

## Faculté de Pharmacie

Année 2022

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

le 14 avril 2022

Par

Rémy Formento

# Impact d'une infection sévère au SARS-Cov-2 sur le système immunitaire

Thèse dirigée par Monsieur le Professeur Jean FEUILLARD

### Examineurs :

Madame le Professeur Sylvie ROGEZ.....Présidente du jury  
Monsieur le Professeur Jean FEUILLARD.....Directeur de thèse  
Monsieur le Docteur Robin JEANNET.....Juge  
Monsieur le Docteur Thomas DAIX.....Juge  
Monsieur le Docteur David RIZZO.....Juge





## Faculté de Pharmacie

Année 2022

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

le 14 avril 2022

Par Rémy Formento

# Impact d'une infection sévère au SARS-Cov-2 sur le système immunitaire

Thèse dirigée par Monsieur le Professeur Jean FEUILLARD

Examineurs :

Madame le Professeur Sylvie ROGEZ.....Présidente du jury  
Monsieur le Professeur Jean FEUILLARD.....Directeur de thèse  
Monsieur le Docteur Robin JEANNET.....Juge  
Monsieur le Docteur Thomas DAIX.....Juge  
Monsieur le Docteur David RIZZO.....Juge



# Liste des enseignants

---

Le 1<sup>er</sup> septembre 2021

## Doyen de la Faculté

Monsieur le Professeur COURTIOUX Bertrand

## Vice-doyen de la Faculté

Monsieur LÉGER David, Maître de conférences

## Assesseurs de la Faculté

Monsieur le Professeur BATTU Serge

Monsieur le Professeur PICARD Nicolas

## Professeurs des Universités – Hospitalo-Universitaires

M. PICARD Nicolas	Pharmacologie
Mme ROGEZ Sylvie	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
M. SAINT-MARCOUX Franck	Toxicologie

## Professeurs des Universités – Universitaires

M. BATTU Serge	Chimie analytique et bromatologie
M. CARDOT Philippe	Chimie analytique et bromatologie
M. COURTIOUX Bertrand	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
M. DESMOULIERE Alexis	Physiologie
M. DUROUX Jean-Luc	Biophysique et mathématiques
Mme FAGNÈRE Catherine	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
M. LIAGRE Bertrand	Biochimie et biologie moléculaire
Mme MAMBU Lengo	Pharmacognosie
M. TROUILLAS Patrick	Biophysique et mathématiques

**Mme VIANA Marylène** Pharmacie galénique

**Maitres de Conférences des Universités – Hospitalo-Universitaires**

**M. BARRAUD Olivier (\*)** Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie

**Mme. CHAUZEIX Jasmine** Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie

**M. JOST Jérémie** Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique

**Maitres de Conférences des Universités – Universitaires**

**M. BASLY Jean-Philippe (\*)** Chimie analytique et bromatologie

**Mme BEAUBRUN-GIRY Karine** Pharmacie galénique

**Mme BÉGAUD Gaëlle** Chimie analytique et bromatologie

**M. BILLET Fabrice** Physiologie

**M. CALLISTE Claude** Biophysique et mathématiques

**M. CHEMIN Guillaume** Biochimie et biologie moléculaire

**Mme CLÉDAT Dominique** Chimie analytique et bromatologie

**M. COMBY Francis** Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique

**Mme COOK-MOREAU Jeanne** Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie

**Mme DELEBASSÉE Sylvie** Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie

**Mme DEMIOT Claire-Elise (\*)** Pharmacologie

**M. FABRE Gabin** Biophysique et mathématiques

**M. FROISSARD Didier** Botanique et cryptogamie

**Mme JAMBUT Anne-Catherine (\*)** Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique

**M. LABROUSSE Pascal (\*)** Botanique et cryptogamie

**Mme LAVERDET Betty** Pharmacie galénique

<b>M. LAWSON Roland</b>	Pharmacologie
<b>M. LÉGER David</b>	Biochimie et biologie moléculaire
<b>Mme MARRE-FOURNIER Françoise</b>	Biochimie et biologie moléculaire
<b>M. MERCIER Aurélien</b>	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
<b>Mme MILLOT Marion (*)</b>	Pharmacognosie
<b>Mme PASCAUD-MATHIEU Patricia</b>	Pharmacie galénique
<b>Mme POUGET Christelle (*)</b>	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
<b>M. TOUBLET François-Xavier</b>	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
<b>M. VIGNOLES Philippe (*)</b>	Biophysique et mathématiques

**(\*) Titulaire de l'Habilitation à Diriger des Recherches (HDR)**

**Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche**

**Mme AUDITEAU Émilie**                      Épidémiologie, statistique, santé publique

**Enseignants d'anglais**

**M. HEGARTY Andrew**                      Chargé de cours

**Mme VERCELLIN Karen**                      Professeur certifié

## Remerciements

---

A Madame le Professeur Sylvie ROGEZ, je vous remercie de me faire l'honneur de présider ce jury. Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect.

A Monsieur le Professeur Jean FEUILLARD, je vous remercie de m'avoir proposé ce projet et de m'avoir fait confiance du début jusqu'à la fin. Veuillez recevoir toute ma reconnaissance et tout mon respect. Je vous remercie aussi pour tous les conseils que ce soit pour ce projet ou pendant l'internat, et de m'avoir accueillie au sein de votre service pendant plusieurs semestres.

A Monsieur le Docteur Robin JEANNET, je te remercie de m'avoir accepté de travailler à tes côtés durant tout ce projet, pour ta patience, ta bienveillance et pour tous tes conseils qui je le sais me serviront pour ma carrière future. Je t'exprime toute mon admiration et mon respect.

A Monsieur le Docteur Thomas DAIX, je vous remercie de m'avoir accepté dans ce projet et m'avoir appris le versant clinique de ce projet. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et de mon profond respect.

A Monsieur le Docteur David RIZZO, je te remercie d'avoir accepté de juger ce travail. Je tiens à t'exprimer tout mon respect. Et je te remercie de tes précieux conseils au cours des différents stages au laboratoire d'hématologie.

A toute l'équipe du service d'hématologie et du service d'immunologie du CHU de Limoges. Merci de m'avoir appris, guidé, encouragé tout au long de ces semestres. Et particulièrement aux techniciens de Cytométrie du service d'hématologie : Anne et Stéphane pour m'avoir aidé à effectuer à bien ce travail.

Merci à mes co-internes d'immunologie Juliette et Séléna de m'avoir soutenu et supporter tout au long de ce semestre, et pour les bons moments passés à vos cotés, une équipe de choc. Sans vous, le semestre ne serait pas pareil. En espérant garder contact avec vous après ce semestre.

Merci à toi mon cher Yohann, pour tout le soutien que tu m'as apporté pendant toutes ces années d'internat, alors qu'on n'a jamais été co-interne. Merci pour ton humour, tes conseils à l'escalade. Peut-être un jour à Guéret, qui sait. Et à ta femme Adélaïde.

Merci à toi mon grand Maxime, le premier interne que j'ai connu en arrivant dans cette belle ville qui est Limoges, et aujourd'hui, un ami. Merci pour ton humour, ton soutien, tes conseils et de m'avoir fait découvrir l'escalade alors que j'ai la peur du vide, maintenant moins. En espérant que ton genou guérisse rapidement et que tu puisses nous impressionner à nouveau à l'escalade.

Merci à toi Guillaume, qui a été un co-interne de choc et un ami. En espérant que tu trouveras le bonheur dans ta carrière professionnelle.

Merci à ma grande famille de biologie de Limoges : Benjamin, Alice, Ali, Sylvain et Catalina, Alexandre, Mouaffek et Malika, Mylène, Virginie, Marine, Marie-Fleur, Charlotte, Etienne H, Robin, Théo, Etienne VM, Caroline, Marwan, Wasfi, Nicolas, Sarah N, Saoussane, Victor, Sarah M, Cassandra... et aux cliniciens d'hémato-clinique : Prune, Clémence, Kentin, Camille...

Aux fautes d'orthographe et autres coquilles qui auront réussi à passer les innombrables relectures croisées de ce travail. Félicitations !

Et surtout merci à ma famille A mes parents, merci pour votre soutien, votre amour, vos sacrifices. Je sais très bien que sans vous je ne serai pas ici aujourd'hui. A mon frère et ma sœur pour votre amour fraternel et de me supporter toutes ces années.

Enfin, merci infiniment à toutes les personnes que j'ai pu côtoyer de près ou de loin, et qui m'ont permis de grandir, de parvenir jusqu'ici et d'être la personne que je suis au quotidien.

## Droits d'auteurs

---

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



## Table des matières

---

Liste des abréviations.....	16
I. Introduction .....	17
I.1. Le SARS-Cov-2 .....	17
I.1.1. Généralités .....	17
I.1.1.1. Définition.....	17
I.1.1.2. Epidémiologie .....	17
I.1.1.3. Morphologie du coronavirus .....	18
I.1.2. Le génome viral.....	18
I.1.3. Symptomatologie clinique.....	19
I.1.4. Physiopathologie .....	19
I.1.4.1. Régulation de l'ACE2 .....	20
I.1.4.2. Rôle de la protéine Spike .....	20
I.1.4.3. Internalisation cellulaire du virus .....	20
I.1.5. Complications.....	21
I.1.5.1. Syndrome de Détresse Respiratoire Aiguë .....	21
I.1.5.2. Fibrose pulmonaire .....	22
I.1.5.3. Maladies cardiovasculaires .....	22
I.1.6. Manifestations biologiques .....	22
I.1.7. Stratégies thérapeutiques.....	23
I.1.7.1. Généralités .....	23
I.1.7.2. Vaccins .....	23
I.1.7.3. Traitements immunomodulateurs .....	24
I.2. Réponse immunitaire anti-virale.....	24
I.2.1. Définition .....	24
I.2.2. Système HLA .....	25
I.2.3. Cytokines : rôle dans la réponse immunitaire .....	26
I.2.4. Les populations lymphocytaires.....	27
I.2.4.1. Les Lymphocytes NK .....	27
I.2.4.1.1. Cellules effectrices .....	27
I.2.4.1.2. Cellules régulatrices .....	27
I.2.4.1.3. Inducteur de la réponse adaptative.....	28
I.2.4.1.4. LyNK et infection virale.....	28
I.2.4.2. Les Lymphocytes B.....	29
I.2.4.2.1. Développement et maturation des LyB .....	29
I.2.4.2.2. Fonctions des LyB .....	29
I.2.4.2.3. Marqueurs spécifiques des LyB.....	30
I.2.4.3. Les Lymphocytes T .....	31
I.2.4.3.1. Généralités .....	31
I.2.4.3.2. Ly TCD4 et Ly TCD8 .....	32
I.2.4.3.3. LyT Naïfs.....	32
I.2.4.3.4. LyT mémoires.....	33
I.2.4.3.4.1. LyT mémoire centrale .....	33
I.2.4.3.4.2. LyT mémoire effectrice.....	33
I.2.4.3.5. LyT effecteurs.....	33
I.2.4.3.6. LyT régulateurs.....	33

I.2.5. Les Polynucléaires Neutrophiles.....	34
I.2.6. Les Monocytes .....	35
I.2.7. Système immunitaire lors d'une infection SARS-Cov-2 .....	36
I.2.7.1. Hyperactivation de l'immunité innée.....	36
I.2.7.2. Dérèglement de l'immunité adaptative .....	37
I.2.8. Réponse lymphocytaire lors d'une infection virale au SARS-Cov-2 .....	38
I.2.9. Marqueurs de la réponse immunitaire.....	39
I.2.9.1. Généralités .....	39
I.2.9.1.1. Similitude entre PD-1 et CTLA-4.....	39
I.2.9.2. L'axe PD-1/PD-L1 .....	40
I.2.9.2.1. Caractéristique et fonction de PD-1 .....	40
I.2.9.2.2. Interaction de PD-1 avec ces ligands.....	40
I.2.9.2.3. Caractéristique de PD-L1 .....	41
I.2.9.2.4. Interaction PD-1 et PD-L1.....	41
I.2.9.2.5. Axe PD-1/PD-L1 et infection virale.....	42
I.2.9.2.5.1. Rôle de PD-1 dans les infections virales aiguës.....	42
I.2.9.2.5.2. Expression de PD-L1 induite par les virus.....	42
I.2.9.2.5.3. Fonction de PD-L1 pendant les infections virales aiguës.....	43
I.2.9.2.6. L'axe PD-1/PD-L1 lors d'infections virales chroniques .....	43
I.2.9.2.7. PD-1 et SARS-Cov-2.....	44
I.2.9.2.8. PD-L1 et SARS-Cov-2.....	44
I.2.9.3. CTLA-4 .....	44
I.2.9.3.1. Structure de CTLA-4.....	44
I.2.9.3.2. CTLA-4 et ses ligands B7 .....	44
I.2.9.3.3. CTLA-4 versus CD28.....	44
I.2.9.3.4. Régulation et expression cellulaire de CTLA-4 .....	45
I.2.9.3.5. Fonction immunitaire de CTLA-4 .....	45
I.2.9.3.6. CTLA-4 et infection virale .....	45
I.2.9.3.7. CTLA-4 et SARS-Cov-2.....	45
II. Objectifs de l'étude .....	48
III. Matériel et méthodes .....	49
III.1. Population de l'étude.....	49
III.2. Analyse des différentes populations lymphocytaires, granulocytaires et monocytaires , et de l'expression de PD-1, PD-L1 et de CTLA-4 par Cytométrie en Flux .....	49
III.3. Analyses statistiques.....	52
IV. Caractéristiques clinico-biologiques de la population étudiée.....	53
V. Résultats.....	54
V.1. Etude de la lymphocytose globale et des sous-populations lymphocytaires.....	54
V.2. Etude des différents phénotypes lymphocytaires TCD4 et TCD8.....	56
V.2.1. Phénotypes lymphocytaires TCD4 .....	56
V.2.2. Phénotypes lymphocytaires TCD8 .....	58
V.3. Etude de l'expression de PD-1 et de CTLA-4 pour les différentes phénotypes lymphocytaires.....	59
V.4. Analyse de la production cytokinique par les Ly TCD4 et les Ly TCD8 .....	61
V.5. Etude des populations granulocytaires et monocytaires .....	62
V.6. Etude de l'expression de PD-L1 par les PNN et les monocytes .....	63
VI. Discussion .....	65

VI.1. Une cohorte représentative de la population.....	65
VI.2. Une immunosuppression sévère chez les patients admis en réanimation.....	65
VI.3. Réponse inflammatoire initiale.....	66
VI.4. CTLA-4 et PD-1 à l'origine d'un dérèglement immunitaire .....	66
VI.5. Surproduction de cytokines pro-inflammatoire .....	67
VI.6. Limites de l'étude.....	68
VI.7. Intérêt pronostic.....	68
VII. Conclusion .....	69
Références bibliographiques .....	73
Annexes .....	94
Serment De Galien.....	111

## Table des illustrations

---

Figure 1 : Effet de l'infection par le SARS-CoV-2 sur la surface de la cellule hôte à 2 et 48 hpi .....	18
Figure 2 : Schéma de la particule virale SARS-CoV-2 .....	19
Figure 3 : Mécanismes physiopathologiques de l'infection au SARS-Cov2 sur le récepteur de l'ACE2 et les voies de signalisation GTPase .....	21
Figure 4 : Réponse immunitaire antivirale.....	25
Figure 5 : Régulation des réponses immunitaires par les LyNK.....	28
Figure 6 : Développement et maturation des LyB.....	30
Figure 7 : Rôle multifonctionnel des LyB.....	31
Figure 8 : Réponse immunité innée et adaptative à une infection SARS-Cov-2.....	34
Figure 9 : Régulation immunitaire innée de la défense antivirale et de la toxicité tissulaire...37	
Figure 10 : Relargage cytokinique médié par le virus SARS-Cov-2 .....	37
Figure 11 : Dérégulation immune durant les infections virales chroniques.....	38
Figure 12 : Structure moléculaire de PD-1 et CTLA-4.....	40
Figure 13 : Structure de PD-L1 et interaction PD-1/PD-L1.....	41
Figure 14 : Régulation virale de l'activation des cellules T médiée par PD-L1 .....	43
Figure 15 : Rôles de PD-1 et CTLA-4 dans la régulation des cellules immunitaires au cours d'une infection virale respiratoire .....	46
Figure 16 : Inhibition des LyT médiée par CTLA-4.....	46
Figure 17 : Inhibition des Tregs médiée par CTLA-4 .....	47
Figure 18 : Arbre décisionnel pour le panel n°1 .....	50
Figure 19 : Arbre décisionnel pour le panel n°2 .....	51
Figure 20 : Arbre décisionnel pour le panel n°4 .....	52
Figure 21 : Analyse par box-plot des populations lymphocytaires au cours de la première semaine en service de réanimation par CMF. ....	55
Figure 22 : Analyse par box-plot des sous-populations lymphocytaires TCD4 au cours de la première semaine de réanimation par CMF.....	57
Figure 23 : Analyse par box-plot de la population Ly Treg au cours de la première semaine de réanimation par CMF.....	58
Figure 23 : Analyse par box-plot des sous-populations lymphocytaires TCD8 au cours de la première semaine de réanimation par CMF.....	59
Figure 25 : Analyse par box-plot de l'expression des points de contrôles immunitaires au cours de la première semaine de réanimation par CMF. ....	60

Figure 26 : Analyse par box-plot de l'expression des points de contrôles immunitaires PD-1 et CTLA-4 par les Ly Treg au cours de la première semaine dans le service de réanimation par CMF. ....	61
Figure 27 : Analyse par box-plot des populations granulocytaires et monocytaire et de l'expression de HLA-DR par les monocytes au cours de la première semaine d'hospitalisation en réanimation par CMF.....	63
Figure 28 : Analyse par box-plot de l'expression de PD-L1 par les PNN et les monocytes au cours de la première semaine d'hospitalisation en réanimation par CMF. ....	64

## Table des tableaux

---

Tableau 1 : Population étudiée .....	49
Tableau 2 : Panel n°1 : Analyse des sous-populations lymphocytaires.....	50
Tableau 3 : Panel n°2 : Analyse des sous-populations lymphocytaires T et de l'expression de PD-1 et de CTLA-4 sur les LyT.....	51
Tableau 4 : Panel n°3 : Analyse de l'expression de l'HLA-DR sur les monocytes.....	51
Tableau 5 : Panel n°4 : Analyse des populations granulocytaires et de l'expression de PD-L1 .....	52
Tableau 6 : Caractéristiques clinico-biologiques de la population étudiée .....	53

## Liste des abréviations

---

ACE : enzyme de conversion de l'angiotensine I	IFN : Interféron
ACE2 : enzyme de conversion de l'angiotensine II	Ig : Immunoglobuline
Ag : Antigène	IL : Interleukine
ANGI : Angiotensine I	LDH : Lactate Déshydrogénase
ANGII : Angiotensine II	Ly Treg : Lymphocyte T régulateurs
ARN : Acide Ribo Nucléique	Ly : Lymphocytes totaux
AT1R : récepteur de l'angiotensine de type 1	LyB : Lymphocyte B
AT2R : récepteur de l'angiotensine de type 2	LyNK : Lymphocyte Natural Killer
BCR : B cell receptor	LyT : Lymphocyte T
CCR : C-C chemokine receptor	MERS-Cov : Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus
CD : Cellule Dendritique	OLS : Organes lymphoïdes secondaires
CG : centre germinatif	PD-1 : Programmed cell Death
CIVD : Coagulation Intra-Vasculaire Disséminée	PD-L1 : Programmed Death-Ligand 1
CMF : Cytométrie en flux	PD-L2 : Programmed Death-Ligand 2
CMH : Complexe Majeure d'Histocompatibilité	PNN : Polynucléaires neutrophiles
CMV : Cytomégalovirus	RT-PCR : Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction
COVID-19 : maladie à coronavirus 2019	SARS : Severe Acute Respiratory Syndrome
CPA : Cellules Présentatrices d'Antigènes	SARS-Cov-2 : Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2
CRP : protéine C-réactive	SDRA : Syndrome de Détresse Respiratoire Aigue
CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4 ou « antigène 4 du lymphocyte T cytotoxique »	TCR : T cell receptor
DAMP : Damage Associated Molecular Pattern ou « motifs moléculaires associés à des dommages »	TNF : Tumor Nuclear Factor
HLA : Human Leucocyte Antigen	USI : Unité de Soins Intensifs
	VHB : Virus de l'hépatite B
	VIH : Virus de l'immunodéficience humaine
	VRS : Virus Respiratoire Syncytiale

# I. Introduction

---

## I.1. Le SARS-Cov-2

### I.1.1. Généralités

#### I.1.1.1. Définition

Le coronavirus est un virus appartenant à la famille des *Coronaviridae*, constituant une grande famille de virus respiratoires pouvant causer des maladies allant du simple rhume au syndrome respiratoire aigu sévère (SARS) (Drosten C, et al., 2003 ; Zaki AM et al., 2012). L'infection au Coronavirus se traduit par divers symptômes dépendants de la génétique, l'ethnie, l'âge et la situation géographique de chaque patient. De nos jours, sept souches de coronavirus humains ont été caractérisées : quatre sont connues pour infecter les voies respiratoires supérieures et provoquer des symptômes légers, les trois autres pour induire des infections graves des voies respiratoires inférieures, qui sont : SARS-CoV (Syndrome Respiratoire Aigu Sévère), MERS-CoV (Syndrome Respiratoire du Moyen-Orient) et SARS-CoV-2.

