopulationandcommunity/healthandsocialcare/healthandlifeexpectancies/datasets/prevalenceoflongcovidsymptomsandcovid19complications>
91. Writing Committee for the COMEBAC Study Group, Morin L, Savale L, Pham T, Colle R, Figueiredo S, et al. Four-Month Clinical Status of a Cohort of Patients After Hospitalization for COVID-19. *JAMA*. 20 avr 2021;325(15):1525-34.
92. Salmon-Ceron D, Slama D, De Broucker T, Karmochkine M, Pavie J, Sorbets E, et al. Clinical, virological and imaging profile in patients with prolonged forms of COVID-19: A cross-sectional study. *J Infect*. févr 2021;82(2):e1-4.
93. Bonny V, Maillard A, Mousseaux C, Plaçais L, Richier Q. COVID-19 : physiopathologie d'une maladie à plusieurs visages. *Rev Med Interne*. juin 2020;41(6):375-89.
94. Sette A, Crotty S. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell*. 18 févr 2021;184(4):861-80.
95. Tay MZ, Poh CM, Rénia L, MacAry PA, Ng LFP. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat Rev Immunol*. juin 2020;20(6):363-74.
96. García LF. Immune Response, Inflammation, and the Clinical Spectrum of COVID-19. *Front Immunol*. 2020;11:1441.
97. Ishii KJ, Koyama S, Nakagawa A, Coban C, Akira S. Host innate immune receptors and beyond: making sense of microbial infections. *Cell Host Microbe*. 12 juin 2008;3(6):352-63.

98. Dosch SF, Mahajan SD, Collins AR. SARS coronavirus spike protein-induced innate immune response occurs via activation of the NF-kappaB pathway in human monocyte macrophages in vitro. *Virus Res.* juin 2009;142(1-2):19-27.
99. Finlay BB, McFadden G. Anti-immunology: evasion of the host immune system by bacterial and viral pathogens. *Cell.* 24 févr 2006;124(4):767-82.
100. Ricci D, Etna MP, Rizzo F, Sandini S, Severa M, Coccia EM. Innate Immune Response to SARS-CoV-2 Infection: From Cells to Soluble Mediators. *Int J Mol Sci.* 29 juin 2021;22(13):7017.
101. Hosseini A, Hashemi V, Shomali N, Asghari F, Gharibi T, Akbari M, et al. Innate and adaptive immune responses against coronavirus. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother.* déc 2020;132:110859.
102. Kim YM, Shin EC. Type I and III interferon responses in SARS-CoV-2 infection. *Exp Mol Med.* mai 2021;53(5):750-60.
103. Hadjadj J, Yatim N, Barnabei L, Corneau A, Boussier J, Smith N, et al. Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. *Science.* 7 août 2020;369(6504):718-24.
104. Lee S, Channappanavar R, Kanneganti TD. Coronaviruses: Innate Immunity, Inflammasome Activation, Inflammatory Cell Death, and Cytokines. *Trends Immunol.* déc 2020;41(12):1083-99.
105. Shimizu M. Clinical Features of Cytokine Storm Syndrome. In: Cron RQ, Behrens EM, éditeurs. *Cytokine Storm Syndrome [Internet].* Cham: Springer International Publishing; 2019 [cité 20 mars 2022]. p. 31-41. Disponible sur: [https://doi.org/10.1007/978-3-030-22094-5\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-030-22094-5_3)
106. Shah VK, Firmal P, Alam A, Ganguly D, Chattopadhyay S. Overview of Immune Response During SARS-CoV-2 Infection: Lessons From the Past. *Front Immunol.* 2020;11:1949.
107. Qin C, Zhou L, Hu Z, Zhang S, Yang S, Tao Y, et al. Dysregulation of Immune Response in Patients With Coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 28 juill 2020;71(15):762-8.
108. Chen G, Wu D, Guo W, Cao Y, Huang D, Wang H, et al. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. *J Clin Invest.* 1 mai 2020;130(5):2620-9.
109. Blanco-Melo D, Nilsson-Payant BE, Liu WC, Uhl S, Hoagland D, Møller R, et al. Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. *Cell.* 28 mai 2020;181(5):1036-1045.e9.
110. Diao B, Wang C, Tan Y, Chen X, Liu Y, Ning L, et al. Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Front Immunol.* 2020;11:827.
111. Liu Y, Zhang C, Huang F, Yang Y, Wang F, Yuan J, et al. Elevated plasma levels of selective cytokines in COVID-19 patients reflect viral load and lung injury. *Natl Sci Rev.* 1 juin 2020;7(6):1003-11.