#### I.1.1.2. Epidémiologie

Nous allons nous intéresser ici au SARS-Cov-2 aussi dénommé COVID-19. Le SARS-Cov-2 a été identifié pour la première fois en décembre 2019 dans la province de Hubei à Wuhan, en Chine, par le Centre chinois de contrôle et de prévention des maladies (CDC) et fut, par la suite, la cause d'une série de pathologies principalement respiratoires et de formes atypiques (Zhu N, et al. 2020 ; Gralinski LE et al. 2020). D'autres signes cliniques ont été référencés pour le SARS-Cov-2 comme la fièvre, la fatigue, la toux sèche, l'essoufflement, la perte du goût et de l'odorat par exemple. L'apparition de cette maladie en décembre 2019 a mis les autorités sanitaires en état d'alerte que ce soit en Chine ou dans le reste du monde. Le SARS-Cov-2 sera ensuite officiellement déclaré « pandémie » par l'Organisation Mondiale de la Santé, le 11 mars 2020 (<https://www.who.int/news-room/detail/27-04-2020-who-timeline-covid-19>). Des données épidémiologiques ont démontré que la prévalence du virus est plus importante dans les zones les plus densément peuplées. Cela explique des taux de transmission plus élevés dans les zones surpeuplées par rapport aux communautés rurales moins peuplées et donc moins touchées. L'effet dévastateur mondial de ce virus s'explique, en partie, par la nature de la transmission virale, qui est une transmission interhumaine (Li Q, et al., 2020 ; Chan JF, et al., 2020). La durée d'incubation médiane entre l'infection par le SARS-Cov-2 et l'apparition d'une dyspnée symptomatique variant de 4 à 7 jours, crée une large fenêtre de temps pour la transmission pendant laquelle les patients présentent peu de symptômes (Guan WJ et al., 2020 ; Huang C et al., 2020). Après cette période d'incubation, les patients infectés sont généralement hospitalisés pendant 3 à 4 jours supplémentaires avant de nécessiter une éventuelle admission en unité de soins intensifs et/ou une ventilation invasive prolongée (Huang C et al., 2020 ; Zhou F et al., 2020 ; Wu C et al., 2020). Cependant, au niveau diagnostique clinique, les patients atteints présentent souvent un ensemble de symptômes similaires à ceux de la grippe, ce qui peut rendre le diagnostic difficile. En outre, le virus du SARS-CoV-2 possède des souches géographiquement diverses dont la gravité, le taux de mortalité et les options thérapeutiques disponibles peuvent varier. Différents clusters viraux distincts ont été identifiés avec des sous-groupes dérivés. Au moins deux clusters ont été identifiés principalement en Amérique et en Europe, et aussi un en Asie orientale (Forster P et al., 2020).

### I.1.1.3. Morphologie du coronavirus

Au niveau morphologique, les coronavirus sont des virions ronds, enveloppés, avec un diamètre d'environ 80 à 220 nm. Ces virus sont composés d'un génome à ARN positif monocaténaire de 26 à 32 kb, entouré d'une membrane extracellulaire contenant une série de glycoprotéines en pointe ressemblant à une couronne, que nous pouvons apercevoir en microscopie électronique (Figure 1).

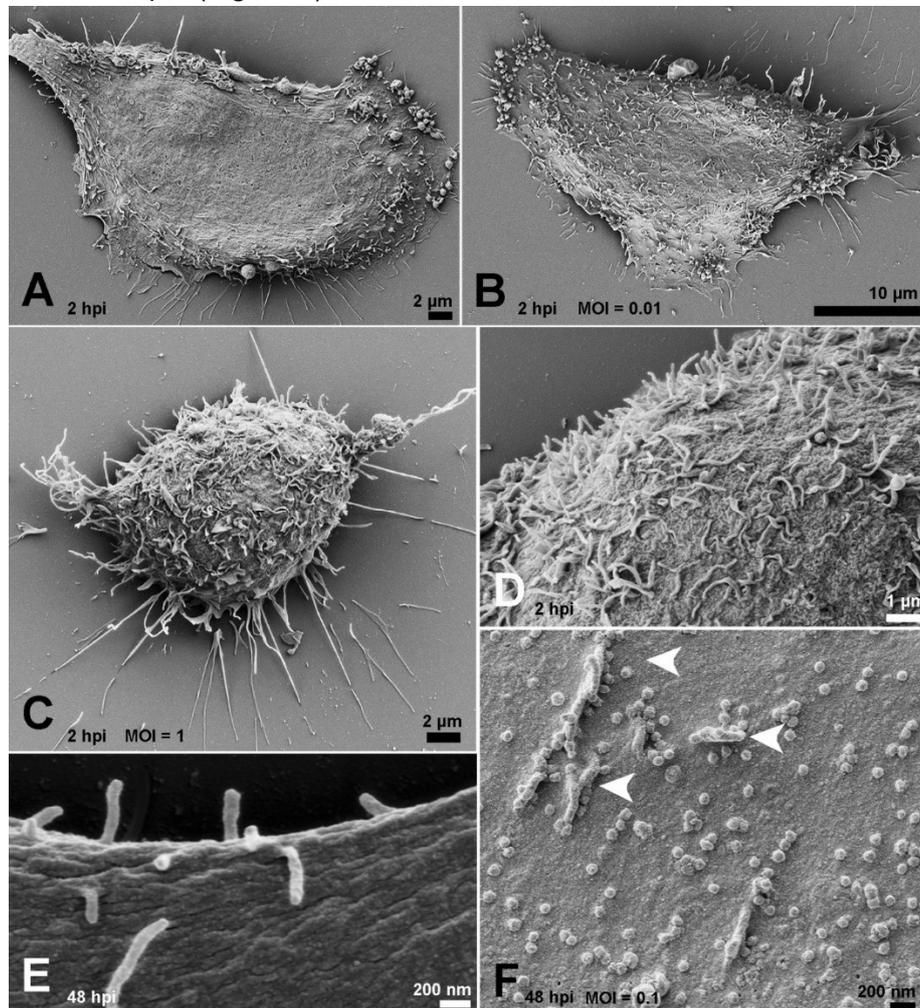


Figure 1 : Effet de l'infection par le SARS-CoV-2 sur la surface de la cellule hôte à 2 et 48 hpi (pointes de flèche = surface d'adhésion du virus à la surface cellulaire) (Caldas LA et al. 2020 : « *Ultrastructural analysis of SARS-CoV-2 interactions with the host cell via high resolution scanning electron microscopy* »)

### I.1.2. Le génome viral

Le SARS-Cov-2 est un membre de la lignée B des  $\beta$ -CoV. Sa séquence du génome est identique à 75-80 % à celle du SARS-CoV et présente aussi des similitudes avec plusieurs CoV de chauve-souris (Zhou P et al., 2020). De plus, ce virus possède une capacité de relecture importante par les exonucléases, contrairement aux autres virus (Robson F et al., 2020). Le génome viral du SARS-CoV-2 code pour quatre protéines structurales qui sont l'enveloppe, la membrane, la nucléocapside et la glycoprotéine de pointe (Figure 2), ayant un rôle dans l'entrée du virus dans la cellule hôte (Gordon DE et al., 2020 ; Kim D et al., 2020). De plus, ce génome comprend également 16 protéines non structurales et 9 protéines

accessoires nécessaires à la réplication et à la pathogénèse (Gordon DE et al., 2020 ; Kim D et al., 2020 ; Robson F et al., 2020).

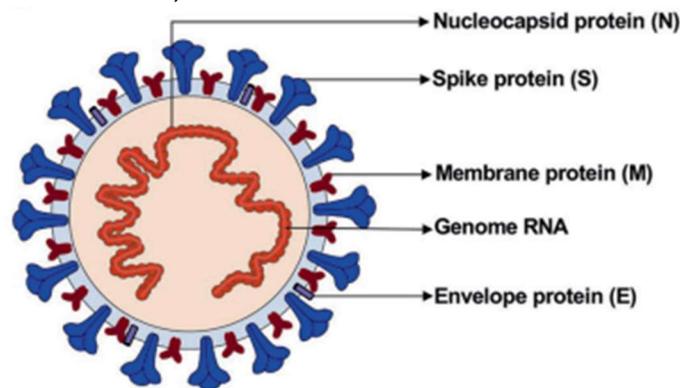


Figure 2 : Schéma de la particule virale SARS-CoV-2

(Zhang Q et al., 2021 : « Molecular mechanism of interaction between SARS-CoV-2 and host cells and interventional therapy »)

### I.1.3. Symptomatologie clinique

L'évolution clinique d'une infection virale est fortement dépendante de la réponse immunitaire de l'hôte, ce qui se traduit dans le cas du SARS-Cov-2 par des divergences extrêmes de symptomatologie et d'issue clinique, classant les patients en différentes catégories : asymptomatique, léger, modéré, grave et critique. Les patients asymptomatiques présentent un test positif au COVID-19 (RT-PCR, test antigénique) mais ne manifestent aucun symptôme clinique et sont pourtant tout à fait capables de transmettre le virus (Bai Y et al., 2020 ; Rothe C et al., 2020). Les patients ayant des formes légères présentent des symptômes aigus d'infection des voies respiratoires et des complications de type digestif. Les patients atteints de formes modérées souffrent d'une pneumonie, sans hypoxémie notable, avec des lésions décelables sur tomographie thoracique. Les patients avec des formes graves du SARS-Cov-2 présentent une pneumonie avec une hypoxémie détectable et des lésions visibles à la tomodynamométrie, tandis que les patients en état critique présentent un Syndrome de Détresse Respiratoire Aiguë (SDRA) avec un taux de mortalité important (Zhou F et al., 2020 ; Tay MZ et al., 2020), accompagné d'une encéphalopathie, d'une lésion myocardique, d'un dysfonctionnement de la coagulation, d'une insuffisance cardiaque et/ou d'une lésion rénale aiguë (Yuki K et al, 2020).

### I.1.4. Physiopathologie

La compréhension des différents mécanismes physiopathologiques du SARS-Cov-2 est primordiale pour apprécier l'origine des symptômes cliniques afin de pouvoir surmonter cette pandémie mondiale. La physiopathologie se manifeste par une destruction des cellules épithéliales du poumon, une thrombose, une hypercoagulation et une fuite vasculaire entraînant une septicémie, particulièrement dans les formes sévères. Ces événements conduisent aussi dans les cas graves, au SDRA et à une fibrose pulmonaire subséquente chez ces patients. Divers facteurs de risque sont à l'origine des formes sévères du SARS-Cov-2, dont les comorbidités chroniques que nous retrouvons principalement chez les adultes âgés. Cela inclut les pathologies cardiovasculaires, dont l'hypertension artérielle et les maladies coronariennes, l'insuffisance rénale chronique et le diabète (Shahid Z et al., 2020 ; Verdecchia P et al., 2020). Ces comorbidités chroniques sont associées à un mauvais pronostic en matière de SARS-Cov-2, et entraînent pour cette catégorie de population un

risque plus grand de développer une infection compliquée et une mortalité élevée (Shahid Z et al., 2020). Pour ces patients, présentant des formes sévères associées à des comorbidités, le virus a la capacité d'utiliser plusieurs mécanismes pour infecter un plus grand nombre de type de cellules.

#### **I.1.4.1. Régulation de l'ACE2**

Lors d'une infection au SARS-Cov-2, il a été démontré une régulation positive du récepteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine-2 (ACE2). Cette enzyme est exploitée par le virus du SARS-Cov-2 comme voie d'entrée virale. Ce récepteur ACE2 est fortement exprimé dans les cellules épithéliales alvéolaires du poumon (Zou X et al., 2019 ; Figure 3).

#### **I.1.4.2. Rôle de la protéine Spike**

Les protéines de l'enveloppe de la glycoprotéine virale Spike sont responsables de l'attachement, de la fusion et de l'entrée du virus dans les cellules hôtes sensibles (Hoffmann M et al., 2020), ce qui va induire par la suite une cascade de signalisation intracellulaire. Plus précisément, la protéine TMPRSS2 exprimée par l'hôte interagit avec la protéine Spike et la clive en deux sous-unités fonctionnelles appelées S1 et S2 (Hoffmann M et al., 2020 ; Matsuyama S et al., 2020). Ensuite, la sous-unité S1 interagit directement avec le récepteur ACE2, laissant la sous-unité S2 faciliter la fusion virale avec la membrane de la cellule hôte (Guzik TJ et al., 2020 ; Hoffmann M et al. 2020 ; Lippi G et al., 2020 ; Figure 3), provoquant l'internalisation du virus dans la cellule.

#### **I.1.4.3. Internalisation cellulaire du virus**

L'internalisation et la réplication du virus dans la cellule provoquent la dégradation des récepteurs ACE2 liés à la membrane (Hoffmann M et al. 2020), entraînant une augmentation de l'angiotensine II (ANG II) du récepteur de l'angiotensine de type I (AT1R) et un clivage de l'angiotensinogène par la rénine en angiotensine I (ANG I). L'ANG I est clivée par l'ACE en ANG II, qui va interagir librement avec l'AT1R et le récepteur de l'angiotensine de type 2 (AT2R). Les excès d'ANG I et II sont hydrolysés par l'ACE2 en heptapeptides (Figure 2). L'ACE2 réduite ou liée est incapable d'hydrolyser ANG I/II, ce qui entraîne une incapacité des effets compensatoires nécessaires à la protection contre les complications néfastes de la maladie. En raison de l'infection à SARS-Cov-2, la diminution de l'ACE2 entraîne une activité élevée de l'axe ANG II/AT1R, ce qui provoque une réponse immunitaire incontrôlée et systémique de type inflammatoire (Verdecchia P et al., 2020), passant par la libération de diverses cytokines dont l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8, l'IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$ . Ce relargage cytokinique est à l'origine de dégâts tissulaire au niveau pulmonaire (Shimizu M et al., 2019 ; Ragab D et al., 2020). Cette déficience en ACE2 entraîne aussi de nombreux effets indésirables pour les patients, notamment une fibrose interstitielle et endothéliale, une hypertrophie myocardique et une inflammation accrue (Verdecchia P et al., 2020). La thrombose et l'hypercoagulation secondaire à l'activation des plaquettes après une atteinte de l'épithélium pulmonaire sont observées chez les patients atteints d'infections graves (Levi M et al., 2020 ; Yuki K et al., 2020). Régulièrement, les mécanismes de réponse physiologique à la fuite et à la perméabilité vasculaire échouent, ce qui permet une invasion virale accrue, à l'origine de diverses complications (Yuki K et al., 2020). Plus précisément, la coagulation est induite en tant que contrôle physiologique protecteur en réponse à la fuite vasculaire, mais entraîne aussi des conséquences néfastes pour ces patients, dont la Coagulation Intravasculaire Disséminée (CIVD), les embolies pulmonaires, les complications cardiaques pouvant aller jusqu'au décès (Levi M et al., 2020 ; Tang N et al., 2020).

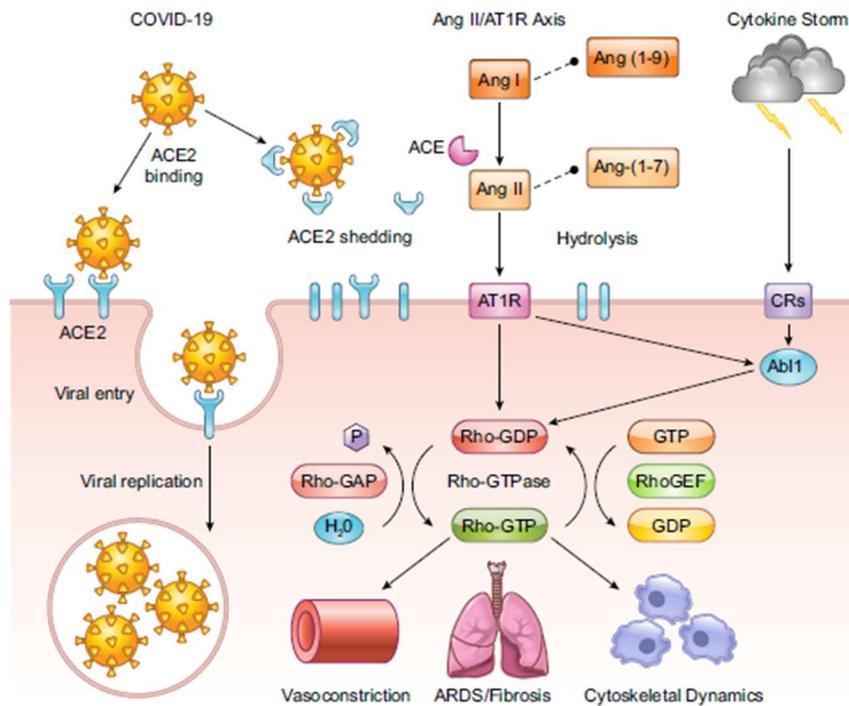


Figure 3 : Mécanismes physiopathologiques de l'infection au SARS-Cov2 sur le récepteur de l'ACE2 et les voies de signalisation GTPase

(Pollard CA et al., 2020 : « The COVID-19 pandemic : a global health crisis »)

## I.1.5. Complications

### I.1.5.1. Syndrome de Détresse Respiratoire Aiguë

Le syndrome de détresse respiratoire aiguë est la principale complication d'une infection au SARS-Cov-2. Le SDRA est un syndrome hétérogène dont la pathologie et les mécanismes sont complexes. Tout d'abord, le SDRA est l'expression d'une agression de la membrane alvéolocapillaire qui peut être directe, sur le versant épithélial de la membrane, comme au cours des pneumonies infectieuses, ou indirecte, portant sur le versant endothélial à la suite d'un choc septique, dans le cas du SARS-Cov-2, ou bien aussi d'une agression inflammatoire non septique d'origine extra-pulmonaire.

La définition de SDRA a été réévaluée lors de la conférence de Berlin (ARDS Definition Task Force, 2012). Elle repose sur 4 critères :

- Signes d'insuffisance respiratoire aiguë évoluant depuis une semaine ou moins,
- Présence d'infiltrats bilatéraux sur l'imagerie thoracique non expliqués par des épanchements,
- Effondrement lobaire/pulmonaire ou des nodules et sans signe d'hypertension auriculaire gauche ou de surcharge liquidienne,
- Présence d'un œdème pulmonaire avec absence d'arguments pour un œdème hydrostatique prédominant, hypoxémie avec rapport  $\text{PaO}_2/\text{FIO}_2 < 300$  mmHg (Thompson BT et al., 2017) pour une pression télé-expiratoire positive réglée à 5 cm H<sub>2</sub>O ou plus. Trois stades de gravité ont été définis en fonction de l'hypoxémie :
  - o Léger :  $200 < \text{PaO}_2/\text{FIO}_2 \leq 300$  mmHg,
  - o Modéré :  $100 < \text{PaO}_2/\text{FIO}_2 \leq 200$  mmHg
  - o Sévère :  $\text{PaO}_2/\text{FIO}_2 \leq 100$  mmHg.

Ces trois stades de gravité sont associés à une augmentation du risque de mortalité et de la durée médiane de la ventilation mécanique chez les survivants. Pour les formes sévères, nous aurons ainsi une hausse importante de la perméabilité capillaire pulmonaire survenant à la suite d'une agression directe ou indirecte de la membrane alvéolo-capillaire, une augmentation du poids des poumons et une perte de tissu pulmonaire aéré, associé à une inflammation pulmonaire intense et une hypoxémie sévère.