112. Coperchini F, Chiovato L, Croce L, Magri F, Rotondi M. The cytokine storm in COVID-19: An overview of the involvement of the chemokine/chemokine-receptor system. *Cytokine Growth Factor Rev.* juin 2020;53:25-32.
113. König MF, Powell M, Staedtke V, Bai RY, Thomas DL, Fischer N, et al. Preventing cytokine storm syndrome in COVID-19 using  $\alpha$ -1 adrenergic receptor antagonists. *J Clin Invest.* 1 juill 2020;130(7):3345-7.
114. Toor D, Jain A, Kalhan S, Manocha H, Sharma VK, Jain P, et al. Tempering Macrophage Plasticity for Controlling SARS-CoV-2 Infection for Managing COVID-19 Disease. *Front Pharmacol.* 2020;11:570698.
115. Boumaza A, Gay L, Mezouar S, Bestion E, Diallo AB, Michel M, et al. Monocytes and Macrophages, Targets of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2: The Clue for Coronavirus Disease 2019 Immunoparalysis. *J Infect Dis.* 2 août 2021;224(3):395-406.
116. Abassi Z, Knaney Y, Karram T, Heyman SN. The Lung Macrophage in SARS-CoV-2 Infection: A Friend or a Foe? *Front Immunol [Internet].* 2020 [cité 27 mars 2022];11. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2020.01312>
117. Zhang D, Guo R, Lei L, Liu H, Wang Y, Wang Y, et al. Frontline Science: COVID-19 infection induces readily detectable morphologic and inflammation-related phenotypic changes in peripheral blood monocytes. *J Leukoc Biol.* janv 2021;109(1):13-22.
118. Qin S, Jiang Y, Wei X, Liu X, Guan J, Chen Y, et al. Dynamic changes in monocytes subsets in COVID-19 patients. *Hum Immunol.* mars 2021;82(3):170-6.
119. Liao M, Liu Y, Yuan J, Wen Y, Xu G, Zhao J, et al. Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19. *Nat Med.* juin 2020;26(6):842-4.
120. Collin M, Bigley V. Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology.* mai 2018;154(1):3-20.
121. Tang F, Du Q, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells in antiviral immunity and autoimmunity. *Sci China Life Sci.* févr 2010;53(2):172-82.
122. Arunachalam PS, Wimmers F, Mok CKP, Perera RAPM, Scott M, Hagan T, et al. Systems biological assessment of immunity to mild versus severe COVID-19 infection in humans. *Science.* 4 sept 2020;369(6508):1210-20.
123. Alculumbre SG, Saint-André V, Di Domizio J, Vargas P, Sirven P, Bost P, et al. Diversification of human plasmacytoid dendritic cells in response to a single stimulus. *Nat Immunol.* janv 2018;19(1):63-75.
124. Severa M, Diotti RA, Etna MP, Rizzo F, Fiore S, Ricci D, et al. Differential plasmacytoid dendritic cell phenotype and type I Interferon response in asymptomatic and severe COVID-19 infection. *PLoS Pathog.* sept 2021;17(9):e1009878.

125. Liu J, Liu Y, Xiang P, Pu L, Xiong H, Li C, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio predicts critical illness patients with 2019 coronavirus disease in the early stage. *J Transl Med.* 20 mai 2020;18(1):206.
126. Parackova Z, Zentsova I, Bloomfield M, Vrabцова P, Smetanova J, Klocperk A, et al. Disharmonic Inflammatory Signatures in COVID-19: Augmented Neutrophils' but Impaired Monocytes' and Dendritic Cells' Responsiveness. *Cells.* 29 sept 2020;9(10):E2206.
127. Zhou Z, Ren L, Zhang L, Zhong J, Xiao Y, Jia Z, et al. Heightened Innate Immune Responses in the Respiratory Tract of COVID-19 Patients. *Cell Host Microbe.* 10 juin 2020;27(6):883-890.e2.
128. Xiong Y, Liu Y, Cao L, Wang D, Guo M, Jiang A, et al. Transcriptomic characteristics of bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood mononuclear cells in COVID-19 patients. *Emerg Microbes Infect.* déc 2020;9(1):761-70.
129. Wang D, Hu B, Hu C, Zhu F, Liu X, Zhang J, et al. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA.* 17 mars 2020;323(11):1061-9.
130. Combes AJ, Courau T, Kuhn NF, Hu KH, Ray A, Chen WS, et al. Global absence and targeting of protective immune states in severe COVID-19. *Nature.* mars 2021;591(7848):124-30.
131. Sivori S, Vacca P, Del Zotto G, Munari E, Mingari MC, Moretta L. Human NK cells: surface receptors, inhibitory checkpoints, and translational applications. *Cell Mol Immunol.* mai 2019;16(5):430-41.
132. Wang F, Nie J, Wang H, Zhao Q, Xiong Y, Deng L, et al. Characteristics of Peripheral Lymphocyte Subset Alteration in COVID-19 Pneumonia. *J Infect Dis.* 11 mai 2020;221(11):1762-9.
133. Zheng M, Gao Y, Wang G, Song G, Liu S, Sun D, et al. Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. *Cell Mol Immunol.* mai 2020;17(5):533-5.
134. Mazzoni A, Salvati L, Maggi L, Capone M, Vanni A, Spinicci M, et al. Impaired immune cell cytotoxicity in severe COVID-19 is IL-6 dependent. *J Clin Invest.* 1 sept 2020;130(9):4694-703.
135. Chouaki Benmansour N, Carvelli J, Vivier E. Complement cascade in severe forms of COVID-19: Recent advances in therapy. *Eur J Immunol.* juill 2021;51(7):1652-9.
136. Ng N, Powell CA. Targeting the Complement Cascade in the Pathophysiology of COVID-19 Disease. *J Clin Med.* 19 mai 2021;10(10):2188.
137. Kurtovic L, Beeson JG. Complement Factors in COVID-19 Therapeutics and Vaccines. *Trends Immunol.* févr 2021;42(2):94-103.
138. Sinkovits G, Mező B, Réti M, Müller V, Iványi Z, Gál J, et al. Complement Overactivation and Consumption Predicts In-Hospital Mortality in SARS-CoV-2

Infection. *Front Immunol* [Internet]. 2021 [cité 21 mars 2022];12. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2021.663187>

139. Java A, Apicelli AJ, Liszewski MK, Coler-Reilly A, Atkinson JP, Kim AHJ, et al. The complement system in COVID-19: friend and foe? *JCI Insight* [Internet]. 6 août 2020 [cité 21 mars 2022];5(15). Disponible sur: <https://insight.jci.org/articles/view/140711>

140. Grifoni A, Weiskopf D, Ramirez SI, Mateus J, Dan JM, Moderbacher CR, et al. Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. *Cell*. 25 juin 2020;181(7):1489-1501.e15.

141. DiPiazza AT, Graham BS, Ruckwardt TJ. T cell immunity to SARS-CoV-2 following natural infection and vaccination. *Biochem Biophys Res Commun*. 29 janv 2021;538:211-7.

142. Mortaz E, Tabarsi P, Varahram M, Folkerts G, Adcock IM. The Immune Response and Immunopathology of COVID-19. *Front Immunol* [Internet]. 2020 [cité 20 mars 2022];11. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2020.02037>

143. Giamarellos-Bourboulis EJ, Netea MG, Rovina N, Akinosoglou K, Antoniadou A, Antonakos N, et al. Complex Immune Dysregulation in COVID-19 Patients with Severe Respiratory Failure. *Cell Host Microbe*. 10 juin 2020;27(6):992-1000.e3.

144. Yang L, Liu S, Liu J, Zhang Z, Wan X, Huang B, et al. COVID-19: immunopathogenesis and Immunotherapeutics. *Signal Transduct Target Ther*. 25 juill 2020;5(1):1-8.

145. Vabret N, Britton GJ, Gruber C, Hegde S, Kim J, Kuksin M, et al. Immunology of COVID-19: Current State of the Science. *Immunity*. 16 juin 2020;52(6):910-41.

146. Remy KE, Mazer M, Striker DA, Ellebedy AH, Walton AH, Unsinger J, et al. Severe immunosuppression and not a cytokine storm characterizes COVID-19 infections. *JCI Insight* [Internet]. 15 févr 2021 [cité 20 mars 2022];5(17). Disponible sur: <https://insight.jci.org/articles/view/140329>

147. Li S, Jiang L, Li X, Lin F, Wang Y, Li B, et al. Clinical and pathological investigation of patients with severe COVID-19. *JCI Insight*. 18 juin 2020;5(12):138070.

148. Candia P de, Prattichizzo F, Garavelli S, Matarese G. T Cells: Warriors of SARS-CoV-2 Infection. *Trends Immunol*. 1 janv 2021;42(1):18-30.

149. Weiskopf D, Schmitz KS, Raadsen MP, Grifoni A, Okba NMA, Endeman H, et al. Phenotype and kinetics of SARS-CoV-2-specific T cells in COVID-19 patients with acute respiratory distress syndrome. *Sci Immunol*. 26 juin 2020;5(48):eabd2071.

150. Wu D, Yang XO. TH17 responses in cytokine storm of COVID-19: An emerging target of JAK2 inhibitor Fedratinib. *J Microbiol Immunol Infect Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi*. juin 2020;53(3):368-70.

151. Röltgen K, Boyd SD. Antibody and B cell responses to SARS-CoV-2 infection and vaccination. *Cell Host Microbe*. 14 juill 2021;29(7):1063-75.

152. Baumgarth N, Nikolich-Zugich J, Lee FEH, Bhattacharya D. Antibody Responses to SARS-CoV-2: Let's Stick to Known Knowns. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1 nov 2020;205(9):2342-50.
153. Quast I, Tarlinton D. B cell memory: understanding COVID-19. *Immunity*. 9 févr 2021;54(2):205-10.
154. Zhao J, Yuan Q, Wang H, Liu W, Liao X, Su Y, et al. Antibody Responses to SARS-CoV-2 in Patients With Novel Coronavirus Disease 2019. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 19 nov 2020;71(16):2027-34.
155. Suthar MS, Zimmerman MG, Kauffman RC, Mantus G, Linderman SL, Hudson WH, et al. Rapid Generation of Neutralizing Antibody Responses in COVID-19 Patients. *Cell Rep Med*. 23 juin 2020;1(3):100040.
156. To KKW, Tsang OTY, Leung WS, Tam AR, Wu TC, Lung DC, et al. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis*. 1 mai 2020;20(5):565-74.
157. Guo L, Ren L, Yang S, Xiao M, Chang D, Yang F, et al. Profiling Early Humoral Response to Diagnose Novel Coronavirus Disease (COVID-19). *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 28 juill 2020;71(15):778-85.
158. Grzelak L, Temmam S, Planchais C, Demeret C, Huon C, Guivel-Benhassine F, et al. SARS-CoV-2 serological analysis of COVID-19 hospitalized patients, pauci-symptomatic individuals and blood donors [Internet]. medRxiv; 2020 [cité 2 mars 2022]. p. 2020.04.21.20068858. Disponible sur: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.04.21.20068858v1>
159. Iyer AS, Jones FK, Nodoushani A, Kelly M, Becker M, Slater D, et al. Persistence and decay of human antibody responses to the receptor binding domain of SARS-CoV-2 spike protein in COVID-19 patients. *Sci Immunol*. 8 oct 2020;5(52):eabe0367.
160. Röltgen K, Powell AE, Wirz OF, Stevens BA, Hogan CA, Najeeb J, et al. Defining the features and duration of antibody responses to SARS-CoV-2 infection associated with disease severity and outcome. *Sci Immunol*. 7 déc 2020;5(54):eabe0240.
161. Stephens DS, McElrath MJ. COVID-19 and the Path to Immunity. *JAMA*. 6 oct 2020;324(13):1279-81.
162. Taylor PC, Adams AC, Hufford MM, de la Torre I, Winthrop K, Gottlieb RL. Neutralizing monoclonal antibodies for treatment of COVID-19. *Nat Rev Immunol*. juin 2021;21(6):382-93.
163. Seydoux E, Homad LJ, MacCamy AJ, Parks KR, Hurlburt NK, Jennewein MF, et al. Analysis of a SARS-CoV-2-Infected Individual Reveals Development of Potent Neutralizing Antibodies with Limited Somatic Mutation. *Immunity*. 14 juill 2020;53(1):98-105.e5.
164. Sette A, Crotty S. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell*. 18 févr 2021;184(4):861-80.