Donc, ce syndrome induit une infection mortelle des voies respiratoires inférieures associée à des manifestations extra-pulmonaires entraînant l'admission dans une unité de soins intensifs (Huang C et al., 2020). Au niveau de la prise en charge, les patients qui sont infectés par le SARS-Cov-2 et qui développent un SDRA nécessitent, dans la majorité des cas, une ventilation mécanique en unité de soins intensifs. De même, la majorité des patients ont tendance à rester dépendants du ventilateur pendant environ deux semaines, et certains finissent par succomber à la maladie (Bhatraju PK et al., 2020 ; Wu C et al., 2020).

### **I.1.5.2. Fibrose pulmonaire**

La fibrose pulmonaire est la seconde complication pulmonaire majeure suite à une infection au SARS-Cov-2, et donc la 2ème cause de décès chez ces patients. Diverses perturbations en résultent, et sont à l'origine d'œdème pulmonaire que nous retrouvons de façon similaire chez les patients atteints de SDRA (Huppert LA et al., 2019). C'est une pathologie chronique faisant suite à une agression sévère du poumon. Lié à cette agression, un mécanisme inflammatoire se met en place et sera à l'origine d'une prolifération anormale des fibroblastes et de dépôts de protéines de la matrice extra-cellulaire au niveau du poumon. Ces effets seront la conséquence de la formation d'un tissu cicatriciel dans les poumons (Asano S et al., 2017). Ce mécanisme de cicatrisation affecte les alvéoles, les petites bronches et les vaisseaux sanguins pulmonaires. Une augmentation du remodelage dérégulé des cellules épithéliales contribue à la fibrose pulmonaire (Channappanavar R et al., 2017), et aura pour conséquences d'empêcher le passage de l'oxygène dans le sang et l'expiration du CO<sub>2</sub>.

### **I.1.5.3. Maladies cardiovasculaires**

Bien que la principale cible du SARS-Cov-2 soit le poumon, il peut également avoir des effets néfastes sur le système cardiovasculaire (Zheng YY et al., 2020). Associée aux comorbidités cardiaques des patients infectés, l'infection au SARS-Cov-2 entraîne une régulation à la hausse de l'ACE2 à la surface des cellules des péricytes périvasculaires et des cardiomyocytes, qui est exploitée par le virus comme voie d'entrée et d'infection (Guzik TJ et al., 2020). Les lésions cardiaques peuvent se présenter sous forme soit d'arythmies courantes, de myocardite, de choc cardiogénique ou voire d'insuffisance cardiaque (Gupta MD et al., 2020 ; Murthy S et al., 2020). Par conséquent, les patients atteints de pathologies cardio-vasculaires peuvent ne pas être en mesure de maintenir leur fonction cardiovasculaire lors de l'infection par le SARS-Cov-2, entraînant par la suite une augmentation du système métabolique, exacerbant ainsi les conditions cardiovasculaires et augmentant leur risque d'issues graves, pouvant entraîner le décès des patients (Tan W et al., 2020).

### **I.1.6. Manifestations biologiques**

Au niveau biologique, le SARS-Cov-2 est une infection systémique ayant un impact significatif sur le système hématopoïétique et l'hémostase particulièrement. Plus précisément, il a été démontré que plus de la moitié des patients présentent une lymphopénie plus ou moins sévère associée à une tempête cytokinique. De plus, l'hypercoagulabilité sanguine est fréquente chez

les patients hospitalisés atteints de SARS-Cov-2 (Huang C et al., 2020) où des taux élevés de D-Dimères et l'augmentation du temps de prothrombine sont constamment rapportés, pouvant être associés à la CIVD chez ces patients. Ainsi, les patients infectés par le SARS-Cov-2, hospitalisés ou en ambulatoire, sont à haut risque de thrombo-embolie veineuse (Terpos E et al., 2020). Des biomarqueurs, tels que la procalcitonine et la ferritine sérique, sont également apparus comme des facteurs de mauvais pronostic (Terpos E et al., 2020). De même, les augmentations de la LDH, qui est un marqueur de nécrose et de lésions cellulaires, ou de la CRP, qui est une protéine de l'inflammation, sont corrélées à la gravité de la maladie. Il y a aussi production de cytokines inflammatoires tels que l'IFN- $\gamma$ , le TNF- $\alpha$ , l'IL-2, l'IL-6, l'IL-8... qui sont abondamment sécrétées par les LyT lors de leur activation et par les LyNK lors de l'infection virale. La combinaison de ces différents paramètres biologiques permet de prédire le pronostic de la maladie. Cependant, à ce stade, les informations telles que les caractéristiques immunologiques entre les formes modérées et sévères du SARS-Cov-2 restent insuffisantes, de même que l'impact biologique à court terme au cours de la première semaine d'hospitalisation en Unité de Soins Intensifs.

### **I.1.7. Stratégies thérapeutiques**

#### **I.1.7.1. Généralités**

Généralement, les options thérapeutiques antivirales les plus courantes visent soit à bloquer l'entrée du virus dans l'hôte empêchant ainsi la réplication virale, soit à favoriser une immunité cellulaire et humorale durable pour la population non infectée par le biais de la vaccination. De plus, les connaissances établies à ce jour sur les coronavirus fournissent aux scientifiques les bases nécessaires à la mise au point et à la réorientation d'interventions thérapeutiques. Étant donné que la protéine Spike de chaque type de coronavirus est unique, cette protéine a été la cible de choix dans le développement de vaccins comme approche, pour bloquer l'entrée initiale du virus (Amanat F et al., 2020 ; Shang W et al., 2020). Il s'est avéré et s'avère toujours très difficile de contrôler la propagation et la progression étendue du virus SARS-CoV-2. Cela nécessite une approche multidisciplinaire avec une collaboration étroite au niveau mondial. Bien que certains domaines d'intérêt du SARS-CoV-2 restent encore inconnus à ce jour, les facteurs de mauvais pronostic les plus significatifs sont liés soit à l'activation, soit à la suppression de la réponse immunitaire de l'hôte qui ont été les domaines de recherche prioritaire dans le développement de nouvelles thérapies.

#### **I.1.7.2. Vaccins**

Les recherches scientifiques ont fournis des informations essentielles sur le développement de différents vaccins. Le temps nécessaire pour évaluer l'innocuité et l'efficacité des vaccins candidats constitue un enjeu majeur dans le processus de validation de ces vaccins. Aujourd'hui, différents vaccins ont fait l'objet d'essais cliniques et ont été mis à disposition sur le marché mondial. Le premier vaccin produit est un vaccin à base d'ARN messenger, le mRNA-1273 (Hodgson J, 2020), qui est le vaccin SpikeVax de MODERNA. Nous avons aussi le vaccin BioNTech de PFIZER qui est aussi un vaccin à base d'ARN messenger, puis le vaccin Janssen de Johnson & Johnson qui est un vaccin recombinant. En fonction du type de vaccin, cela nécessite l'administration d'une à plusieurs doses. D'autres vaccins sont toujours en cours de production et d'essais cliniques à ce jour.

### **I.1.7.3. Traitements immunomodulateurs**

Cependant, des traitements thérapeutiques pour le contrôle et la gestion clinique de l'infection par le SARS-Cov-2 sont nécessaires. L'HAS (Haute Autorité de Santé) a mis à disposition des modalités de prise en charge au niveau national pour le traitement des infections au SARS-Cov-2. De nombreuses approches thérapeutiques ont été évoquées. Par exemple, en raison de l'urgence du traitement clinique de l'infection par le SARS-Cov-2, la réadaptation de médicaments antiviraux connus a été testée, notamment ceux utilisés dans le VIH, avec une extrême prudence, et les raisons en sont exposées dans les NIH COVID-19 Treatment Guidelines (*COVID-19 Treatment Guidelines Panel*). Le Paxlovid®, qui est l'association de nirmatrelvir / ritonavir, est indiqué aujourd'hui chez les adultes ne nécessitant pas d'oxygénothérapie et étant à risque élevé d'évolution vers une forme grave de la Covid-19. Le ritonavir est aussi utilisé dans le cadre des infections par le VIH comme inhibiteur de protéase du VIH. D'autres traitements antiviraux ont fait l'objet d'études cliniques comprenant entre autre le remdesivir, l'ivermectine, le favipiravir, le kaletra et la chloroquine/hydroxychloroquine (Gordon DE et al., 2020 ; Uddin M et al., 2020). Un autre exemple notable d'intervention thérapeutique actuelle est l'utilisation de la thérapie par plasma convalescent (Duan K et al., 2020 ; Shen C et al., 2020). Dans ce processus, des anticorps neutralisants contenus dans du plasma prélevé sur un donneur qui s'est précédemment remis d'une infection par le SARS-CoV-2, sont administrés à des patients infectés pour leur conférer une protection immunitaire anti-virale. Une autre méthode thérapeutique unique a été testée qui consiste à traiter les patients avec de l'ACE2 humaine recombinante soluble afin de perturber l'entrée du virus via l'interaction protéine de pointe-ACE2 (Gordon DE et al., 2020 ; Uddin M et al., 2020). Enfin, chez certains patients, il a été mis en place un traitement par corticoïdes. Chez ces patients traités par les glucocorticoïdes, l'aggravation clinique après l'administration de glucocorticoïdes est lié à un rôle contributif de la suppression des LyT dans la persistance virale et montrent un manque d'efficacité des glucocorticoïdes que nous pouvons retrouver dans d'autres infections virales graves (Lansbury L et al., 2021). En ce qui concerne les formes sévères, la réponse immunitaire de l'hôte au SARS-Cov-2 est similaire au SDRA et, par conséquent, les modalités de traitement pour le SDRA peuvent aussi être bénéfiques pour les patients atteints du SARS-Cov-2. Par exemple, différentes études ont démontré que la modulation thérapeutique de l'activité accrue de la cascade des GTPases pourrait réduire les effets indésirables de la pathogenèse du SDRA secondaire aux événements de remodelage de la matrice extra-cellulaire, et donc du SARS-Cov-2 (Pollard CA et al., 2020).

Dans cette perspective, nous discuterons du rôle des réponses immunitaires innées et adaptatives dans l'évolution clinique de l'infection par le SARS-Cov-2 qui pourra éventuellement être la cible potentielle de nouvelles stratégies d'intervention thérapeutique.

## **I.2. Réponse immunitaire anti-virale**

### **I.2.1. Définition**

L'efficacité avec laquelle le système immunitaire met en place une réponse à un pathogène, est déterminée par de multiples facteurs, dont la quantité et le type de pathogènes, les variations génétiques, les comorbidités du patient et l'administration de médicaments pouvant avoir un effet suppressif ou stimulant sur le système immunitaire (Bouwman W et al., 2020). En fonction de ces différents facteurs, les organismes vivants ont développé plusieurs types de mécanismes immunologiques pour se protéger de l'invasion de micro-organismes exogènes (Brodin P et al., 2017). L'une des principales exigences du système immunitaire est

de distinguer le « soi » du « non-soi », et d'induire une réponse immunitaire à des antigènes du « non-soi », tels que les composants d'un virus.

Une réponse immunitaire se déroule en 2 étapes. La première étape consiste en une réponse immunitaire innée, avec une composante inflammatoire. Elle est responsable de l'élimination rapide et non spécifique des agents pathogènes par diverses cellules dont les monocytes, les polynucléaires neutrophiles (PNN) et les LyNK, ainsi que de la présentation des antigènes dérivés d'agents pathogènes aux Ly par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) (figure 4). Lors des infections virales, le système immunitaire inné de l'hôte agit comme une défense de première ligne pour limiter, ou du moins pour contrôler l'invasion ou la réplication virale avant qu'une protection plus spécifique ne soit générée par le système immunitaire adaptatif. La présentation des agents viraux par les monocytes, les PNN ou les CD aux cellules de la réponse immunitaire adaptative fait intervenir les molécules HLA exprimés à leurs surfaces.

La deuxième étape consiste en une réponse immunitaire adaptative responsable de la clairance virale et de la génération d'une immunité à long terme en formant un pool de cellules mémoires capables de répondre à une réinfection par le même agent pathogène. Elle consiste en une réponse humorale d'une part, où des anticorps vont être spécifiquement générés contre l'agent pathogène par les plasmocytes qui sont des LyB différenciés, et en une réponse immunitaire cellulaire d'autre part, médiée par les LyT (figure 4). Pour obtenir une réponse adéquate à un agent pathogène à dominance intracellulaire, comme un virus, la réponse immunitaire cellulaire est de première importance. La production d'anticorps neutralisants et l'activation des LyT sont essentielles pour une réponse immunitaire antivirale spécifique et efficace. D'autres cellules hôtes possèdent également certains mécanismes immunitaires pour prévenir l'infection virale.

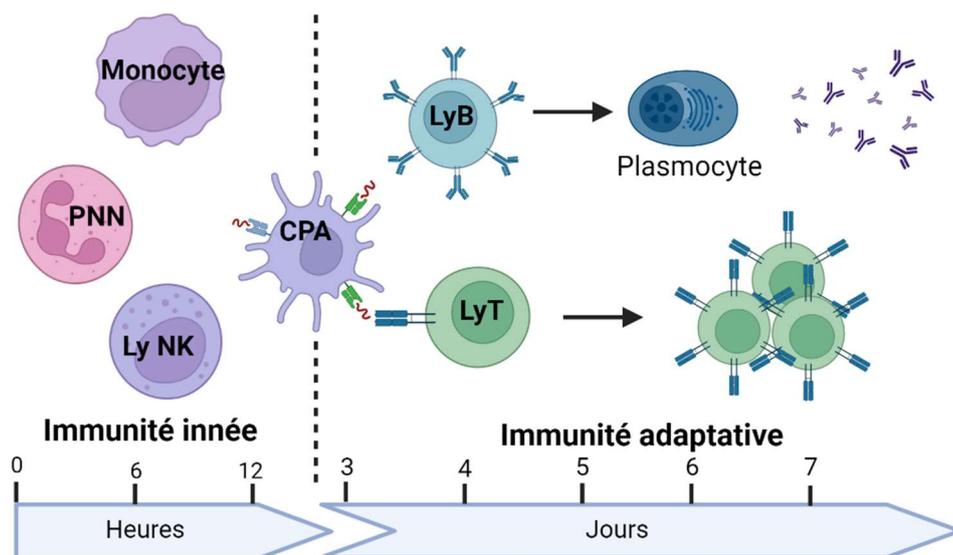


Figure 4 : Réponse immunitaire antivirale

### I.2.2. Système HLA

Le système HLA chez l'homme, est un ensemble de molécules de surface cellulaire spécialisées dans la présentation des peptides antigéniques aux Ly par les CPA. Les molécules HLA sont classées en 2 sous-groupes. Le 1er sous-groupe inclut les molécules

HLA de classe I (A, B et C) présentes en tant que glycoprotéines transmembranaires à la surface de toutes les cellules nucléées. Dans le second sous-groupe, nous avons les molécules HLA de classe II (DR, DQ et DP) qui sont généralement présentes sur les CPA (LyB, monocytes/macrophages, cellules dendritiques, cellules de Langerhans l'épithélium thymique et les LyT activés). Le système HLA est connu pour être l'un des systèmes d'antigènes les plus polymorphes de l'organisme (McCluskey J et al., 2017). Cependant, tous les génotypes HLA connus ont une affinité particulière pour lier les peptides du SARS-CoV-2 en raison de leur homologie partagée avec le génome du virus (Nguyen A et al., 2020). En outre, les allèles prédictifs ont une capacité de liaison qui peut permettre de déduire une susceptibilité ou éventuellement d'induire une réponse immunitaire basée sur les LyT (Nguyen A et al., 2020).

### **I.2.3. Cytokines : rôle dans la réponse immunitaire**

Les différentes étapes du système immunitaire font intervenir différents types de cellules qui coopèrent pour générer une réponse immunitaire efficace. Ces deux systèmes immunitaires innée et adaptative communiquent entre eux par la sécrétion d'un grand nombre de cytokines, telles que les interleukines, les interférons et les chimiokines. Ces cytokines transmettent des messages d'une cellule à l'autre en se liant à des récepteurs cellulaires spécifiques pour activer les voies de transduction du signal cellulaire, entraînant la production de protéines qui adaptent la fonction de la cellule immunitaire en réponse au signal provenant des cytokines. Ils existent deux grandes catégories de cytokines. Tout d'abord, les cytokines anti-inflammatoires telles que IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ , l'IL-1-RA... ont été signalées comme étant élevées dans les infections virales respiratoires associées à une infection sévère des voies aériennes inférieures et à une pneumonie, comme celles causées par le Virus Respiratoire Syncytial (VRS) et plus récemment par le SARS-CoV-2, reflétant une activité dominante de la réponse immunitaire innée (Mehta P et al., 2020 ; Ye Q et al., 2020 ; Pedersen SF et al., 2020). Puis, nous avons les cytokines pro-inflammatoires dont les IFN de type I. Ces IFN de type I restent les principales cytokines pro-inflammatoires impliquées dans la réponse antivirale. Elles sont produites par toutes les cellules nucléées en réponse à une infection virale, et sont induites précocement dans les tissus de barrière infectés par le virus, servant de première ligne de défense antivirale (Good C et al., 2019 ; Lazear HM et al., 2019). Une fois fixées à leurs récepteurs au niveau de la cellule hôte, ces cytokines vont induire une cascade de signalisation intracellulaire qui sera à l'origine de la production de protéines inflammatoires. Cette production sera suivie de l'apoptose des cellules infectées par le virus et d'une résistance cellulaire à l'infection virale (Samuel CE, 2001). En outre, ces IFN activent les LyNK et les CD ainsi que les Ly du système immunitaire adaptatif (Le Bon A et al., 2002).

Cependant, les virus ont développé plusieurs types de stratégies d'évasion immunitaire pour proliférer dans les cellules hôtes, dont leur principale cible est l'IFN de type I. Les virus peuvent inhiber les IFN de type I de différentes manières : inhibition de la synthèse des IFN, interférence avec la signalisation des récepteurs IFN... (Weber F et al., 2004). Toutefois, les virus qui n'ont pas cette capacité à supprimer les réponses IFN de type I de l'hôte sont généralement peu pathogènes et peuvent être utilisés comme souches vaccinales.

Donc, les infections virales font intervenir différentes populations cellulaires dont les cellules lymphoïdes et les cellules myéloïdes.

## **I.2.4. Les populations lymphocytaires**

Le système lymphocytaire est principalement basé sur les LyT, mais pas seulement. Il faut savoir que les lymphocytes sont représentés par trois sous types : les LyT, les LyB et LyNK qui représentent respectivement 70%, 20% et 10% des Ly du sang circulant chez un individu sain. Chaque population lymphocytaire possède un rôle important qui lui est propre dans la réponse immunitaire antivirale que nous verrons par la suite.

### **I.2.4.1. Les Lymphocytes NK**

Les LyNK sont très répandus dans les tissus lymphoïdes et non lymphoïdes tels que la moelle osseuse, les ganglions lymphatiques... Les LyNK subissent une étape de maturation lors de la reconnaissance de molécules du soi exprimées de manière constitutive dans des conditions stables. Elles sont dotées de deux fonctions distinctes : fonction effectrice de cytotoxicité cellulaire qui contrôle l'initiation des processus cytolytiques et évite les dommages tissulaires, et fonction régulatrice par l'expression de récepteurs inhibiteurs et activateurs (Vivier E et al., 2008).

#### **I.2.4.1.1. Cellules effectrices**

Par leur rôle effecteur, ces cellules de la réponse immunitaire innée contrôlent plusieurs types de tumeurs et d'infections microbiennes en limitant leur propagation et en évitant ainsi des dommages ultérieurs aux tissus. L'intensité et la qualité des réponses cytotoxiques des LyNK dépendent du microenvironnement cytokinique, ainsi que des interactions avec d'autres cellules du système immunitaire, dont les LyT, les CD et les macrophages (Long EO, 2007). Plus précisément, les IFN de type I, IL-12, IL-18 et IL-15 sont de puissants activateurs de la fonction effectrice des LyNK (Walzer T et al., 2005). De même, l'IL-2 favorise la prolifération des LyNK, leur cytotoxicité et, dans une certaine mesure, la sécrétion d'autres cytokines (Vivier E et al., 2008). Et l'effet cytotoxique des LyNK élimine les macrophages surstimulés (van Dommelen SL et al., 2006) (Fig. 3). Les LyNK semblent réduire le risque de développer des troubles inflammatoires, à la fois en contrôlant les infections microbiennes et en éliminant les cellules activées.