165. Arvin AM, Fink K, Schmid MA, Cathcart A, Spreafico R, Havenar-Daughton C, et al. A perspective on potential antibody-dependent enhancement of SARS-CoV-2. *Nature*. août 2020;584(7821):353-63.
166. Update 49 – Une mise à jour sur la réponse immunitaire au SARS-CoV-2 et aux infections virales [Internet]. [cité 5 mars 2022]. Disponible sur: <https://www.who.int/fr/publications/m/item/update-49-immune-response-to-sars-cov-2-viral-infections>
167. Vanshylla K, Di Cristanziano V, Kleipass F, Dewald F, Schommers P, Giesemann L, et al. Kinetics and correlates of the neutralizing antibody response to SARS-CoV-2 infection in humans. *Cell Host Microbe*. 9 juin 2021;29(6):917-929.e4.
168. Chvatal-Medina M, Mendez-Cortina Y, Patiño PJ, Velilla PA, Rugeles MT. Antibody Responses in COVID-19: A Review. *Front Immunol*. 2021;12:633184.
169. Hansen CB, Jarlhelt I, Pérez-Alós L, Landsy LH, Loftager M, Rosbjerg A, et al. SARS-CoV-2 Antibody Responses Are Correlated to Disease Severity in COVID-19 Convalescent Individuals. *J Immunol* [Internet]. 18 nov 2020 [cité 2 mars 2022]; Disponible sur: <https://www.jimmunol.org/content/early/2020/11/17/jimmunol.2000898>
170. Shen C, Wang Z, Zhao F, Yang Y, Li J, Yuan J, et al. Treatment of 5 Critically Ill Patients With COVID-19 With Convalescent Plasma. *JAMA*. 28 avr 2020;323(16):1582-9.
171. Lee WS, Wheatley AK, Kent SJ, DeKosky BJ. Antibody-dependent enhancement and SARS-CoV-2 vaccines and therapies. *Nat Microbiol*. oct 2020;5(10):1185-91.
172. Luo F, Liao FL, Wang H, Tang HB, Yang ZQ, Hou W. Evaluation of Antibody-Dependent Enhancement of SARS-CoV Infection in Rhesus Macaques Immunized with an Inactivated SARS-CoV Vaccine. *Virol Sin*. avr 2018;33(2):201-4.
173. Coronavirus : les tests sérologiques [Internet]. [cité 5 mars 2022]. Disponible sur: <https://www.bretagne.ars.sante.fr/coronavirus-les-tests-serologiques>
174. Recommendations for national SARS-CoV-2 testing strategies and diagnostic capacities [Internet]. [cité 16 févr 2022]. Disponible sur: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/WHO-2019-nCoV-lab-testing-2021.1-eng>
175. Kevadiya BD, Machhi J, Herskovitz J, Oleynikov MD, Blomberg WR, Bajwa N, et al. Diagnostics for SARS-CoV-2 infections. *Nat Mater*. mai 2021;20(5):593-605.
176. Hantz S. Diagnostic biologique de l'infection à Sars-CoV-2 : stratégies et interprétation des résultats. *Rev Francoph Lab*. nov 2020;2020(526):48-56.
177. Shen Z, Xiao Y, Kang L, Ma W, Shi L, Zhang L, et al. Genomic diversity of SARS-CoV-2 in Coronavirus Disease 2019 patients. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 9 mars 2020;ciaa203.
178. Smyrlaki I, Ekman M, Lentini A, Rufino de Sousa N, Papanicolaou N, Vondracek M, et al. Massive and rapid COVID-19 testing is feasible by extraction-free SARS-CoV-2 RT-PCR. *Nat Commun*. 23 sept 2020;11(1):4812.