#### **I.2.4.1.2. Cellules régulatrices**

Ce sont aussi des cellules régulatrices engagées dans des interactions réciproques avec les CD (Walzer T et al., 2005), les macrophages, les LyT et les cellules endothéliales (Fig. 3). A contrario, la fonction des LyNK peut être régulée par le facteur de croissance TGF- $\beta$  (Laouar Y et al., 2005), et par les LyT régulateurs via un mécanisme dépendant du TGF- $\beta$  (Smyth MJ et al., 2006). Les LyNK interagissent avec les Ly TCD4 au niveau des ganglions lymphatiques. Ils peuvent limiter ou exacerber les réponses immunitaires. Pour cela, ils possèdent des récepteurs activateurs et inhibiteurs à leur surface, régulant ainsi l'activité des LyNK. Les récepteurs activateurs détectent la présence de ligands sur les cellules infectées, comme les auto-ligands induits par le stress (Lanier LL, 2005), les ligands du « non-soi » infectieux et les ligands des récepteurs de type Toll (TLR) (Sivori S et al., 2004). L'exposition des LyNK à des ligands TLR induit la production d'IFN- $\gamma$  et renforce la cytotoxicité (Hart OM et al., 2005). Les LyNK expriment également à leur surface le récepteur Fc de faible affinité, ou CD16, ce qui leur permet de détecter les cellules cibles recouvertes d'anticorps et d'exercer une cytotoxicité cellulaire dépendant des anticorps (ADCC). Les LyNK utilisent des récepteurs inhibiteurs pour évaluer l'absence de molécules du soi exprimées de manière constitutive sur les cellules cibles sensibles. Ces cellules expriment aussi à leur surface différents marqueurs dont le CD11, le

CD27, le CD16 et le CD56 (Cooper MA et al., 2001) mais elles sont dépourvues de CD3, CD8 et du TCR.

### I.2.4.1.3. Inducteur de la réponse adaptative

Les LyNK expriment des récepteurs spécifiques du CMH I (Parham P, 2005). En interagissant avec les molécules du CMH I, les récepteurs inhibiteurs permettent aux LyNK d'assurer la tolérance envers eux-mêmes tout en induisant leur effet cytotoxique envers les cellules stressées. Les LyNK induisent l'apoptose des CD immatures, influençant ainsi l'homéostasie des CD (Hayakawa Y et al., 2004 ; Figure 5). Inversement, la destruction des cellules cibles par les LyNK peut conduire à la présentation croisée d'antigènes des cibles apoptotiques des LyNK par les CD. Cette cytotoxicité des cellules cibles médiée par ces LyNK induit des réponses immunitaires adaptatives robustes spécifiques de l'antigène impliquant les LyT et les LyB (Figure 5 ; Narni-Mancinelli E et al., 2013). De même, grâce à la sécrétion d'IFN- $\gamma$  et du TNF- $\alpha$ , les LyNK peuvent favoriser la maturation des CD, qui activent les LyNK grâce à l'IL-12 (Walzer T et al., 2005).

### I.2.4.1.4. LyNK et infection virale

Lors d'une infection virale, les LyNK ont une fonction de contrôle de l'immuno-pathologie innée (Raulet DH, 2004). Plus précisément, une déplétion en ces cellules accélère le développement de ces pathologies virales. Comme démontré lors d'une infection par le CMV, les LyNK induisent la production de Ly TCD8 et atténuent l'immunopathologie précoce, dépendante de l'IFN-I, induite par la dissémination incontrôlée du virus (Robbins SH et al., 2007). Ainsi, les LyNK peuvent non seulement protéger l'hôte contre les agents pathologiques, mais aussi contre une réponse immunitaire excessive à ces agents (Johansson S et al., 2005).

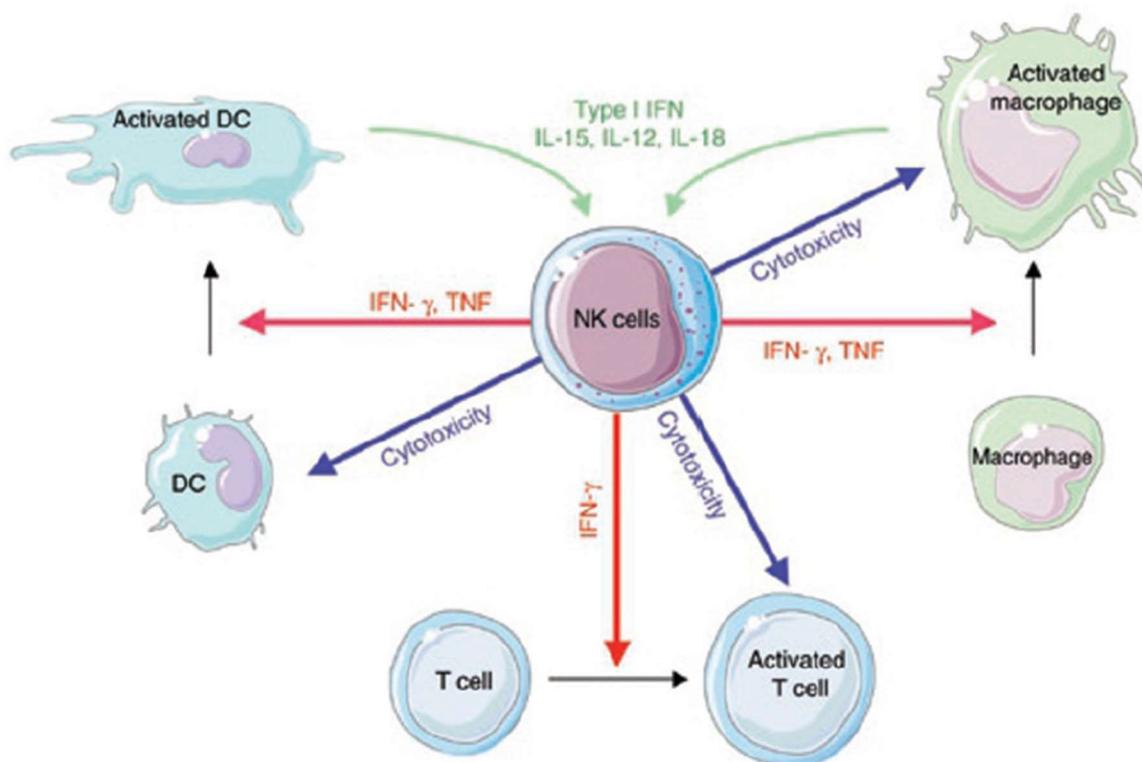


Figure 5 : Régulation des réponses immunitaires par les LyNK  
(Vivier E et al., 2008 : « Functions of natural killer cells »)

## **I.2.4.2. Les Lymphocytes B**

### **I.2.4.2.1. Développement et maturation des LyB**

Le développement des LyB inclut un continuum de stades commençant par les cellules pro-B (cellules progénitrices) n'exprimant ni le pré-BCR ni les Ig de surface dans le tissu lymphoïde primaire au niveau de la moelle osseuse. Cette croissance aboutit à la production de Ly ayant tous une Ig de surface différente, avec une maturation fonctionnelle ultérieure propre dans les ganglions lymphatiques et la rate. Le point final fonctionnel/protecteur de cette différenciation est la production d'anticorps dirigés contre les Ag du « non-soi » par les plasmocytes différenciés en phase terminale après présentation de l'Ag tels les agents viraux présentés par les CPA (Figure 6) pour en limiter la propagation (Figure 8 ; LeBien TW et Tedder TF, 2008).

Au cours de cette maturation lymphocytaire dans la moelle osseuse, les LyB subissent un réarrangement fonctionnel et ordonné des Ig, codant pour le récepteur des LyB, le BCR (LeBien TW et Tedder TF, 2008). L'expression du BCR est nécessaire au développement et à la survie des LyB dans la périphérie (Lam KP et al., 1997). De plus, ce développement nécessite l'action concertée d'un réseau de cytokines régulant l'expression de différents gènes. Par exemple, l'IL-7 est une cytokine non redondante pour le développement des LyB qui transmet des signaux de survie et de prolifération (Milne CD et Paige CJ, 2007).

Les LyB immatures qui sortent de la moelle répondent aux antigènes de façon indépendante des LyT, qui provoquent des réponses rapides restreintes par le CMH II (LeBien TW et Tedder TF, 2008). Après leur différenciation en LyB matures, ces Ly vont résider dans les follicules lymphoïdes de la rate et des ganglions lymphatiques, où ils rencontrent et répondent à des antigènes étrangers dépendants des LyT liés à des CD. Puis, ils prolifèrent et génèrent des LyB mémoires à haute affinité ou se différencient en plasmocytes (Figure 6 ; Jacob J et al., 1991). Les LyB mémoires peuvent, suite à une provocation antigénique, se différencier de façon chronique en plasmocytes à longue durée de vie (McHeyzer-Williams LJ et al., 2005).

### **I.2.4.2.2. Fonctions des LyB**

Les LyB ont divers rôles allant de la reconnaissance de cellules étrangères à la synthèse d'anticorps. Ils vont reconnaître les antigènes et se multiplier. Ils produisent ensuite des anticorps spécifiques pour cet antigène, favorisant par la suite son élimination. Outre leur rôle essentiel dans l'immunité humorale, les LyB sont indispensables au déclenchement des réponses immunitaires des LyT (Figure 7). Néanmoins, les interactions spécifiques de l'antigène entre les LyB et LyT peuvent nécessiter que l'antigène soit internalisé par le BCR, puis présenté aux LyT d'une manière restreinte par le CMH (LeBien TW et Tedder TF, 2008). Les LyB sont essentiels à une activation optimale des Ly TCD4 au cours des réponses immunitaires à des antigènes étrangers (Bouaziz JD et al., 2007). Concrètement, les LyB peuvent libérer des cytokines immunomodulatrices qui peuvent influencer diverses fonctions des LyT et des CPA dont l'activité antivirale. Les LyB ont une fonction effectrice par la production de cytokines dont l'IL-10 qui influencent la différenciation des LyT (Figure 7) (Yanaba K et al., 2008). Enfin, les LyB peuvent aussi contribuer à la pathogenèse auto-immune par la présentation de l'auto-antigène aux LyT ou par la production de cytokines pro-inflammatoires (Shlomchik MJ, 2008). Tout en étant indispensables au développement normal du système immunitaire, les LyB sont également importants à son maintien.

### I.2.4.2.3. Marqueurs spécifiques des LyB

Les LyB expriment à leur surface différentes molécules régulant le développement et la fonction des LyB, facilitant la communication avec l'environnement extracellulaire ou fournissant un contexte cellulaire permettant d'interpréter les signaux du BCR. En premier lieu, les molécules CD79a et CD79b sont essentielles pour initier la signalisation du BCR et l'activation des LyB (LeBien TW et Tedder TF, 2008). Ensuite, le CD19, qui est exprimé par pratiquement toutes les cellules de la lignée B, régule la transduction du signal intracellulaire en amplifiant l'activité des kinases de la famille Src. Le CD20 est une molécule spécifique des LyB matures qui fonctionne comme un canal Ca<sup>2+</sup> intégré à la membrane. D'autres molécules sont exprimées à la surface comme le CD21, le CD22, le CD23 et le CD40 (LeBien TW et Tedder TF, 2008).

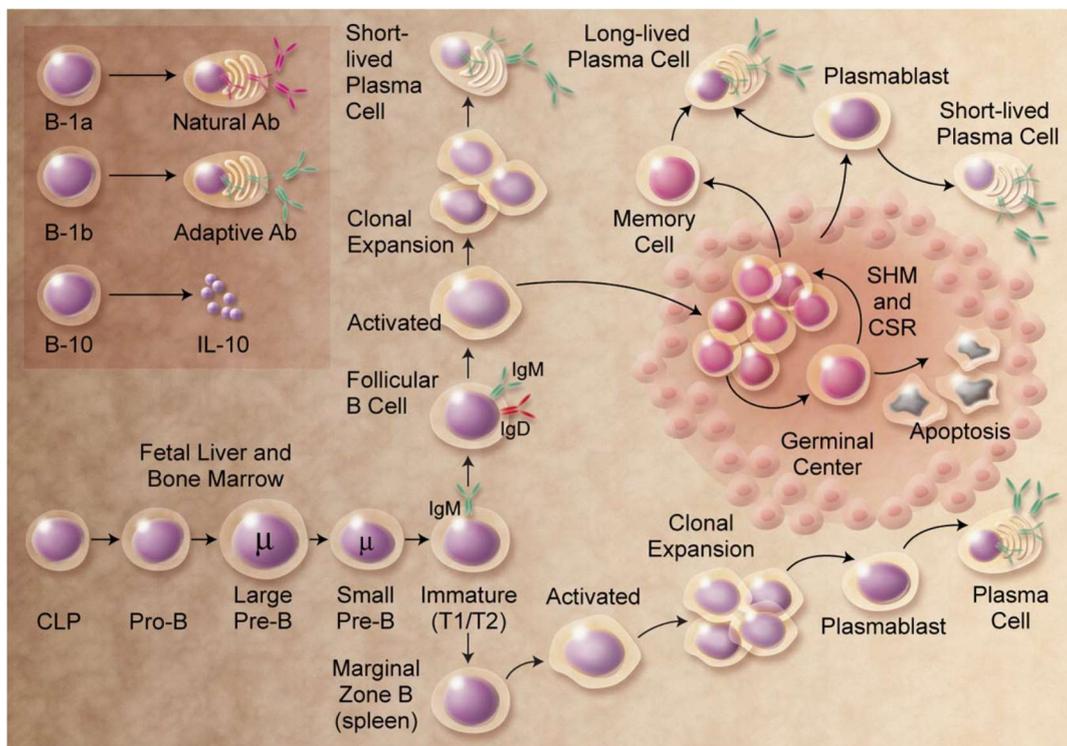


Figure 6 : Développement et maturation des LyB

(SHM = Hypermutation Somatique ; CSR = Recombinaison du Commutateur de Classe) (LeBien TW et Tedder TF, 2008 : « B lymphocytes: how they develop and function »)

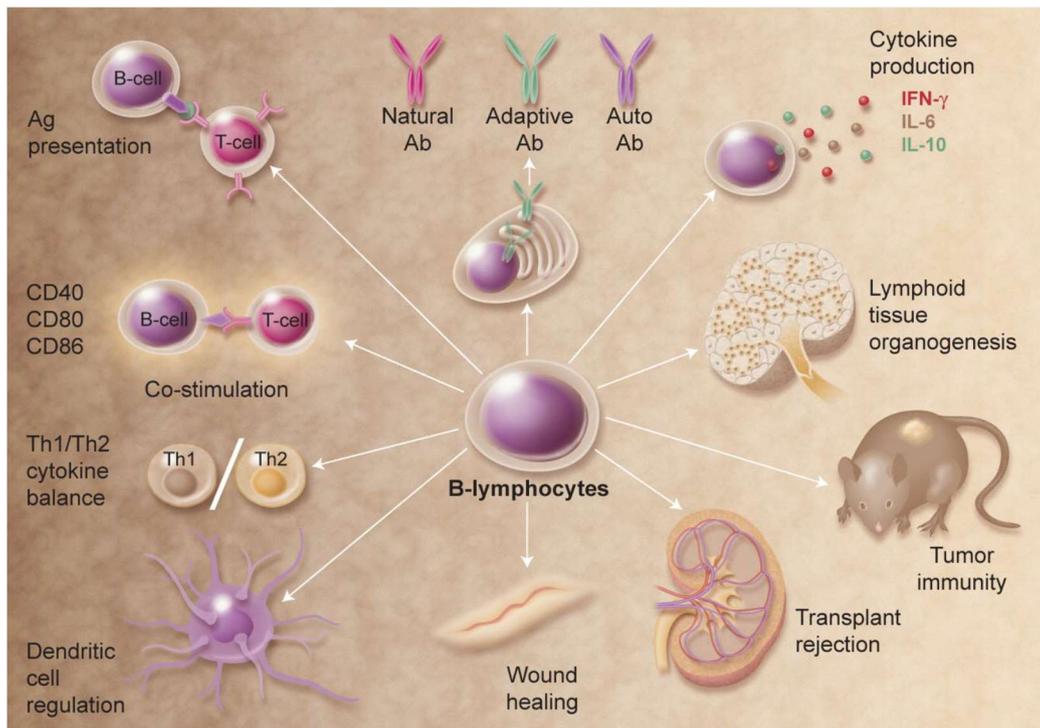


Figure 7 : Rôle multifonctionnel des LyB

(LeBien TW et Tedder TF, 2008 : « B lymphocytes: how they develop and function »)

### I.2.4.3. Les Lymphocytes T

#### I.2.4.3.1. Généralités

Les LyT constituent une défense puissante contre les dangers extrinsèques que sont les agents pathogènes, et intrinsèques tels que les cellules malignes. La lymphopoïèse T commence avec des cellules progénitrices exprimant CD2, CD5, CD7 et CD3 cytoplasmique, ayant la capacité de pénétrer dans le cortex du thymus (Laribi K et al., 2017). À ce stade, les TCR sont formés après des réarrangements des chaînes  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ , ce qui donne des LyT avec des chaînes  $\gamma\delta$  et des LyT avec des chaînes  $\alpha\beta$  (T- $\alpha\beta$ ). Les LyT précurseurs expriment faiblement le CD3 et passent par une transition rapide, où les expressions du CD4 et du CD8 sont acquises. Les Ly T- $\alpha\beta$  doublement positives CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> poursuivent leur développement avec une sélection et une maturation médiée par le TCR (Levelt CN et al., 1993). Puis les Ly T- $\alpha\beta$  migrent du cortex thymique vers la médulla, où ils subissent une sélection clonale négative pour éliminer les LyT qui ont une interaction à haute affinité pour les auto-antigènes (Goldrath AW et Bevan MJ, 1999). Enfin, les Ly T- $\alpha\beta$  matures mono-positifs CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> sont libérés dans la périphérie sous forme de LyT naïfs matures (Yamano T et al., 2015) qui circulent entre les organes lymphoïdes secondaires tels que la rate et les ganglions lymphatiques (Schwarz BA et Bhandoola A, 2006).

Les CPA vont présenter l'antigène du « non-soi » aux LyT et seront à l'origine du déclenchement du système adaptatif par les LyT. L'activation efficace des LyT nécessite l'interaction du complexe TCR-CD3 avec les molécules HLA des CPA. Toutefois, ces interactions sont contrôlées par une série de récepteurs co-stimulateurs et co-inhibiteurs ainsi que leurs ligands. Ces récepteurs sont également appelés points de contrôle immunitaire. Après la rencontre avec des CPA portant leur antigène du « non-soi », les LyT naïfs prolifèrent

et se différencient en un grand nombre de LyT effecteurs qui migrent vers les sites ayant subi une réaction inflammatoire et induisent l'apoptose des cellules infectées (McKinstry KK et al., 2010). Après élimination de la cible, la majorité de ces cellules effectrices subissent une apoptose, tandis qu'une petite proportion survit, donnant naissance à des LyT mémoire à long terme (Zhang N et Bevan MJ, 2011).

Alors que le compartiment des LyT naïfs est assez homogène, les LyT effecteurs et mémoires sont largement diversifiés. En effet, les Ly TCD4 et les Ly TCD8 peuvent se différencier en plusieurs sous-ensembles effecteurs en fonction de leur profil d'expression des médiateurs solubles tels les LyT régulateurs (Ly Treg) pour les Ly TCD4 (Tubo NJ et Jenkins MK, 2014 ; Christie D et Zhu J, 2014). Les sous-ensembles de LyT mémoire se caractérisent par des capacités différentes à persister à long terme, à migrer dans l'organisme et à résider de manière stable dans ces tissus. Le compartiment des Ly TCD8 se compose d'environ 40 % de LyT naïfs, 10 % de LyT mémoire central, 30 % de LyT mémoire effectrice et 20 % de LyT effecteurs, tandis que le compartiment des Ly TCD4 se compose d'environ 40 % de LyT naïfs, 40 % de LyT mémoire central, 20 % de LyT mémoire effectrice et 2 % de LyT effecteurs (Lugli E et al., 2013). Cependant, ces proportions varient en fonction de l'âge, au cours duquel les LyT naïfs diminuent progressivement au profit des LyT mémoires ou en présence d'infections chroniques, comme le cytomégalo virus (CMV) et le virus d'Epstein-Barr (EBV), qui induisent l'accumulation spécifique de LyT effecteurs (Sathaliyawala T et al., 2013).