179. Huang P, Wang H, Cao Z, Jin H, Chi H, Zhao J, et al. A Rapid and Specific Assay for the Detection of MERS-CoV. *Front Microbiol.* 29 mai 2018;9:1101.
180. Covid-19 : les tests salivaires RT-LAMP intégrés présentent des performances trop hétérogènes [Internet]. Haute Autorité de Santé. [cité 7 mars 2022]. Disponible sur: [https://www.has-sante.fr/jcms/p\\_3280326/fr/covid-19-les-tests-salivaires-rt-lamp-integres-presentent-des-performances-trop-heterogenes](https://www.has-sante.fr/jcms/p_3280326/fr/covid-19-les-tests-salivaires-rt-lamp-integres-presentent-des-performances-trop-heterogenes)
181. Lambert-Niclot S, Cuffel A, Le Pape S, Vauloup-Fellous C, Morand-Joubert L, Roque-Afonso AM, et al. Evaluation of a Rapid Diagnostic Assay for Detection of SARS-CoV-2 Antigen in Nasopharyngeal Swabs. *J Clin Microbiol.* 23 juill 2020;58(8):e00977-20.
182. Test Rapide Antigénique SARS-CoV-2 [Internet]. Diagnostics. [cité 10 mars 2022]. Disponible sur: <https://diagnostics.roche.com/fr/fr/products/params/sars-cov-2-rapid-antigen-test.html>
183. Ong DSY, Fragkou PC, Schweitzer VA, Chemaly RF, Moschopoulos CD, Skevaki C, et al. How to interpret and use COVID-19 serology and immunology tests. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* juill 2021;27(7):981-6.
184. Carter LJ, Garner LV, Smoot JW, Li Y, Zhou Q, Saveson CJ, et al. Assay Techniques and Test Development for COVID-19 Diagnosis. *ACS Cent Sci.* 27 mai 2020;6(5):591-605.
185. Safiabadi Tali SH, LeBlanc JJ, Sadiq Z, Oyewunmi OD, Camargo C, Nikpour B, et al. Tools and Techniques for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)/COVID-19 Detection. *Clin Microbiol Rev.* 34(3):e00228-20.
186. Cinquanta L, Fontana DE, Bizzaro N. Chemiluminescent immunoassay technology: what does it change in autoantibody detection? *Auto-Immun Highlights.* déc 2017;8(1):9.
187. Machado BAS, Hodel KVS, Barbosa-Júnior VG, Soares MBP, Badaró R. The Main Molecular and Serological Methods for Diagnosing COVID-19: An Overview Based on the Literature. *Viruses.* 29 déc 2020;13(1):E40.
188. Li Z, Yi Y, Luo X, Xiong N, Liu Y, Li S, et al. Development and clinical application of a rapid IgM-IgG combined antibody test for SARS-CoV-2 infection diagnosis. *J Med Virol.* sept 2020;92(9):1518-24.
189. Mekonnen D, Mengist HM, Derby A, Nibret E, Munshea A, He H, et al. Diagnostic accuracy of serological tests and kinetics of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 antibody: A systematic review and meta-analysis. *Rev Med Virol.* mai 2021;31(3):e2181.
190. Hachim A, Kavian N, Cohen CA, Chin AWH, Chu DKW, Mok CKP, et al. ORF8 and ORF3b antibodies are accurate serological markers of early and late SARS-CoV-2 infection. *Nat Immunol.* oct 2020;21(10):1293-301.
191. Slota M, Lim JB, Dang Y, Disis ML. ELISpot for measuring human immune responses to vaccines. *Expert Rev Vaccines.* mars 2011;10(3):299-306.

192. Köller MD, Kiener HP, Aringer M, Graninger WB, Meuer S, Samstag Y, et al. Functional and molecular aspects of transient T cell unresponsiveness: role of selective interleukin-2 deficiency. *Clin Exp Immunol.* 2003;132(2):225-31.
193. Kouwenhoven M, Özenci V, Teleshova N, Hussein Y, Huang YM, Eusebio A, et al. Enzyme-Linked Immunospot Assays Provide a Sensitive Tool for Detection of Cytokine Secretion by Monocytes. *Clin Diagn Lab Immunol.* nov 2001;8(6):1248-57.
194. Tanguay S, Killion JJ. Direct comparison of ELISPOT and ELISA-based assays for detection of individual cytokine-secreting cells. *Lymphokine Cytokine Res.* août 1994;13(4):259-63.
195. Cox JH, Ferrari G, Janetzki S. Measurement of cytokine release at the single cell level using the ELISPOT assay. *Methods.* 1 avr 2006;38(4):274-82.
196. Lehmann AA, Kirchenbaum GA, Zhang T, Reche PA, Lehmann PV. Deconvoluting the T Cell Response to SARS-CoV-2: Specificity Versus Chance and Cognate Cross-Reactivity. *Front Immunol.* 2021;12:982.
197. Rydyznski Moderbacher C, Ramirez SI, Dan JM, Grifoni A, Hastie KM, Weiskopf D, et al. Antigen-Specific Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 in Acute COVID-19 and Associations with Age and Disease Severity. *Cell.* 12 nov 2020;183(4):996-1012.e19.
198. Sekine T, Perez-Potti A, Rivera-Ballesteros O, Strålin K, Gorin JB, Olsson A, et al. Robust T Cell Immunity in Convalescent Individuals with Asymptomatic or Mild COVID-19. *Cell.* 1 oct 2020;183(1):158-168.e14.
199. Wei J, Zhao J, Han M, Meng F, Zhou J. SARS-CoV-2 infection in immunocompromised patients: humoral versus cell-mediated immunity. *J Immunother Cancer.* 29 juill 2020;8(2):e000862.
200. VEKLURY (remdesivir) [Internet]. Haute Autorité de Santé. [cité 20 mars 2022]. Disponible sur: [https://www.has-sante.fr/jcms/p\\_3201793/fr/veklury-remdesivir](https://www.has-sante.fr/jcms/p_3201793/fr/veklury-remdesivir)
201. EMA. Veklury [Internet]. European Medicines Agency. 2020 [cité 20 mars 2022]. Disponible sur: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/veklury>
202. FDA Approves Veklury® (Remdesivir) for the Treatment of Non-Hospitalized Patients at High Risk for COVID-19 Disease Progression [Internet]. [cité 20 mars 2022]. Disponible sur: <https://www.gilead.com/news-and-press/press-room/press-releases/2022/1/fda-approves-veklury-remdesivir-for-the-treatment-of-nonhospitalized-patients-at-high-risk-for-covid19-disease-progression>
203. Laura D. EVUSHELD (tixagévimab 150mg / cilgavimab 150 mg). :43.
204. ctap71\_evusheld\_ap\_aut\_pre\_amm.pdf [Internet]. [cité 30 mars 2022]. Disponible sur: [https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2022-03/ctap71\\_evusheld\\_ap\\_aut\\_pre\\_amm.pdf](https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2022-03/ctap71_evusheld_ap_aut_pre_amm.pdf)
205. ATU/RTU - Tixagévimab 150 mg / Cilgavimab 150 mg, solution injectable (Evusheld) - ANSM [Internet]. [cité 30 mars 2022]. Disponible sur: <https://ansm.sante.fr/tableau-atu-rtu/tixagevimab-150-mg-cilgavimab-150-mg-solution-injectable-evusheld>