#### **I.2.4.3.2. Ly TCD4 et Ly TCD8**

Il existe deux grandes classes de LyT : les Ly TCD8 et les Ly TCD4. Les Ly TCD8 sont considérés comme des cellules cytotoxiques. Ils identifient et détruisent les cellules infectées par un virus ou les cellules atteintes par le cancer par la production de cytokines. Tandis que les Ly TCD4 sont perçus comme les « chefs d'orchestre » de la régulation de la réponse immunitaire, et sont des cellules auxiliaires ou helpers. Ils aident les autres Ly dont les LyT CD8, à identifier et détruire les agents pathogènes. Les Ly TCD8 reconnaissent des peptides présentés par les molécules du CMH I, tandis que les Ly TCD4 reconnaissent des épitopes restreints au CMH II (Brummelman J et al., 2018).

#### **I.2.4.3.3. LyT Naïfs**

Les LyT naïfs sont des LyT non amorcés par un antigène et quiescents, qui sortent du thymus et circulent entre la circulation sanguine et les organes lymphoïdes secondaires (OLS). Les LyT Naïfs sont assez homogènes au niveau phénotypique et fonctionnel (Kimmig et al., 2002). Ils expriment à leur surface des niveaux élevés de CD45RA, du récepteur de chimiokine CCR7 et de la sélectine CD62L (L-sélectine). CCR7 est important pour l'extravasation et le guidage des LyT naïfs vers les OLS avec les CD activées (Jørgensen AS et al., 2017). Pour leur activation complète, les LyT naïfs dépendent largement des signaux dérivés des molécules co-stimulatrices telles que CD28 abondantes sur leur surface cellulaire (Riley JL et June CH, 2005). L'homéostasie des LyT naïfs est principalement médiée par la signalisation de l'IL-7 suite à sa liaison avec la chaîne  $\alpha$  du récepteur de l'IL-7 (IL-7Ra ou CD127) qui se dimérise avec son récepteur pour former l'IL-7R. L'IL-7R agit en combinaison avec la signalisation tonique du TCR suite au contact avec des auto-peptides présentés par des molécules du CMH (Tan JT et al., 2002). Par conséquent, les LyT Naïfs sont principalement définis comme des cellules CD45RA<sup>+</sup> CD45RO<sup>-</sup> CCR7<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> CD127<sup>+</sup>.

#### **I.2.4.3.4. LyT mémoires**

Ces LyT assurent la médiation des défenses immunitaires contre la réinfection en maintenant une mémoire immunologique à long terme (Zhang N et Bevan MJ, 2011). Les LyT mémoires ont été divisés de manière conventionnelle en LyT mémoire centrale et en LyT mémoire effectrice. Ces cellules peuvent migrer du sang vers des tissus non lymphoïde (MacLeod MK et al., 2010 ; Nguyen QP et al., 2019). Les LyT mémoire centrale et mémoire effectrice conservent une relation de précurseur-progéniture. En effet les LyT mémoire centrale moins différenciés s'autorenouvellent et donnent naissance à une progéniture plus différenciée, il en est de même pour les LyT mémoire effectrice et les LyT effecteurs (Sallusto F et al., 2004).

##### **I.2.4.3.4.1. LyT mémoire centrale**

Les LyT mémoire centrale migrent dans les OLS, où lors de la rencontre avec l'antigène, ils subissent une prolifération rapide et robuste, ainsi qu'une différenciation en cellules effectrices (von Andrian UH et Mackay CR, 2000). Les LyT mémoire centrale expriment des niveaux élevés de CCR7, CD62L, CD27, CD28 et CD127, CD45RA<sup>-</sup> et CD45RO<sup>+</sup>. Ces cellules expriment également les marqueurs de mémoire CD95, CD122, LFA-1 et LFA-3. Donc, les LyT mémoire centrale sont définis comme des cellules CD45RA<sup>-</sup>CD45RO<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>.

##### **I.2.4.3.4.2. LyT mémoire effectrice**

Dès la reconnaissance de l'antigène, les LyT mémoire effectrice déclenchent des réponses effectrices rapides, telle que la cytolysse des cellules cibles. Ces LyT expriment des niveaux élevés de molécules cytolytiques, comme le granzyme B et la perforine. Par rapport aux LyT mémoire centrale, ces cellules sont enrichies dans la circulation et non dans les OLS. Ils n'expriment pas les récepteurs CCR7 et CD62L (Sallusto F et al., 1999). Les LyT mémoire effectrice expriment une vaste gamme de récepteurs de chimiokines et de molécules d'orientation tissulaire, ce qui leur permet de migrer vers des tissus non lymphoïdes ou vers des sites d'inflammation (Butcher EC et Picker LJ, 1996). De manière générale, les LyT mémoire effectrice sont considérés comme ayant une expression réduite ou nulle de CD28 et CD127. Ces LyT mémoire effectrice sont des cellules CD45RA<sup>-</sup>CD45RO<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>CD28<sup>-</sup>CD127<sup>-</sup>CD95<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>.

##### **I.2.4.3.5. LyT effecteurs**

Les LyT effecteurs sont des LyT différenciés en phase terminale. Les LyT effecteurs possèdent de puissantes fonctions effectrices mais peu prolifératives (Henson SM et al., 2012), en raison des niveaux élevés d'inhibiteurs du cycle cellulaire. Ces cellules présentent une activation accrue des voies de signalisation de la sénescence et ont une forte propension à subir une apoptose (Verma K et al., 2017). La fréquence des LyT effecteurs augmente avec l'âge et lors d'infections virales persistantes comme le CMV (Derhovanessian E et al., 2011). Sur le plan phénotypique, les LyT effecteurs constituent un sous-ensemble de LyT mémoire effectrice qui réexpriment CD45RA (Henson SM et al., 2012). Cependant, contrairement aux LyT naïfs qui expriment également CD45RA, les LyT effecteurs n'expriment pas CCR7, CD62L, CD27, CD28 et CD127 (Romero P et al., 2007). Par conséquent, les LyT effecteurs sont des cellules CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>CD28<sup>-</sup>CD127<sup>-</sup>CD95<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>.

##### **I.2.4.3.6. LyT régulateurs**

Contrairement aux Ly TCD8, les Ly TCD4 peuvent se différencier en plusieurs sous-ensembles effecteurs dont les LyT régulateurs (Tregs), en fonction de facteurs

environnementaux, comme la présence de cytokines (Tubo NJ et Jenkins MK, 2014). Cela suggère une plasticité notable au sein des sous-ensembles de Ly TCD4 (Sallusto F, 2016). Les Tregs sont essentiels au maintien de l'homéostasie immunitaire, à la prévention de l'auto-immunité, de l'immunopathologie et de l'allergie. Ils peuvent fonctionner par le biais de multiples mécanismes (Vignali DA et al., 2008). Ces mécanismes comprennent la sécrétion de facteurs solubles immunosuppresseurs, la cytolysse des cellules cibles, la perturbation du métabolisme et la modulation des CD. Ils possèdent une activité suppressive des réponses des LyT effectrices (Dong S et al., 2013). Les Ly Tregs peuvent soit provenir du thymus, soit être générés en périphérie. Le facteur de transcription FoxP3 caractérise cette population. Les Tregs ont besoin de l'IL-2 pour leur survie, donc nous aurons une expression constitutivement élevée du récepteur de haute affinité pour l'IL-2 (IL-2Ra ou CD25) (Sakaguchi S et al., 2010). En outre, les Ly Tregs expriment le récepteur inhibiteur CTLA-4, mais aussi HLA-DR et PD-1 (Miyara M et al., 2015), jouant un rôle dans leurs fonctions suppressives. Les Tregs sont FoxP3+CD45RA-CD25+CD127- (Dong et al., 2013).

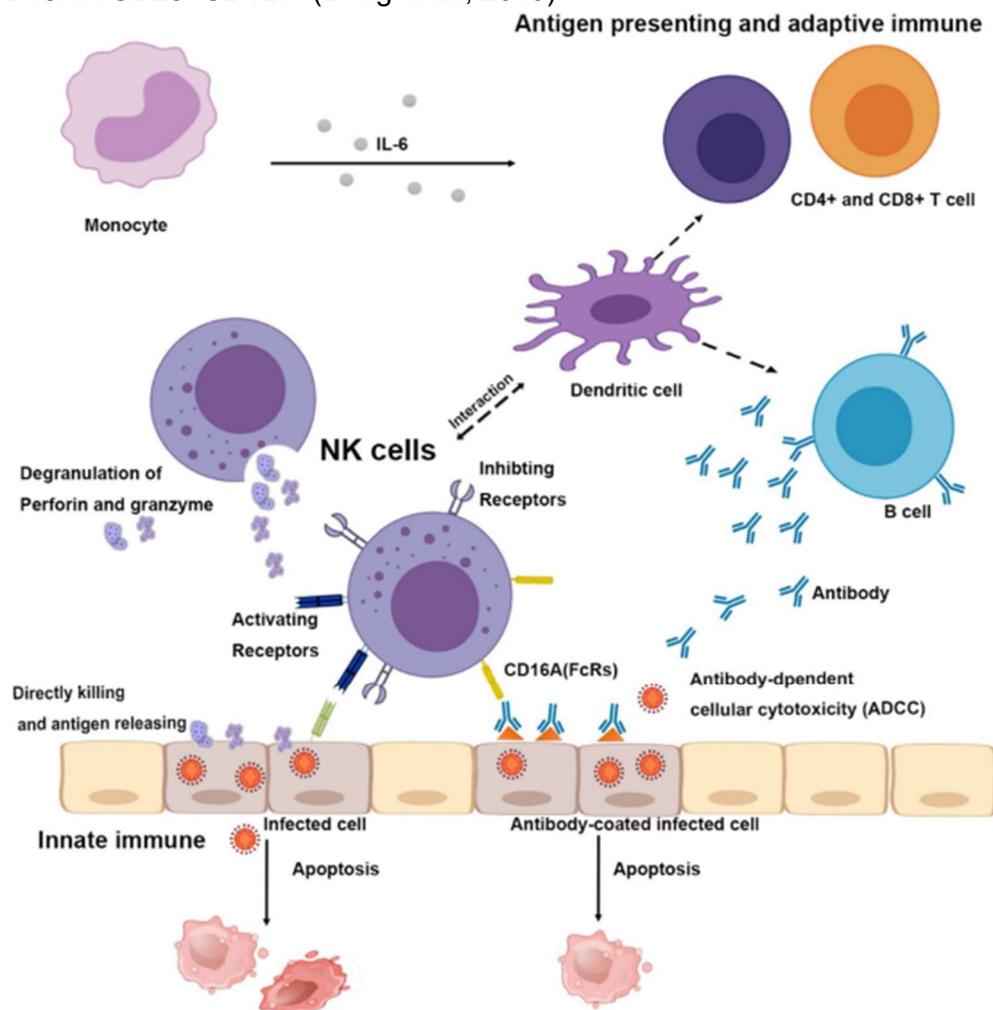


Figure 8 : Réponse immunité innée et adaptative à une infection SARS-Cov-2

(Bao C et al., 2021 : « Natural killer cells associated with SARS-CoV-2 viral RNA shedding, antibody response and mortality in COVID-19 patients »)

### I.2.5. Les Polynucléaires Neutrophiles

Lors d'un syndrome inflammatoire lié à une infection virale, les PNN sont les premières cellules recrutées au niveau du site de l'inflammation, et les principaux acteurs de l'immunité innée

(Lamichhane PP et Samarasinghe AE, 2019). Dans les conditions physiologiques, les PNN se développent au niveau de la moelle osseuse avant d'être libérés sous forme mature dans la circulation sanguine. Cependant, la présence de granulocytes immatures dans le sang peut résulter d'une réaction précoce à une infection ou d'un problème au niveau de la moelle osseuse. Les PNN ont une courte durée de vie après avoir quitté la moelle osseuse et peuvent rester quiescents dans la circulation sanguine. La principale fonction des PNN est l'élimination des agents pathogènes et des débris cellulaires par phagocytose (Rosales C, 2020).

Lors d'une infection virale, les PNN ont aussi pour rôle de produire des cytokines afin de limiter la réplication virale (Lamichhane PP et Samarasinghe AE, 2019). La libération d'éléments chimio-attractifs des neutrophiles et le recrutement des neutrophiles constituent une réponse globale de l'hôte face à un virus (Bordon J et al., 2013), y compris lors d'une infection par les SARS-Cov-2 (Borges L et al., 2020). De plus, les PNN, qui ont capté des antigènes viraux, peuvent se rendre dans les ganglions lymphatiques, pour agir comme des CPA (Lukens MV et al., 2010). Outre le trafic vers les lieux d'infection afin de phagocyter les virus, les PNN peuvent initier, élargir et/ou inhiber les processus effecteurs de l'immunité adaptative en favorisant une communication bidirectionnelle avec les LyT (Costa S et al., 2019 ; Giacalone VD et al., 2020). Par exemple, lors d'une infection virale et suite à une inflammation aiguë, les PNN affaiblissent la migration des LyT via le gradient de chimiokines en libérant de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans une synapse immunologique (Pillay J et al., 2012). Inversement, la diminution du nombre de PNN ou l'altération de leurs fonctions peuvent jouer un rôle dans l'apparition d'états pathologiques cliniques légers à graves (Lamichhane PP et Samarasinghe AE, 2019). Au niveau de la membrane cellulaire des neutrophiles, les PNN expriment un ensemble complexe de récepteurs et de molécules d'adhésion pour divers ligands, notamment des Ig et des molécules membranaires tels que CD11b, CD10 et CD16. CD16 est un marqueur de maturité non exprimé par les cellules immatures de la lignée granuleuse (Russell CD et al., 2017).

### **I.2.6. Les Monocytes**

Les monocytes représentent un second sous-ensemble de globules blancs circulants (Auffray C et al., 2009). Ils dérivent de progéniteurs médullaires, qui migrent ensuite dans la circulation sanguine (Shi C et Pamer EG, 2011). Au cours de l'homéostasie et de l'inflammation, des signaux pro-inflammatoires tels que des facteurs de croissance locaux ou des cytokines pro-inflammatoires, provenant du site de l'infection induisent la migration des monocytes circulants vers les sites inflammatoires de l'infection. Ils vont se différencier en populations de macrophages tissulaires ou de CD (Auffray C et al., 2009). Ils exercent une activité antimicrobienne directe sur ces sites en limitant la croissance et l'invasion microbienne (Serbina NV et al., 2008), aboutissant à une défense immunitaire efficace. Pour limiter la progression infectieuse, les monocytes produisent des cytokines tel que le TNF- $\alpha$  et des chimiokines (Auffray C et al., 2007). De plus, pendant l'infection, ces cellules peuvent également pénétrer dans les ganglions lymphatiques et favoriser les réponses immunitaires adaptatives en présentant l'antigène du « non-soi » aux LyT et aux LyB. Les monocytes sont divisés en sous-ensembles sur la base de l'expression des récepteurs de chimiokines et de la présence de molécules de surface spécifiques (Geissmann F et al., 2007) tels le CD14, le CD16 (Ziegler-Heitbrock L, 2007) et le CD11b.

## **I.2.7. Système immunitaire lors d'une infection SARS-Cov-2**

### **I.2.7.1. Hyperactivation de l'immunité innée**

Lors d'une infection sévère au SARS-Cov-2, et suite à une lésion pulmonaire aiguë, une hyperactivité du système immunitaire innée dérégulée s'installe. Cette réponse est susceptible d'atténuer la toxicité mais peut favoriser la dissémination virale et être à l'origine de divers symptômes cliniques. De nombreuses branches de la réponse immunitaire innée sont puissamment activées par le SARS-Cov-2 (Blanco-Melo D et al., 2020 ; Figure 9).

Ceci s'explique par l'activation des macrophages résidants dans les tissus. Ces macrophages sont impliqués dans le processus de dommages épithéliaux initiant le SDRA. Plus précisément, les macrophages sont activés par des motifs moléculaires associés à des dommages (DAMP). Ces DAMP sont générés lors de la phase initiale de l'infection et de la lyse des pneumocytes par le SARS-Cov-2. La transduction du signal qui en résulte entraîne la production de diverses cytokines qui exercent des effets autocrines et/ou paracrines, activant ainsi des programmes d'expression génique antivirale dans les cellules voisines et recrutant d'autres cellules immunitaires innées et adaptatives jouant des rôles distincts dans l'immunité antivirale et l'homéostasie tissulaire (Figure 10). De plus, la cascade inflammatoire initiée par les macrophages contribue aussi au contrôle viral. Puis, la production de cytokines anti-inflammatoires dont les IFN-I et les IFN-III va être induite, ce qui favorise les défenses antivirales intracellulaires dans les cellules voisines, et limite la dissémination virale. Cependant, la réponse des IFN-I et des IFN-III semble être atténuée en réponse à l'infection par le SARS-Cov-2 surtout dans les formes sévères de la maladie (Blanco-Melo D et al., 2020).

Les patients infectés hébergent aussi des monocytes circulants qui sécrètent de l'IL-6 et de l'IL-1 $\beta$  (Wen W et al., 2020 ; Zhang D et al., 2021). En conséquence, les patients atteints du SARS-Cov-2 présentent des taux élevés d'IL-6 sérique et de LDH (Chen G et al., 2020). La libération d'IL-6 et d'IL-1 $\beta$  favorise le recrutement de neutrophiles et de Ly TCD8 cytotoxiques (Figure 9). Au sein du parenchyme pulmonaire, ces neutrophiles activés libèrent des leucotriènes et des espèces réactives de l'oxygène qui induisent directement des lésions des pneumocytes et de l'endothélium, entraînant directement une lésion pulmonaire aiguë. Lorsque le contrôle viral local est atteint, l'IL-6 dérivée des macrophages, favorise la différenciation des Ly en Ly TCD4 auxiliaires ainsi que la formation du centre germinale producteur de LyB et donc la synthèse d'anticorps conférant une immunité à long terme (Harker JA et al., 2011). Ces perturbations cellulaires seront à l'origine de lésions alvéolaires persistantes médiées par les neutrophiles associés à une inadéquation ventilation/perfusion et à une insuffisance respiratoire hypoxémique (Vardhana SA et al., 2020). Donc, le taux d'IL-6 est corrélé à la nécessité d'une ventilation mécanique et à la mortalité, reflétant l'impact d'IL-6 dans l'amplification de la réponse immunitaire innée en recrutant des médiateurs immunitaires supplémentaires (Chen G et al., 2020). Ces élévations de cytokines de l'immunité innée, similaire au syndrome de libération de cytokines, sont principalement responsables de dommages aux organes terminaux médiés par les infections dues au SARS-Cov-2 (Mehta P et al., 2020). Or l'activation insuffisante d'IFN-I et d'IFN-III est un facteur clé de l'incapacité du système immunitaire inné à contrôler la persistance virale. De ce fait, l'activité antivirale sera décuplée, et l'inhibition de certaines voies de la réponse immunitaire innée limiteront la toxicité tissulaire tout en permettant une immunité adaptative médiée par les LyT et les LyB, et la mémoire antivirale (Vardhana SA et al., 2020).

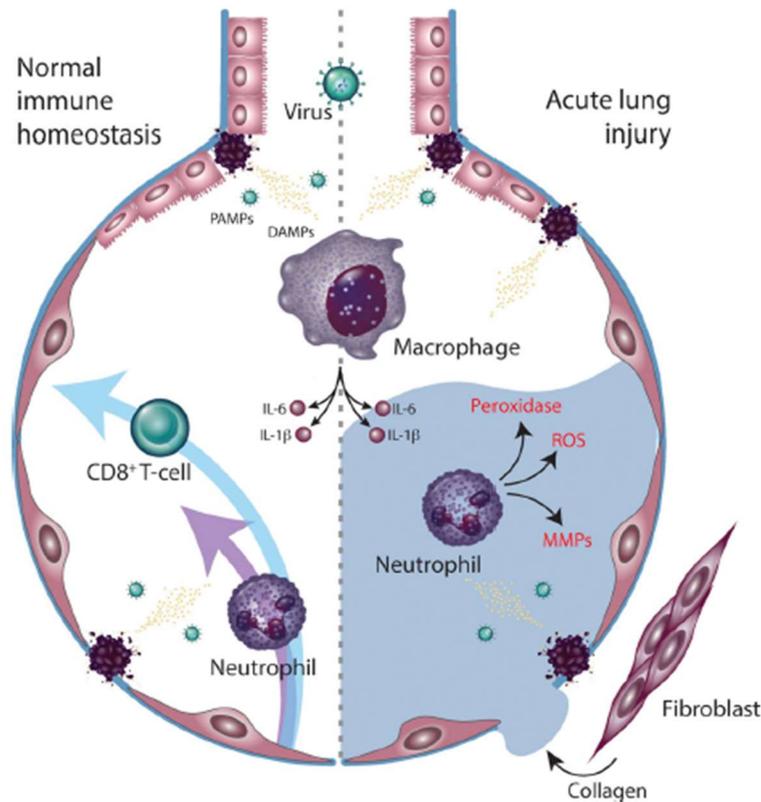


Figure 9 : Régulation immunitaire innée de la défense antivirale et de la toxicité tissulaire (Vardhana SA et al., 2020 : « The many faces of the anti-COVID immune response »)

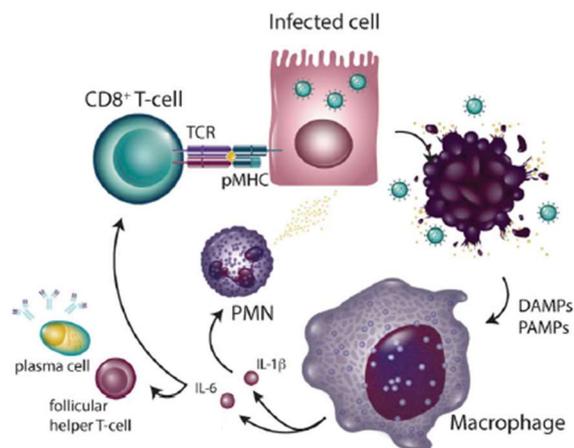


Figure 10 : Relargage cytokinique médié par le virus SARS-Cov-2 (Vardhana SA et al., 2020 : « The many faces of the anti-COVID immune response »)

### I.2.7.2. Dérèglement de l'immunité adaptative

Une réponse immunitaire adaptative intacte médiée par les LyT est essentielle à l'élimination et au maintien de la suppression à long terme des infections virales ; de même le risque de réactivation virale est important chez les patients dont le système immunitaire adaptatif est supprimé (Broers AE et al., 2000).