206. ronapreve-epar-product-information\_fr.pdf [Internet]. [cité 28 mars 2022]. Disponible sur: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/ronapreve-epar-product-information\\_fr.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/ronapreve-epar-product-information_fr.pdf)
207. RONAPREVE (casirivimab-imdevimab) [Internet]. Haute Autorité de Santé. [cité 28 mars 2022]. Disponible sur: [https://www.has-sante.fr/jcms/p\\_3318295/fr/ronapreve-casirivimab-imdevimab](https://www.has-sante.fr/jcms/p_3318295/fr/ronapreve-casirivimab-imdevimab)
208. dgs-urgent\_\_2022-03\_acm\_.pdf [Internet]. [cité 29 mars 2022]. Disponible sur: [https://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/dgs-urgent\\_\\_2022-03\\_acm\\_.pdf](https://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/dgs-urgent__2022-03_acm_.pdf)
209. Coronavirus : outils de prévention destinés aux professionnels de santé et au grand public [Internet]. [cité 7 mars 2022]. Disponible sur: <https://www.santepubliquefrance.fr/dossiers/coronavirus-covid-19/coronavirus-outils-de-prevention-destines-aux-professionnels-de-sante-et-au-grand-public>
210. Coronavirus disease (COVID-19): Vaccines [Internet]. [cité 6 mars 2022]. Disponible sur: [https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/coronavirus-disease-\(covid-19\)-vaccines](https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/coronavirus-disease-(covid-19)-vaccines)
211. Forni G, Mantovani A. COVID-19 vaccines: where we stand and challenges ahead. *Cell Death Differ.* févr 2021;28(2):626-39.
212. The ELISpot Assay Enables Functional Analysis of Cellular Immunology [Internet]. [cité 10 mars 2022]. Disponible sur: <https://www.sigmaaldrich.com/FR/fr/technical-documents/technical-article/protein-biology/elisa/elispot-assays-state-of-the-art-tools-for-functional-analysis-of-cellular-immunology>
213. Gudbjartsson DF, Norddahl GL, Melsted P, Gunnarsdottir K, Holm H, Eythorsson E, et al. Humoral Immune Response to SARS-CoV-2 in Iceland. *N Engl J Med.* 1 sept 2020;NEJMoa2026116.
214. Altmann DM, Boyton RJ. SARS-CoV-2 T cell immunity: Specificity, function, durability, and role in protection. *Sci Immunol.* 17 juill 2020;5(49):eabd6160.
215. Piccoli L, Park YJ, Tortorici MA, Czudnochowski N, Walls AC, Beltramello M, et al. Mapping Neutralizing and Immunodominant Sites on the SARS-CoV-2 Spike Receptor-Binding Domain by Structure-Guided High-Resolution Serology. *Cell.* 12 nov 2020;183(4):1024-1042.e21.
216. Cervia C, Nilsson J, Zurbuchen Y, Valaperti A, Schreiner J, Wolfensberger A, et al. Systemic and mucosal antibody responses specific to SARS-CoV-2 during mild versus severe COVID-19. *J Allergy Clin Immunol.* févr 2021;147(2):545-557.e9.
217. Long QX, Tang XJ, Shi QL, Li Q, Deng HJ, Yuan J, et al. Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. *Nat Med.* août 2020;26(8):1200-4.
218. Ibarrondo FJ, Fulcher JA, Goodman-Meza D, Elliott J, Hofmann C, Hausner MA, et al. Rapid Decay of Anti-SARS-CoV-2 Antibodies in Persons with Mild Covid-19. *N Engl J Med.* 21 juill 2020;NEJMc2025179.

219. Zuo J, Dowell AC, Pearce H, Verma K, Long HM, Begum J, et al. Robust SARS-CoV-2-specific T cell immunity is maintained at 6 months following primary infection. *Nat Immunol.* mai 2021;22(5):620-6.
220. Le Bert N, Tan AT, Kunasegaran K, Tham CYL, Hafezi M, Chia A, et al. SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls. *Nature.* 20 août 2020;584(7821):457-62.
221. Tan AT, Linster M, Tan CW, Le Bert N, Chia WN, Kunasegaran K, et al. Early induction of functional SARS-CoV-2-specific T cells associates with rapid viral clearance and mild disease in COVID-19 patients. *Cell Rep.* 9 févr 2021;34(6):108728.
222. Weiskopf D, Schmitz KS, Raadsen MP, Grifoni A, Okba NMA, Endeman H, et al. Phenotype and kinetics of SARS-CoV-2-specific T cells in COVID-19 patients with acute respiratory distress syndrome. *Sci Immunol.* 26 juin 2020;5(48):eabd2071.
223. Zhao Q, Meng M, Kumar R, Wu Y, Huang J, Deng Y, et al. Lymphopenia is associated with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) infections: A systemic review and meta-analysis. *Int J Infect Dis.* juill 2020;96:131-5.
224. Lehmann PV, Zhang W. Unique strengths of ELISPOT for T cell diagnostics. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2012;792:3-23.
225. Liu X, Shaw RH, Stuart ASV, Greenland M, Aley PK, Andrews NJ, et al. Safety and immunogenicity of heterologous versus homologous prime-boost schedules with an adenoviral vectored and mRNA COVID-19 vaccine (Com-COV): a single-blind, randomised, non-inferiority trial. *Lancet Lond Engl.* 4 sept 2021;398(10303):856-69.
226. Wyllie D, Jones HE, Mulchandani R, Trickey A, Taylor-Phillips S, Brooks T, et al. SARS-CoV-2 responsive T cell numbers and anti-Spike IgG levels are both associated with protection from COVID-19: A prospective cohort study in keyworkers [Internet]. 2021 mai [cité 28 sept 2021] p. 2020.11.02.20222778. Disponible sur: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.11.02.20222778v2>
227. 2021LILUM157.pdf [Internet]. [cité 1 avr 2022]. Disponible sur: [https://pepite-depot.univ-lille.fr/LIBRE/Th\\_Medecine/2021/2021LILUM157.pdf](https://pepite-depot.univ-lille.fr/LIBRE/Th_Medecine/2021/2021LILUM157.pdf)
228. Tan W, Lu Y, Zhang J, Wang J, Dan Y, Tan Z, et al. Viral Kinetics and Antibody Responses in Patients with COVID-1 [Internet]. 2020 [cité 2 avr 2022]. Disponible sur: <https://europepmc.org/article/PPR/PPR126958>
229. Mateus J, Grifoni A, Tarke A, Sidney J, Ramirez SI, Dan JM, et al. Selective and cross-reactive SARS-CoV-2 T cell epitopes in unexposed humans. *Science.* 2 oct 2020;370(6512):89-94.
230. Braun J, Loyal L, Frentsch M, Wendisch D, Georg P, Kurth F, et al. SARS-CoV-2-reactive T cells in healthy donors and patients with COVID-19. *Nature.* nov 2020;587(7833):270-4.
231. Sethuraman N, Jeremiah SS, Ryo A. Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2. *JAMA.* 9 juin 2020;323(22):2249-51.

232. Yongchen Z, Shen H, Wang X, Shi X, Li Y, Yan J, et al. Different longitudinal patterns of nucleic acid and serology testing results based on disease severity of COVID-19 patients. *Emerg Microbes Infect.* déc 2020;9(1):833-6.
233. Thieme CJ, Anft M, Paniskaki K, Blazquez-Navarro A, Doevelaar A, Seibert FS, et al. The SARS-CoV-2 T-cell immunity is directed against the spike, membrane, and nucleocapsid protein and associated with COVID 19 severity [Internet]. medRxiv; 2020 [cité 3 avr 2022]. p. 2020.05.13.20100636. Disponible sur: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.05.13.20100636v1>
234. Ng OW, Chia A, Tan AT, Jadi RS, Leong HN, Bertoletti A, et al. Memory T cell responses targeting the SARS coronavirus persist up to 11 years post-infection. *Vaccine.* 12 avr 2016;34(17):2008-14.
235. Dan JM, Mateus J, Kato Y, Hastie KM, Yu ED, Faliti CE, et al. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science.* 6 janv 2021;eabf4063.
236. Demaret J, Lefèvre G, Vuotto F, Trauet J, Duhamel A, Labreuche J, et al. Severe SARS-CoV-2 patients develop a higher specific T-cell response. *Clin Transl Immunol.* 2020;9(12):e1217.
237. Covid-19 : facteurs de risques hospitalisation décès [Internet]. EPI-PHARE. 2021 [cité 3 avr 2022]. Disponible sur: <https://www.epi-phare.fr/rapports-detudes-et-publications/covid-19-facteurs-risques/>
238. Gallais F, Velay A, Nazon C, Wendling MJ, Partisani M, Sibilia J, et al. Intrafamilial Exposure to SARS-CoV-2 Associated with Cellular Immune Response without Seroconversion, France. *Emerg Infect Dis.* janv 2021;27(1):113-21.
239. McMahan K, Yu J, Mercado NB, Loos C, Tostanoski LH, Chandrashekar A, et al. Correlates of Protection Against SARS-CoV-2 in Rhesus Macaques. *Nature.* févr 2021;590(7847):630-4.
240. Sauer K, Harris T. An Effective COVID-19 Vaccine Needs to Engage T Cells. *Front Immunol.* 2020;11:2371.
241. Sahin U, Muik A, Derhovanessian E, Vogler I, Kranz LM, Vormehr M, et al. COVID-19 vaccine BNT162b1 elicits human antibody and TH1 T cell responses. *Nature.* oct 2020;586(7830):594-9.
242. Jackson LA, Anderson EJ, Roupheal NG, Roberts PC, Makhene M, Coler RN, et al. An mRNA Vaccine against SARS-CoV-2 — Preliminary Report. *N Engl J Med.* 12 nov 2020;383(20):1920-31.
243. Folegatti PM, Ewer KJ, Aley PK, Angus B, Becker S, Belij-Rammerstorfer S, et al. Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2: a preliminary report of a phase 1/2, single-blind, randomised controlled trial. *The Lancet.* 15 août 2020;396(10249):467-78.
244. Kruse M, Dark C, Aspden M, Cochrane D, Competiello R, Peltz M, et al. Performance of the T-SPOT®.COVID test for detecting SARS-CoV-2-responsive T cells. *Int J Infect Dis.* 1 déc 2021;113:155-61.