Au cours des infections virales au SARS-Cov-2, surtout aiguës, lors de la réponse adaptative, les peptides dérivés du virus activent la prolifération et la différenciation des Ly TCD8 et des Ly TCD4 naïfs. Une clairance virale efficace se produit dans la semaine suivant l'infection initiale, nécessitant à la fois la destruction des cellules infectées par le virus par l'intermédiaire des Ly TCD8 effecteurs et le renforcement des réponses des Ly TCD8 et des LyB par les Ly TCD4 (Vardhana SA et al., 2020). Cependant, la libération de cytokines par les LyT et la cytotoxicité cellulaire directe peuvent également contribuer à l'inflammation et à la toxicité des tissus et accélérer les complications, en particulier lors d'infections graves. En effet, la capacité des LyT à provoquer des lésions tissulaires explique l'importance des points de contrôle inhibiteurs, permettant de limiter les réponses des LyT effecteurs (Vardhana SA et al., 2020). Après cette phase, la majorité des LyT spécifiques du virus subissent une apoptose. Néanmoins, la rétention d'une population de LyT mémoire spécifique du virus est nécessaire pour une immunité antivirale à long terme (Figure 11 A). L'importance de la réponse immunitaire adaptative dans la clairance virale met en évidence que les infections virales chroniques à SARS-Cov-2 doivent, par définition, soit échapper à l'immunité adaptative, soit la supprimer (Figure 11 B). Cela s'explique par l'immunosuppression, due à la fois à la déplétion et à l'épuisement des LyT qui contribuent ? à la persistance et à la dissémination virale.

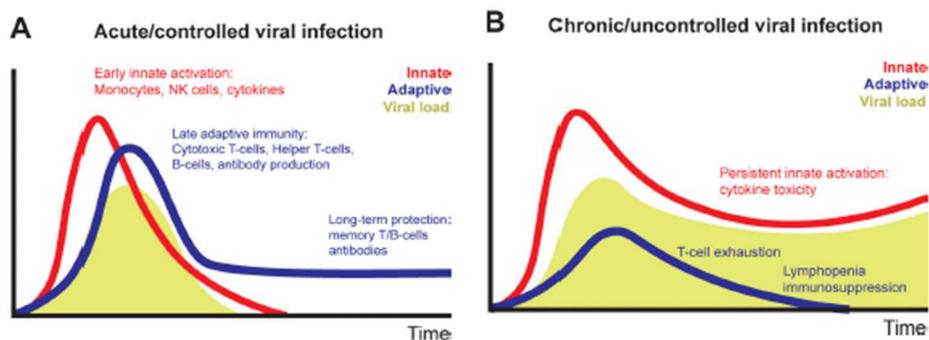


Figure 11 : Dérégulation immunitaire durant les infections virales chroniques

(Vardhana SA et al., 2020 : « The many faces of the anti-COVID immune response »)

### I.2.8. Réponse lymphocytaire lors d'une infection virale au SARS-Cov-2

La lymphopénie est l'anomalie de laboratoire la plus fréquemment retrouvée chez les patients infectés par le SARS-Cov-2 dans les formes sévères. L'état clinique chez ces patients, où la lymphodéplétion progressive est observée, se détériore au cours de l'infection. La récupération du taux de Ly tend à précéder directement la guérison clinique (Chen G et al., 2020). Les LyT circulants résidants dans les poumons de ces patients régulent fortement à la hausse les marqueurs d'épuisement des LyT, dont PD-1 et CTLA-4 (Diao B et al., 2020), comme dans toute infection virale. Les Ly TCD8 infiltrants les poumons présentent des caractéristiques transcriptionnelles de l'épuisement terminal des LyT. À contrario, le séquençage unicellulaire des cellules mononucléaires du sang périphérique de patients se remettant de l'infection montre des signes d'expansion clonale, d'activation des LyT et de formation de LyT mémoires, correspondant à une réponse immunitaire adaptative efficace (Wen W et al., 2020). De nombreux marqueurs d'épuisement des LyT sont également régulés à la hausse dans les LyT effecteurs. De plus, les manifestations pulmonaires induites par l'inflammation des Ly TCD8 se produisent au début de la maladie lors de l'expansion rapide des LyT CD8 effecteurs à courte durée de vie, ce qui explique qu'un antigène viral persistant peut entraîner l'inactivation, l'épuisement et la déplétion des LyT (Vardhana SA et al., 2020).

Rémy Formento | Thèse d'exercice | Université de Limoges | 2022

Donc, la lymphopénie sévère associée à l'épuisement des LyT et à l'immunosuppression adaptative qui en résulte chez ces patients peut aggraver les conséquences de l'immunité innée et entraver une production d'anticorps protectrice indispensable en diminuant le taux de LyB circulants.

## **I.2.9. Marqueurs de la réponse immunitaire**

### **I.2.9.1. Généralités**

Les virus doivent surmonter différents obstacles pour se répliquer dans l'environnement hostile de leurs hôtes (Virgin H et al., 2009). Différents processus aident les virus à subvertir l'immunité antivirale dont les différents points de contrôles immunitaires qui sont soit activateurs ou soit inhibiteurs (Ong EZ et al., 2016). Plusieurs points de contrôle immunitaire existent pour réguler le système immunitaire lors d'une infection virale. Les plus connus, et auxquels nous allons nous intéresser, constituent l'axe PD-1/PD-L1 et CTLA-4.

#### **I.2.9.1.1. Similitude entre PD-1 et CTLA-4**

Ces points de contrôle immunitaire sont des régulateurs négatifs des LyT. Ils régulent à la baisse les réponses des LyT et agissent pour protéger l'organisme contre des réponses immunitaires potentiellement dommageables liées à l'hyperactivation incontrôlée de ces cellules. L'inhibition de leurs cibles empêche une activation accrue et exagérée du système immunitaire. Au niveau similitude d'action, en plus d'inhiber la prolifération des LyT, ils réduisent le métabolisme du glucose, la production de cytokines et la survie cellulaire (Fife BT et al., 2008 ; Keir ME et al., 2008). Leurs niveaux d'expression sont affectés par la force et/ou la durée de la signalisation du TCR (Keir ME et al., 2008 ; Wherry EJ, 2011). Ces deux points de contrôle régulent un ensemble de protéines intracellulaires de signalisation des LyT (Parry RV et al., 2005).

PD-1 et CTLA-4 sont deux membres de la superfamille des Ig de la famille B7/CD28, des récepteurs de costimulation (Greenwald RJ et al., 2005). Ils sont exprimés par les LyT activés (Keir ME et al., 2008). Les ligands de CTLA-4 sont exprimés par les CPA professionnelles, alors que les ligands de PD-1, dont PD-L1, sont exprimés par les CPA et d'autres cellules immunitaires (Keir ME et al., 2008 ; Fife BT et al., 2008). Cependant, les mécanismes de régulation responsables et les emplacements anatomiques de l'inhibition immunitaire par ces deux points de contrôle immunitaire diffèrent. Ces checkpoints agissent à différents stades de la réponse immunitaire. CTLA-4 est considéré comme le "chef de file" des inhibiteurs de points de contrôle, car il stoppe les LyT potentiellement auto-réactifs au stade initial de l'activation des LyT naïfs, en régulant leur prolifération au début de la réponse immunitaire, généralement dans les ganglions lymphatiques (Fife BT et al., 2008). En parallèle, l'axe PD-1/PD-L1 régule les LyT précédemment activés aux stades ultérieurs d'une réponse immunitaire, au cours de la phase effectrice, principalement dans les tissus périphériques (Fife BT et al., 2008 ; Keir ME et al., 2008). Dans le cadre d'une infection virale, les virus ont développé des moyens d'échapper au système immunitaire de l'hôte (Dunn GP et al., 2004 ; Poschke I et al., 2011).

## I.2.9.2. L'axe PD-1/PD-L1

### I.2.9.2.1. Caractéristique et fonction de PD-1

La protéine de mort cellulaire programmée PD-1, également connue sous le nom de CD279, a été découverte par Tasuku Honjo et al. à l'Université de Kyoto à partir d'un criblage de gènes impliqués dans la mort cellulaire programmée (Ishida Y et al., 1992). Au niveau structural, il est constitué d'un domaine extracellulaire de type Ig-V, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine cytoplasmique qui abrite deux motifs de signalisation à base de tyrosine (Zhang X et al., 2004 ; Figure 12). D'autres types de cellules immunitaires comme les LyB, les LyNK, les cellules NKT, les CD, les cellules myéloïdes activées et les monocytes expriment également PD-1 (Sharpe AH et al., 2007 ; Fife BT et al., 2008 ; Keir ME et al., 2008).

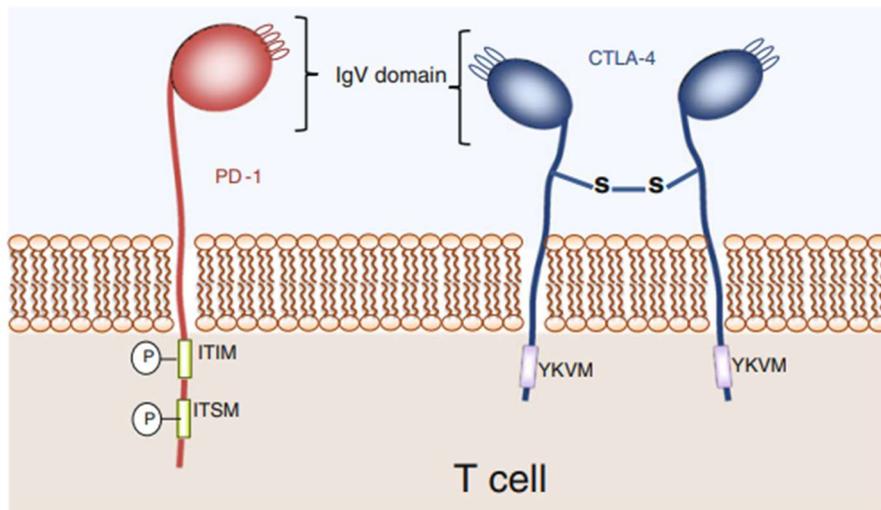


Figure 12 : Structure moléculaire de PD-1 et CTLA-4

(Chamoto K et al., 2017 : « Role of PD-1 in Immunity and Diseases »)

Dès la reconnaissance de l'antigène comme un agent pathogène par le TCR, les LyT activés expriment rapidement PD-1 (Hashimoto M et al., 2018 ; Sharpe AH et Pauken KE, 2018) qui est modulé par diverses cytokines (Terawaki S et al., 2011 ; Ahn E et al., 2018). L'expression de PD-1 sur les LyT activés est impliquée dans la modulation de la force de la réponse initiale des LyT (Honda T et al., 2014). Lors de l'activation de PD-1, divers signaux sont générés et empêchent la phosphorylation des intermédiaires clés de la signalisation du TCR, ce qui met fin à la signalisation précoce du TCR et réduit l'activation des LyT engagés dans une réponse de LyT effecteurs (Wherry EJ, 2011) et par la même leur prolifération, leur survie et la production de cytokines tels que l'IFN- $\gamma$ , le TNF- $\alpha$  et l'IL-2 (Butte MJ et al., 2007 ; Keir ME et al., 2006, 2008).

### I.2.9.2.2. Interaction de PD-1 avec ces ligands

PD-1 régule l'activation des LyT en interagissant avec ses ligands PD-L1 (CD274 ; B7-H1) et PD-L2 (CD273 ; B7-DC), qui présentent des profils d'expression distincts (Keir ME et al., 2008). La pluralité des ligands de PD-1 entraîne une variation des effets biologiques en fonction du ligand auquel il est lié (Akbari O et al., 2010). PD-1 a une affinité de liaison plus élevée pour PD-L2 que pour PD-L1, et cette différence peut être responsable des contributions différentielles de ces ligands aux réponses immunitaires (Youngnak P et al., 2003). De plus, PD-L1 est exprimé non seulement par toutes les cellules hématopoïétiques dont les LyB, les

monocytes/macrophages et les polynucléaires mais aussi par de nombreux types de cellules non hématopoïétiques comme les cellules endothéliales et épithéliales (Sharpe AH et Pauken KE, 2018). En revanche, l'expression de PD-L2 est plus restreinte sur les CD et les mastocytes et peut être induite sur des cellules hématopoïétiques telles que les LyB et les monocytes/macrophages (Rozali EN et al., 2012).

### I.2.9.2.3. Caractéristique de PD-L1

PD-L1, comme PD-1 est une protéine transmembranaire de type I qui appartient à la superfamille des Ig. Au niveau structural, PD-L1 contient un domaine extracellulaire de type Ig-V et Ig-C, un domaine transmembranaire et une courte queue cytoplasmique qui ne contient pas de motifs de signalisation canonique (Keir ME et al., 2008 ; Lin DY et al., 2008 ; Figure 13). De plus, les domaines extracellulaires de PD-L1, qui interagissent avec les domaines extracellulaires de PD-1, induisent un changement de conformation de PD-1. Ce changement de conformation entraîne la phosphorylation du motif inhibiteur cytoplasmique à base de tyrosine et du motif de commutation à base de tyrosine par les kinases de la famille Src (Zak KM et al., 2015). Ces motifs tyrosine phosphorylés recrutent ensuite les protéines tyrosine phosphatases pour atténuer les signaux d'activation des LyT.

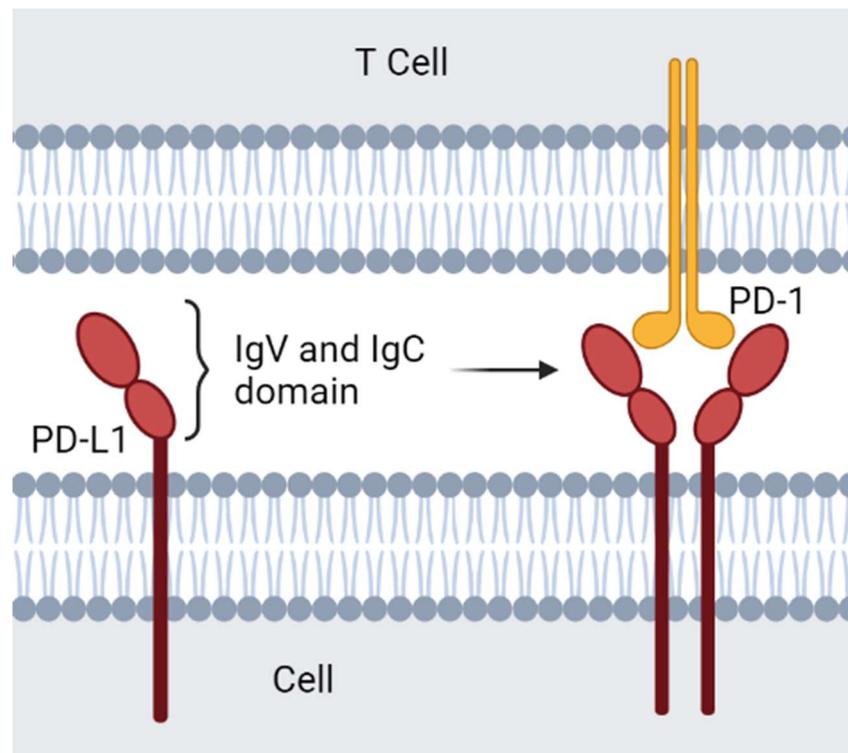


Figure 13 : Structure de PD-L1 et interaction PD-1/PD-L1

### I.2.9.2.4. Interaction PD-1 et PD-L1

L'interaction de PD-1 avec PD-L1 contribue à la conversion des Ly TCD4 naïfs en Ly Treg (Wang L et al., 2008) et inhibe les réponses des LyT (Francisco LM et al., 2009). L'augmentation de l'expression de PD-L1 sur les cellules cibles est induite par les cytokines inflammatoires dont l'IFN $\gamma$  (Chen L, 2004). Par la suite, PD-L1 ajuste la quantité et la qualité de la réponse des Ly TCD8 cytotoxiques induisant l'élimination du virus avec un minimum de dommages tissulaires collatéraux. PD-L1 interagit aussi avec d'autres molécules comme CD80. La liaison entre CD80 et PD-L1 exerce, comme PD-1, un effet inhibiteur sur les

réponses des LyT activés (Butte MJ et al., 2007, 2008 ; Park JJ et al., 2010). Cette interaction empêche PD-L1 sur les CD d'émettre un signal co-inhibiteur aux LyT via PD-1 (Chaudhri A et al., 2018 ; Sugiura D et al., 2019).

#### **I.2.9.2.5. Axe PD-1/PD-L1 et infection virale**

L'axe PD-1/PD-L1 régule les réponses immunitaires antivirales (Butte MJ et al., 2007 ; Xiao Y et al., 2014) et est donc modulé par un certain nombre de virus. Lors d'une infection virale tel que le VIH ou le VHB, l'expression de PD-1 est augmentée par les Ly TCD4 et les Ly TCD8 (Trautmann L et al., 2006 ; Bengsch B et al., 2014). Concernant le VIH, l'expression accrue de PD-1 a été associée à un déclin accéléré des Ly TCD4, en particulier les LyT mémoire centrale (Zhang JY et al., 2007) et les Ly Tregs (Tian X et al., 2015), suite à une infection aiguë (Hoffmann M et al., 2016) et à une infection chronique (Trautmann L et al., 2006). L'enrichissement du VIH dans les cellules exprimant PD-1 peut être dû aux effets inhibiteurs de PD-1 sur l'activation des LyT, qui limiteraient la transcription, l'exportation et la traduction de l'ARN du VIH, et favoriseraient donc l'infection latente par rapport à l'infection productive. Pour le VHB comme pour les autres virus, il a été démontré que PD-L1 est élevé sur les monocytes et sur les LyB, et qu'il peut contribuer à l'épuisement continu des LyT (Huang ZY et al., 2017). L'épuisement et la suppression des réponses immunitaires antivirales peuvent entraîner une évansion immunitaire virale. L'axe PD-1/PD-L1 régule les réponses des LyT au stade de l'activation (Sugiura D et al., 2019).

##### **I.2.9.2.5.1. Rôle de PD-1 dans les infections virales aiguës**

Lors d'une infection virale aiguë, PD-1 est rapidement régulé à la hausse sur les LyT CD8 naïfs spécifiques du virus (Ahn E et al., 2018). De plus, PD-1 diminue les fonctions effectrices des Ly TCD8 effectrices, inhibe la différenciation des Ly TCD8 en Ly TCD8 cytotoxiques (David P et al., 2019), et régule négativement la différenciation terminale des Ly TCD8 naïfs en Ly TCD8 effecteurs pendant une infection virale aiguë. Les Ly TCD8 mémoire spécifique du virus qui se développent après l'élimination du virus et à partir d'un sous-ensemble de LyT effecteurs (Akondy RS et al., 2017 ; Omilusik KD et Goldrath AW, 2017 ; Youngblood B et al., 2017), persistent sans antigène et sont capables de s'auto-renouveler en raison d'une prolifération homéostatique en réponse à l'IL-7 et à l'IL-15 (Surh CD et Sprent J, 2008 ; Abdelsamed HA et al., 2017). Après l'élimination du virus, l'expression de PD-1 sur les LyT spécifiques du virus revient à la normalité (Barber DL et al., 2006 ; Blattman JN et al., 2009). Donc, la stimulation de l'axe PD-1/PD-L1 pendant la phase aiguë de l'infection virale est impliquée dans la force et la qualité de l'activation des Ly TCD8 cytotoxiques de manière à équilibrer le bénéfice (élimination du virus) et le risque (dommages tissulaires), empêchant ainsi des dommages tissulaires excessifs.

##### **I.2.9.2.5.2. Expression de PD-L1 induite par les virus**

Lors d'une infection virale, l'expression de PD-L1 est régulée au niveau génique par des signaux pro-inflammatoires et anti-inflammatoires (Sun C et al., 2018). Au cours d'un syndrome inflammatoire, nous avons la production d'IFN- $\gamma$  qui est inducteur soluble de PD-L1 sur divers types de cellules (Lee SJ et al., 2006) tout en favorisant l'élimination non lytique du virus (Garcia-Diaz A et al., 2017 ; Sun C et al., 2018). PD-L1 augmente la cytotoxicité des LyNK et permet l'expansion clonale et la formation de Ly TCD8 cytotoxiques antiviraux (Kolumam GA et al., 2005 ; Aichele P et al., 2006).

### I.2.9.2.5.3. Fonction de PD-L1 pendant les infections virales aiguës

Pendant l'infection virale aiguë, les LyT spécifiques du virus régulent à la hausse PD-1 lors de la reconnaissance de l'antigène. Simultanément, les virus régulent aussi à la hausse PD-L1 pendant la phase tardive de l'infection virale aiguë. De nombreux virus régulent aussi PD-L1 sur les CPA professionnelles, soit directement, soit par la libération d'IFN (Brown JA et al., 2003). Une forte expression de PD-L1 sur les CPA dans le contexte d'une infection virale dépasse la capacité de liaison de CD80, ce qui entraîne une augmentation de la signalisation co-inhibitrice via PD-1 (Figure 14). De plus, la présence de PD-L1 induite par le virus sur les CPA professionnelles active les Ly TCD8, où leur réponse antivirale sera amplifiée sur les épitopes dérivés du virus fortement stimulants. Sur les CPA professionnelles PD-L1 favorise également l'induction et le maintien des Ly Treg (Francisco LM et al., 2009). Les Ly Treg contribuent à confiner la défense antivirale et à prévenir l'immunopathologie pendant les infections virales (Veiga-Parga T et al., 2013). Dans l'ensemble, les virus peuvent reprogrammer la fonction des CPA dans les réponses immunitaires antivirales en faisant pencher la balance entre les signaux co-inhibiteurs et co-stimulateurs (Kleinpeter P et al., 2019). Enfin, cette augmentation de PD-L1 a un effet protecteur sur les cellules infectées par le virus et sur leur élimination par les Ly TCD8 cytotoxiques, en dérégulant la différenciation terminale des Ly TCD8 et en prévenant les dommages tissulaires excessifs dus à une attaque cytotoxique incontrôlée (Mueller SN et al., 2010 ; Frebel H et al., 2012).

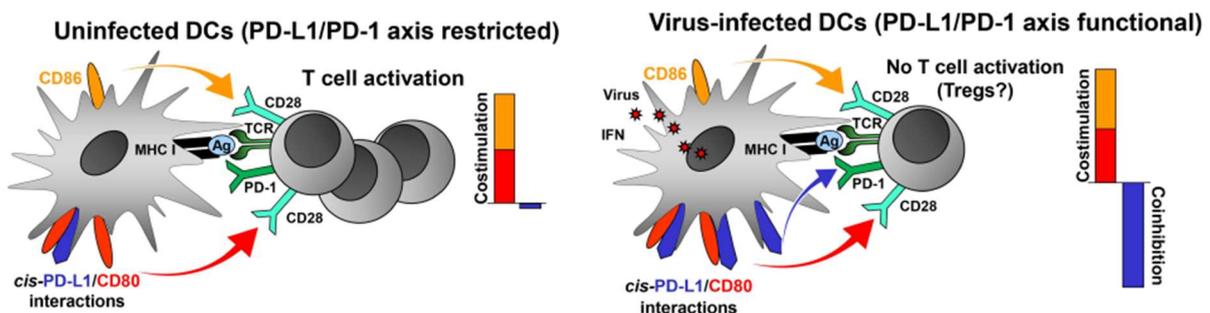


Figure 14 : Régulation virale de l'activation des cellules T médiée par PD-L1

(Schönrich G et Raftery MJ, 2018 : « The PD-1/PD-L1 Axis and Virus Infections : A Delicate Balance. »)

### I.2.9.2.6. L'axe PD-1/PD-L1 lors d'infections virales chroniques

Au cours de l'infection chronique, les particules virales sont continuellement libérées par les cellules infectées par le virus et entretiennent un réseau de mécanismes immunosuppresseurs qui entravent l'élimination du virus (Ng CT et al., 2013). Dans un contexte de rencontre chronique avec des antigènes, les changements phénotypiques des Ly TCD8 induisent une perte progressive de leurs fonctions effectrices, pour atteindre un état d'épuisement (ou de dysfonctionnement) dû à l'expression élevée de PD-1 (Wherry EJ et Kurachi M, 2015 ; McKinney EF et Smith KGC, 2018). De plus, les Ly TCD4 renforcent les réponses des Ly TCD8 spécifiques du virus (Matloubian M et al., 1994). Néanmoins, certaines fonctions cellulaires sont perdues précocement comme la cytotoxicité, la production d'IL-2 et la prolifération, tandis que d'autres, comme la production d'IFN- $\gamma$ , sont maintenues plus longtemps (Wherry EJ et al., 2003 ; Wei F et al., 2013). La régulation à la hausse de PD-1 est devenue la caractéristique déterminante des LyT épuisés au cours des infections chroniques (Crawford A et al., 2014). De façon plus explicite, la signalisation de PD-1 entrave la motilité des LyT, facilitant l'engagement de voies inhibitrices dans les LyT (Zinselmeyer BH et al.,

2013). Enfin, les LyT subissent une apoptose (Kahan SM et al., 2015). PD-1 reflète donc une adaptation de la fonction des Ly T à l'inflammation chronique (Barnes E, 2018 ; Petrelli A et al., 2018).

#### **I.2.9.2.7. PD-1 et SARS-Cov-2**

Lors des infections aiguës au SARS-Cov-2, PD-1 est surexprimé à la surface des LyT dont les Ly TCD8 (Westmeier et al., 2020, Diao B et al., 2020). De plus, le taux de propagation des Ly TCD4 et des Ly TCD8 est réduit. L'expression de PD-1 à la surface des LyT entraîne un dysfonctionnement de ces cellules (Diao B et al., 2020) qui inhibe les réponses immunitaires appropriées, provoquant une auto-immunité et endommageant les tissus infectés (De Biasi S et al., 2020). En outre, lors d'une infection au SARS-Cov-2, la voie PD-1/PD-L1 sera activée, et des signaux inhibiteurs seront générés pour stopper la propagation et l'activité des LyT, ce qui entraînera une diminution de l'immunité contre le virus (De Biasi S et al., 2020 ; Figure 15).

#### **I.2.9.2.8. PD-L1 et SARS-Cov-2**

Lors de l'infection virale induite par le SARS-CoV-2, nous avons une sécrétion d'IL-10 qui entraîne la surexpression de PD-L1 dans les monocytes et les CD (Zhou F et al., 2020) ainsi qu'une diminution de l'expression de l'antigène leucocytaire humain d'isotype DR (HLA-DR). Contrairement aux monocytes et aux CD, les neutrophiles expriment moins PD-L1 (Parackova et al., 2020). La fixation du PD-L1 des monocytes au PD-1 exprimé à la surface des Ly TCD8 inhibe également leur activité antivirale et conduit finalement à la progression de la maladie (Aghbash PS et al., 2021).

### **I.2.9.3. CTLA-4**

#### **I.2.9.3.1. Structure de CTLA-4**

CTLA-4 ou CD152 forme un homodimère, constitué d'un domaine extracellulaire de type Ig-V, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine intracellulaire incluant un motif de signalisation YKVM (Figure 12).

#### **I.2.9.3.2. CTLA-4 et ses ligands B7**

Ce récepteur fixe les ligands B7 qui sont de deux types : B7-1 (CD80) et B7-2 (CD86) par des mécanismes qui impliquent le motif MYPPPY présent dans le CDR3 (Complementarity Determining Region 3) de CTLA-4 (Linsley PS et al., 1996). Ces ligands B7 sont exprimés par les CPA professionnelles, qui résident généralement dans les ganglions lymphatiques ou la rate (Fife BT et al., 2008), et aussi par les Ly TCD4, les LyTCD8 et les LyB (Su KY et al., 2016). Ces interactions ont lieu au niveau de la synapse immunitaire entre les LyT et les CPA par le recrutement des ligands B7 (Pentcheva-Hoang T et al., 2004 ; Yokosuka T et al., 2010) (Figure 16).

#### **I.2.9.3.3. CTLA-4 versus CD28**

CTLA-4 est un homologue de CD28. Tous les deux fixent les mêmes ligands B7 des CPA. Plus précisément, CTLA-4 se lie aux molécules B7-1 (CD80) et B7-2 (CD86) et induisant un signal inhibiteur des réponses des LyT (Quezada SA et Peggs KS, 2013) contrairement à CD28 qui a un effet stimulateur lorsqu'il se fixe sur les ligands B7. Néanmoins, CTLA-4 possède une affinité de liaison beaucoup plus importante pour les ligands B7 que CD28 (Collins AV et al., 2002 ; Figure 16). CTLA-4 contrebalance les récepteurs co-stimulateurs des LyT tels que CD28, qui se lie à CD80 et CD86 sur les CPA professionnelles et qui

induisent l'activation des LyT (Esensten JH et al., 2016). Ainsi, cette liaison compétitive entre CTLA-4 et CD28 empêche directement le signal co-stimulateur normalement fourni par la liaison CD28:B7 ou par sa voie de signalisation (Walker LS et al., 2011 ; Egen JG et al., 2002 ; Parry RV et al., 2005). En conséquence, le CD28 est chassé de la synapse immunologique par CTLA-4 (Quezada SA et Peggs KS, 2013). Donc, ce système CD28/CTLA-4 fonctionne comme un système qui peut réguler l'activation des LyT à la hausse ou à la baisse.

#### **I.2.9.3.4. Régulation et expression cellulaire de CTLA-4**

CTLA-4 est soumis à une certaine régulation. L'expression de CTLA-4 a été mise en évidence dans des vésicules intracellulaires des Ly Treg ou des LyT conventionnels activés. Cette localisation est due à l'endocytose rapide et constitutive de CTLA-4 à partir de la membrane plasmique expliquant qu'environ 90 % de CTLA-4 est intracellulaire dans les LyT naïfs au repos (Qureshi OS et al., 2012). Une fois internalisées, les molécules CTLA-4 vont soit être recyclées vers la membrane plasmique, soit être dégradées dans les compartiments lysosomaux. Donc, CTLA-4 est une molécule hautement endocytaire qui lie deux ligands distincts, CD80 et CD86, conduisant à leur élimination dans les cellules. A contrario, les signaux activateurs résultant de la liaison du TCR avec CD28 induisent une régulation à la hausse de CTLA-4 à la surface de la cellule par exocytose de vésicules contenant CTLA-4 (Linsley PS et al., 1996).

#### **I.2.9.3.5. Fonction immunitaire de CTLA-4**

Au niveau du mécanisme d'action, l'interaction du CTLA-4 avec son récepteur augmente la mobilité des LyT entraînant ainsi une diminution de leur capacité à interagir avec les CPA (Egen JG et Allison JP, 2002 ; Schneider H et al., 2006). CTLA-4 est également impliqué dans d'autres aspects du contrôle immunitaire. Tout d'abord, les Ly Tregs expriment de manière constitutive CTLA-4, et jouent un rôle important en altérant leurs fonctions suppressives (Takahashi T et al., 2000), contrairement aux LyT effecteurs. Les Ly Tregs contrôlent les LyT effecteurs par rétrocontrôle négatif des ligands B7 sur les CPA, ce qui entraîne une réduction de la costimulation de CD28 (Figure 17) (Qureshi OS et al., 2011). De plus, CTLA-4 sur les Tregs contrôle l'activité d'autres cellules, telles que les CPA ou les LyT naïfs, permettant de contenir ainsi les réactions immunitaires excessives. Son expression est également induite sur les LyT activés (Piccirillo CA et al., 2004). De plus, la fonction de CTLA-4 dans les Ly non Treg est extrinsèque aux cellules, donc CTLA-4 a un effet similaire aux Ly Treg sur ces cellules (Wang CJ et al., 2012 ; Corse E et al., 2012).

#### **I.2.9.3.6. CTLA-4 et infection virale**

Dans les infections virales comme le VIH, l'expression de CTLA-4 est augmentée sur les Ly TCD4 et les Ly TCD8 (Kaufmann DE et al., 2007), ce que nous retrouvons également dans l'infection au VHB pour les Ly TCD8 (Schurich A et al., 2011). CTLA-4 est aussi surexprimé par les Ly Treg lors d'une infection virale (Tian X et al., 2015). Concernant le VIH, le virus se réplique préférentiellement dans les Ly TCD4 activés qui expriment des niveaux élevés de CTLA4, le virus se trouve donc enrichi dans les Ly TCD4 (El-Far M et al., 2015). L'internalisation rapide de CTLA4 joue potentiellement un rôle en favorisant la persistance du virus dans ces cellules (El-Far M, et al., 2013).

#### **I.2.9.3.7. CTLA-4 et SARS-Cov-2**

Dans le cadre d'une infection au SARS-Cov-2, et après la présentation d'antigènes viraux par les CD aux Ly TCD8, il a été démontré que CTLA-4 se lie à son ligand B7 à la surface des CD,

et par conséquent, supprime l'activité des Ly TCD8 (Aghbash PS et al., 2021 ; Figure 15). Cependant, des études complémentaires sont nécessaires pour démontrer le rôle de CTLA-4 sur les différentes populations lymphocytaires lors d'une infection virale par le SARS-Cov-2.

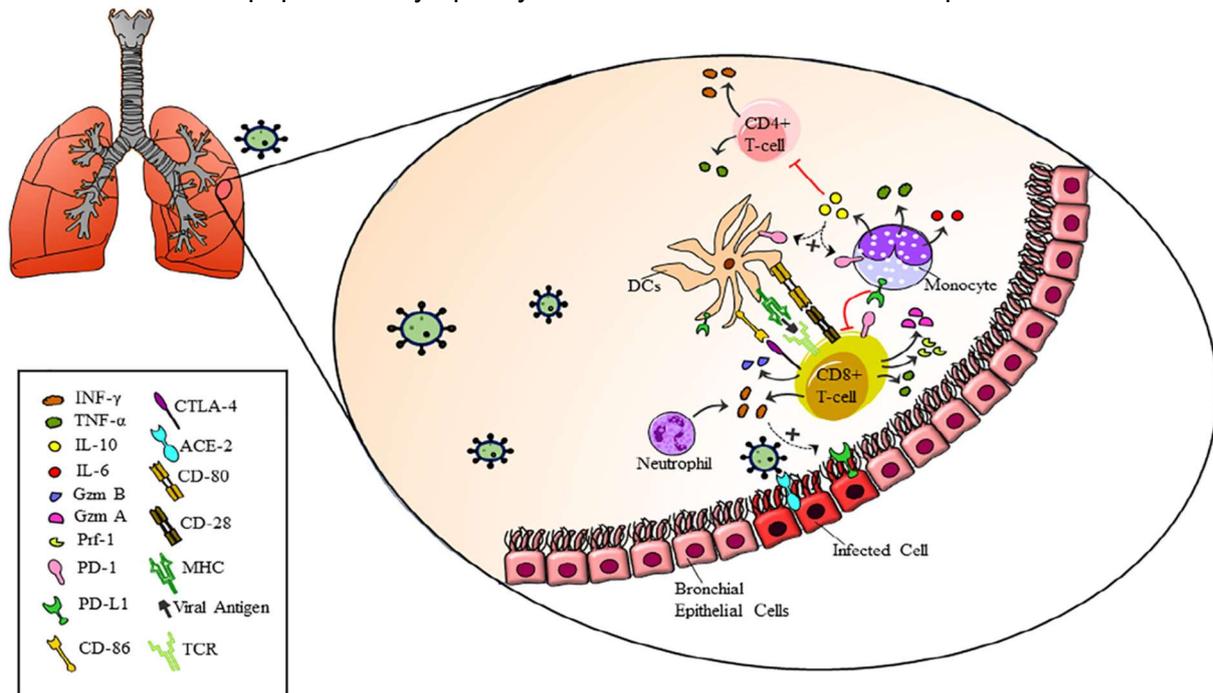


Figure 15 : Rôles de PD-1 et CTLA-4 dans la régulation des cellules immunitaires au cours d'une infection virale respiratoire

(Aghbash PS et al., 2021 : « SARS-CoV-2 infection: The role of PD-1/PD-L1 and CTLA-4 axis »)

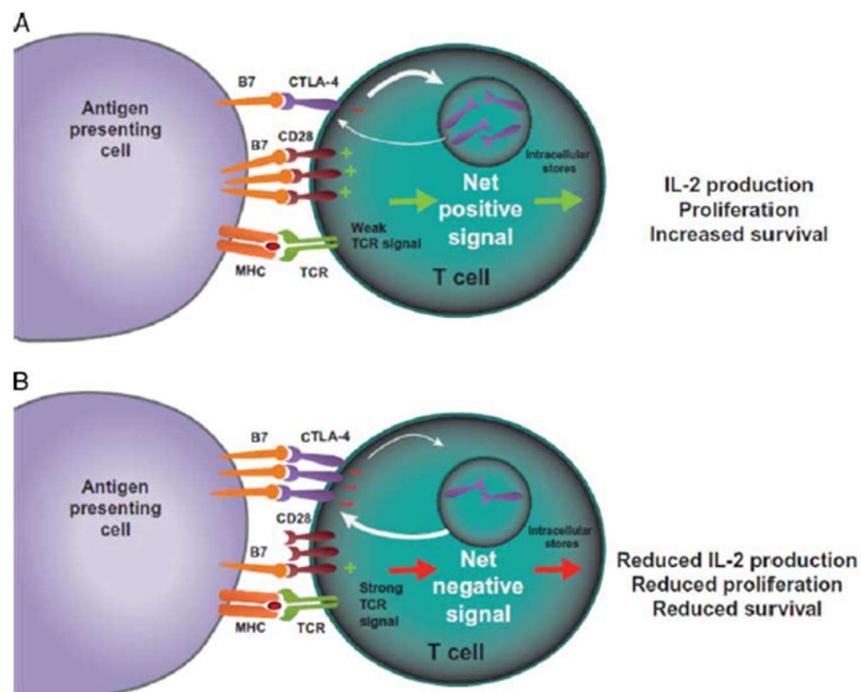


Figure 16 : Inhibition des LyT médiée par CTLA-4

(Buchbinder EI et al., 2016 : « CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. »)

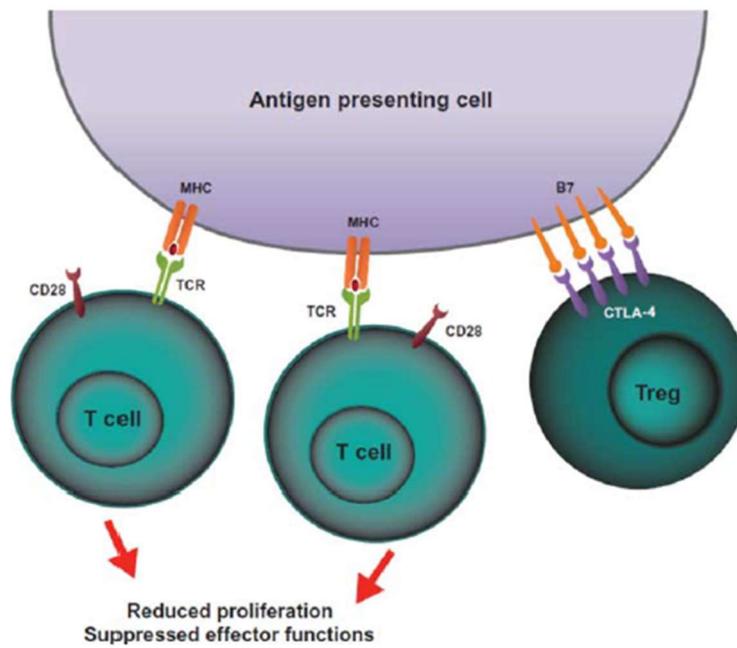


Figure 17 : Inhibition des Tregs médiée par CTLA-4

(Buchbinder EI et al., 2016 : « CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. »)

## II. Objectifs de l'étude

---

En mars 2020, au début de la pandémie COVID-19, la connaissance des différents mécanismes physiopathologiques était insuffisante pour la compréhension des différentes étapes de l'infection SARS-Cov-2. Toutes les équipes de recherche étaient tournées vers cette pandémie pour dénicher le maximum d'informations sur ce virus, et mettre en place, le plus rapidement possible, un remède pouvant s'opposer à cette infection, où à l'époque les vaccins contre la COVID-19 n'existaient pas encore.