245. Demaret J, Corroyer-Simovic B, Alidjinou EK, Goffard A, Trauet J, Miczek S, et al. Impaired Functional T-Cell Response to SARS-CoV-2 After Two Doses of BNT162b2 mRNA Vaccine in Older People. *Front Immunol.* 2021;12:778679.

Université de Lille  
FACULTE DE PHARMACIE DE LILLE  
**MÉMOIRE de DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES**  
**(tenant lieu de Thèse en vue du Diplôme d'État de Docteur en Pharmacie)**  
Année Universitaire 2021/2022

**Nom : LUPAU épouse CODREAN**  
**Prénom : Daniela**

**Titre du mémoire / thèse :** Mise en place de la technique ELISpot anti-SARS-CoV-2 et suivi de l'immunité T spécifique des patients infectés du CHU de Lille

**Mots-clés :** COVID-19, SARS-CoV-2, Immunité cellulaire, ELISpot, INF- $\gamma$ , lymphocytes T spécifiques

---

**Résumé :**

**Contexte :** Depuis son apparition en décembre 2019, le SARS-CoV-2 a été responsable d'une pandémie mondiale avec des conséquences socio-économiques importantes. La physiopathologie variable allant d'infections asymptomatiques à une sévérité clinique entraînant le décès de millions de personnes est importante à comprendre, en lien avec le rôle de la réponse immunitaire face à ce virus. Nous avons souhaité évaluer la réponse immunitaire adaptative des patients infectés par le SARS-CoV-2 au CHU de Lille, et proposer un nouvel outil diagnostique permettant le suivi immunologique des patients COVID-19 à long terme.

**Matériel et méthodes :** Nous avons mis en place la technique immuno-enzymatique ELISpot COVID permettant de quantifier les lymphocytes T (LT) sécréteurs d'IFN $\gamma$  spécifiques des principaux antigènes viraux du SARS-CoV-2. Des pools de peptides construits à partir des séquences de protéines virales M, N et S et d'un mélange (mix MNS) ont été utilisés comme antigènes. À l'aide de ce test, nous avons évalué les réponses des LT chez les patients atteints d'infection à SARS-CoV-2 légère, modérée et sévère et dans des échantillons de contrôle prélevés avant la pandémie. Le suivi de la cinétique des réponses T d'une cohorte de patients selon la même classification clinique (légère, modérée, sévère) a été évaluée jusqu'à 6 mois post-infection.

**Résultats :** En utilisant le mix MNS, le test ELISpot COVID a montré une spécificité de 96,7 % (IC à 95 %, 88,5-99,6 %) et une spécificité de 90,3 % (75,2-98,0 %). Sur les 159 patients évalués pour le suivi de l'immunité, nous avons mis en évidence que les patients sévères développaient une réponse spécifique des lymphocytes T plus élevée contre l'infection par le SARS-CoV-2. Cette réponse immunitaire perdure dans le temps, au moins jusqu'à 6 mois après le début des symptômes, mais diminue significativement dans le temps, quelle que soit la forme clinique initiale. De plus, il a été montré qu'il existe une corrélation entre la sévérité clinique et la réponse immunitaire adaptative.

**Conclusion :** Le test ELISpot COVID est une méthode fiable pour explorer des LT spécifiques. Ce test peut devenir un outil utile pour évaluer la réponse des LT mémoires de longue durée après une infection naturelle ou après vaccination.

**Membres du jury :**

**Président :** Madame le Professeur DUPONT Annabelle, PU-PH, CHU Lille

**Assesseur(s) :** Monsieur le Docteur LEFEVRE Guillaume, MCU-PH, CHU Lille  
Monsieur le Docteur MICHEL Moïse, PHC, CHU Nîmes

**Directeur de thèse :** Madame le Docteur DEMARET Julie, MCU-PH, CHU Lille