L'équipe de recherche INSERM U1262/CNRS 7276 s'est intéressée, pendant la période mars-avril 2020, à la compréhension des mécanismes immunitaires du corps humain impliqués dans la réponse antivirale. Ce travail a été effectué en coopération avec l'équipe Inserm CIC 1435 & UMR 1092 et le service de réanimation. Nous présentons donc ici l'une des premières études préliminaires évaluant le statut immunitaire des patients atteints par l'infection SARS-Cov-2 dans sa forme sévère, confirmés au laboratoire, et admis en service de réanimation.

L'équipe composée du Dr. Robin JEANNET, du Dr. Thomas DAIX, du Pr. Jean FEUILLARD, du Dr. Bruno FRANCOIS et de moi-même, s'est intéressée à la caractérisation de la réponse immunitaire des patients SARS-Cov-2 dans les formes sévères au cours des deux premières semaines d'hospitalisation en service de réanimation au CHU de Limoges. Ce travail a fait l'objet d'une publication dans la revue *Intensive Care Medicine* (voir Annexe ; Jeannet R et al., 2020).

Pour répondre à cette problématique, nous avons analysé l'évolution des différentes populations leucocytaires au cours de l'infection SARS-Cov-2, et étudié l'expression de points de contrôle immunitaire PD-1 et son ligand PD-L1, et CTLA-4 aux différents stades de la maladie. À cette fin, il est nécessaire d'obtenir des échantillons réguliers de sang périphérique de patients au cours de l'infection par le SARS-Cov-2 et de la guérison. L'évaluation longitudinale des réponses immunitaires au SARS-Cov-2 est particulièrement importante dans le cadre d'interventions thérapeutiques, qu'elles soient antivirales ou à visée immunitaire.

### III. Matériel et méthodes

#### III.1. Population de l'étude

Notre étude repose sur une cohorte de 13 patients infectés par le virus SARS-CoV-2, transmis en soins intensifs dans le service de réanimation du CHU de Limoges. Ces patients ont été assignés à l'étude entre le 1er avril au 1er mai 2020. Ils ont été suivis durant les deux premières semaines de séjour en service de réanimation. Cependant, certains patients, pour sortie plus tôt du service de réanimation du CHU de Limoges, n'ont pu être suivis pendant toute l'étude. Un tableau récapitulatif, ci-dessous, du nombre de contrôles (volontaires sains) et du nombre de patients suivis aux différents instants t, a été réalisé. Tous les patients et les volontaires sains ne se sont pas opposés à l'utilisation de leurs données à des fins de recherche (N° 287-2018-53).

Tableau 1 : Population étudiée

Population	Contrôles	Patients SARS-Cov-2 à J0	Patients SARS-Cov-2 à J2-3	Patients SARS-Cov-2 à J4-5	Patients SARS-Cov-2 à J6-7
Nombre	10	13	10	10	9

#### III.2. Analyse des différentes populations lymphocytaires, granulocytaires et monocytaires , et de l'expression de PD-1, PD-L1 et de CTLA-4 par Cytométrie en Flux

Pour chaque patient, un tube d'échantillon de sang périphérique a été fraîchement recueilli dans une poche par le CIC (Centre d'Investigation Clinique) dès l'admission en service de réanimation puis tous les deux jours pendant une à deux semaines. Le prélèvement est acheminé directement au laboratoire de recherche INSERM U1262/CNRS 7276. A l'arrivée du prélèvement, une décontamination de la poche a été effectuée avant le recueil du prélèvement pour éviter toute contamination éventuelle.

Et pour chaque prélèvement, 100 µL de sang pour environ 10 Millions de Leucocytes par mL ont été transférés dans plusieurs tubes à hémolyse. Nous avons alors ajouté les anticorps monoclonaux conjugués à des fluorochromes en fonction des populations étudiés (panel dédié : voir ci-dessous). Après une incubation de 15 minutes à l'obscurité et à température ambiante pour permettre l'expression des marqueurs à la surface des cellules, chaque échantillon a été soumis à une lyse complète des globules rouges par ajout de 900 µL de Versalyse (tampon hypotonique). Après une nouvelle incubation de 10 minutes à l'obscurité et à température ambiante, suivi d'une centrifugation à 1200 rpm (300 G) 5 minutes, le culot cellulaire est resuspendu dans 500 µL de PBS. Nous passons les échantillons sur le cytomètre Navios Beckman Coulter pour détermination des taux des différentes populations examinées.

Les différents panels sont :

- Panel n°1 : Analyse des différentes sous populations lymphocytaires et détermination de leur taux en G/L (Tableau 2 ; Figure 18)

Tableau 2 : Panel n°1 : Analyse des sous-populations lymphocytaires

Antigène	Fluorochrome	Clone	Compagnie	Référence
CD4	FITC	13B8.2	Beckman Coulter	A07750
CD19	PE	HD37	Beckman Coulter	A07769
CD $\gamma\delta$		11F2	Beckman Coulter	B49176
CD8	ECD	SFCI21Thy2D35,6,22,23	Beckman Coulter	737659
CD3	PC5.5	UCHT1	Beckman Coulter	B49203
CD56	PC7	NKH-1	Beckman Coulter	A21692
CD10	APC	ABL1	Beckman Coulter	B92400
CD7	AA700	8H8.1	Beckman Coulter	B36290
CD5	AA750	BL1a	Beckman Coulter	B92413
CD16	PB	3G8	Beckman Coulter	B36292
CD45	KO	J.33	Beckman Coulter	B36294

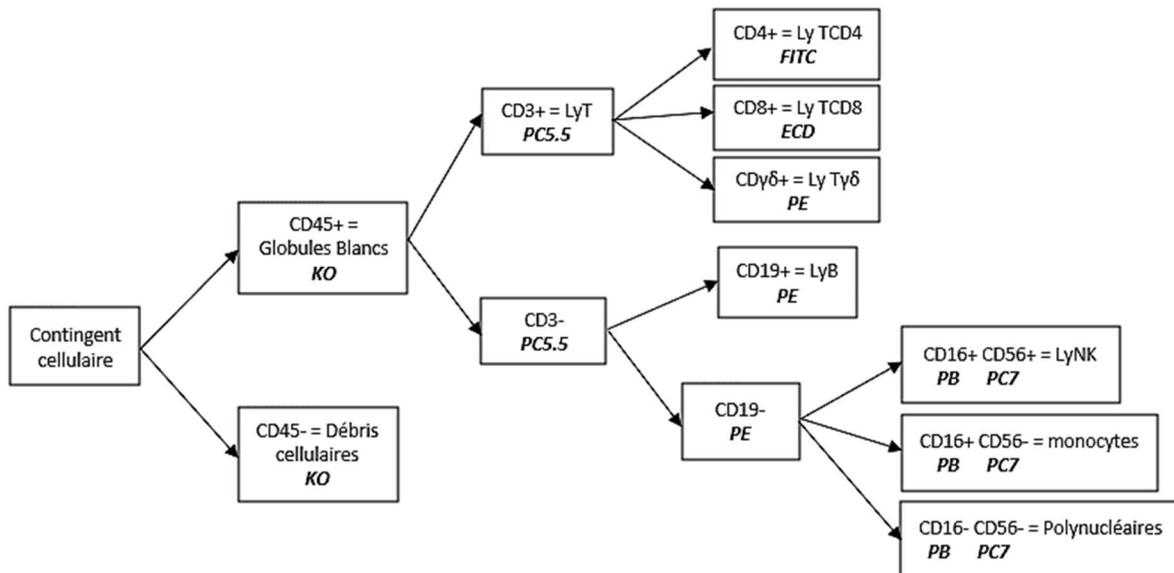


Figure 18 : Arbre décisionnel pour le panel n°1

- Panel n°2 : Analyse des différents phénotypes lymphocytaires TCD4 et TCD8 et de l'expression de PD-1 et de CTLA-4 sur les différentes populations lymphocytaires T (Tableau 3 ; Figure 19)

Tableau 3 : Panel n°2 : Analyse des sous-populations lymphocytaires T et de l'expression de PD-1 et de CTLA-4 sur les LyT

Antigène	Fluorochrome	Clone	Compagnie	Référence
CD3	PerCp-Cy5.5	UCHT1	Biolegend	300430
CD4	PE-Cy7	SK3	BD	557852
CD8	APC-H7	SK1	BD	560179
PD-1 (CD279)	PE	EH12.2H7	Biolegend	329906
CTLA-4 (CD152)	BV421	BNI3	BD	562743
CD25	PE-CF594	M-A251	BD	562403
CD127	APC	IL-7R $\alpha$	Biolegend	351316
CD45 RO	BB515	UCHL1	BD	564529
CCR7 (CD197)	BV510	3D12	BD	563449

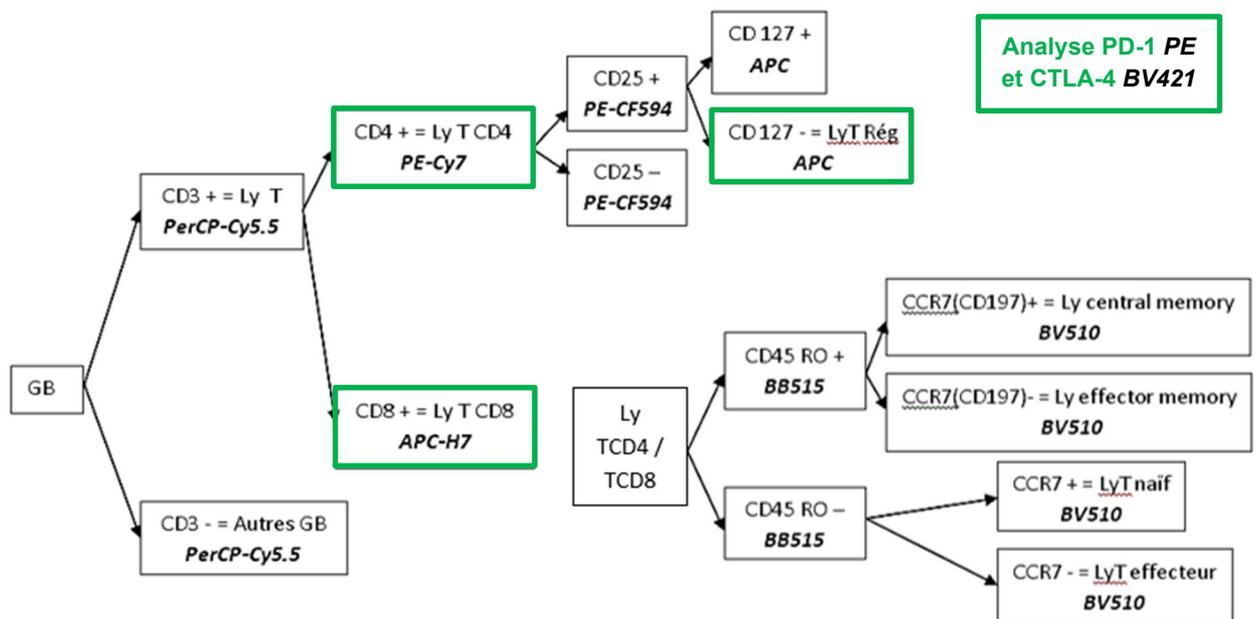


Figure 19 : Arbre décisionnel pour le panel n°2

- Panel n°3 : Analyse de l'expression de mHLA-DR sur les monocytes (Tableau 4)

Tableau 4 : Panel n°3 : Analyse de l'expression de l'HLA-DR sur les monocytes

Antigène	Fluorochrome	Clone	Compagnie	Référence
HLA-DR	PE	L243	BD	340827
CD14	PerCP-Cy5.5	MΦP9	BD	

- Panel n°4 : Analyse des différentes populations myéloïdes et lymphocytaire B et de l'expression de PD-L1 (Tableau 5 ; Figure 20)

Tableau 5 : Panel n°4 : Analyse des populations granulocytaires et de l'expression de PD-L1

Antigène	Fluorochrome	Clone	Compagnie	Référence
CD10	PC5.5	ALB1	Beckman Coulter	B16490
CD16	BV450	3G8	BD	561246
PD-L1	APC	29E.2A3	Biologend	329708
CD14	PE-CF594	MΦP9	BD	562334
HLA-DR	PE	L243	BD	347401
CD19	APC-AF700	HIB19	BD	557921
CD45	AmCyan	2D1	BD	339192
CD11b	APC-Cy7	ICRF44	BD	557754
Lin (CD3, CD56, CD123)	FITC		BD	643397

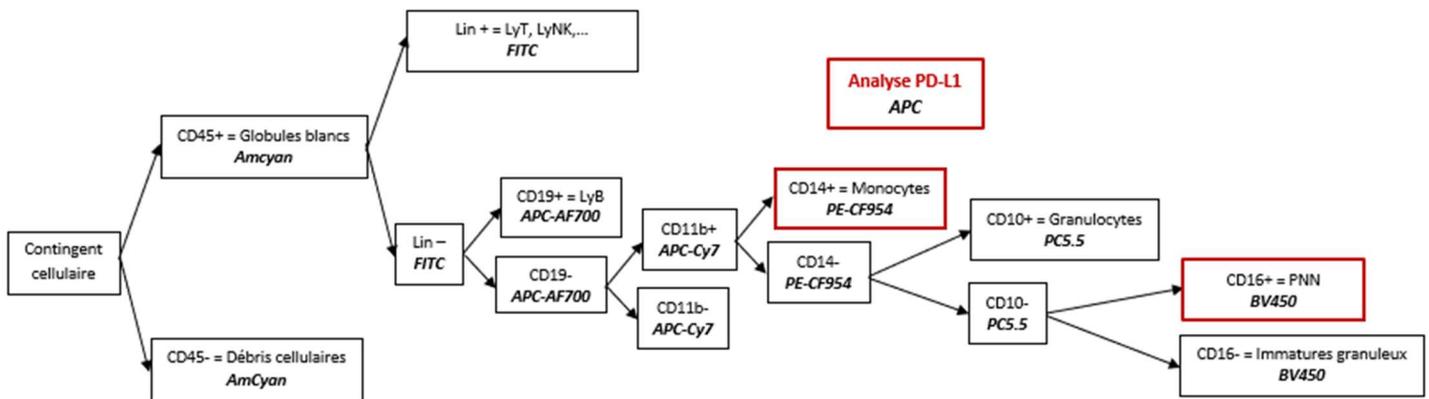


Figure 20 : Arbre décisionnel pour le panel n°4

Une fois les échantillons passés dans le cytomètre, l'analyse des données des sous-populations de cellules a été réalisée à l'aide du logiciel Kaluza (Beckman Coulter). Les différentes populations lymphocytaires et myéloïdes ont été mises en évidence en fonction de l'expression des marqueurs de surfaces spécifiques étudiés. Les résultats de chaque marquage ont pu être rendus sous 3-4 heures après l'obtention de l'échantillon sanguin.

### III.3. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées à partir des Logiciel GraphPad Prism. Comme nous travaillons sur un nombre d'échantillon indépendant de petite taille, nous avons utilisés un test non paramétrique de Mann-Whitney d'ANOVA (test de Kruskall-Wallis) avec les témoins ou pendant le séjour en soins intensifs. Nous avons considéré nos résultats avec un  $p < 0.05$  comme étant statistiquement significatifs.

## IV. Caractéristiques clinico-biologiques de la population étudiée

Les caractéristiques cliniques et biologiques de la population étudiée est répertorié dans le tableau ci-dessous.

Tableau 6 : Caractéristiques clinico-biologiques de la population étudiée

Critère		Population étudiée (n = 13)
Age		72 [64-76]
Sexe	Male	8 (62%)
	Femelle	5 (38%)
BMI	Moyenne	26.4 [24.2 – 32]
	BMI > 30 kg m <sup>-2</sup> , n (%)	5 (38%)
SAPS II		31 [27 – 35]
Comorbidités, n (%)	Diabètes	3 (23)
	Hypertension	5 (38)
	Pathologies respiratoires chroniques	2 (15)
	Pathologies cardiaques chroniques	1 (8)
	Affection rénale chronique	1 (8)
	Immunosuppression	1 (8)
Jours entre l'apparition de la maladie et l'admission à l'hôpital		7 [5 – 8]
Jours entre l'apparition de la maladie et l'admission en ICU		9 [6 – 12]
RT-PCR Covid positive à l'admission en ICU, n (%)		13 (100)
Bilan biologique à l'admission	PaO <sub>2</sub> (mmHg)/FiO <sub>2</sub>	122 [81-155]
	Lactate, mmol/l	1.21 [0.93 – 1.31]
	Créatinine, mmol/l	65 [53 -93]
	Bilirubine, µmol/l	6.9 [4.6 – 12.25]
	Plaquettes, G/L	228 [184 - 277]
Ventilation mécanique, n(%)		10 (77)
Sévère ARDS at admission, n (%)		2 (15)
Sévère ARDS at J7, n (%)		8 (80)
Patient avec infection secondaire suspecté avant J7, n (%)		4 (40)
Patient avec une infection secondaire suspecté pendant le séjour aux soins intensifs, n (%)		7 (70)
Décès à J7, n		0
Décès à la sortie de l'unité de soins intensifs		1

## V. Résultats

---

### V.1. Etude de la lymphocytose globale et des sous-populations lymphocytaires

Pour rappel, pour chaque étude, et en parallèle du groupe contrôle, nous avons analysé le groupe de patients atteints du SARS-Cov-2 admis en service de réanimation de l'admission J0, à J2-3, à J4-5 et à J6-7. Les résultats donnés représenteront la moyenne des échantillons avec leur intervalle de confiance.

Tout d'abord, nous avons étudié la population lymphocytaire dans sa globalité. Ces valeurs ont été récupérées à partir de l'automate Sysmex utilisé en routine au Laboratoire d'Hématologie Biologique du CHU de Limoges. Ensuite, nous avons étudié par CMF les différentes sous populations lymphocytaires, c'est-à-dire les LyB, LyT et LyNK, ainsi que les marqueurs CD19 pour les LyB, CD3 pour les LyT, CD56 et CD16 pour les LyNK. Et en ce qui concerne la population lymphocytaire T, nous nous sommes aussi intéressés aux taux de Ly TCD4 et de Ly TCD8. Enfin, la caractérisation des populations en G/L a été réalisée à partir du taux de Ly totaux.

Dans la population étudiée, le nombre absolu médian de lymphocytes totaux a été considérablement réduit à 0,72 G/L [0,65–0,88] à J0 par rapport au groupe contrôle qui est de 2,24 G/L [1,72-2,76] ( $p$ -value < 0,0001) et cette diminution persiste pendant la semaine d'hospitalisation (Figure 21A). Si nous analysons les différentes sous-populations lymphocytaires, nous remarquons aussi une baisse des lymphocytes T, NK et B à J0. Celles-ci persistent pendant la semaine suivant l'admission au service de soins intensifs de réanimation. En ce qui concerne les LyB et les LyNK, nous avons à J0 un taux à 0,15 G/L [0,04-0,25] pour les LyB (Figure 21D ;  $p$ -value = 0,007) et un taux à 0,12 G/L [0,04-0,21] pour les LyNK (Figure 21C ;  $p$ -value = 0,0058). Cependant la lymphopénie T est plus marquée que pour les autres populations lymphocytaires avec un taux de LyT à 0,48 G/L [0,24-0,72] à J0 versus 1,55 G/L [1,18-1,91] pour le groupe contrôle (Figure 21B ;  $p$ -value < 0,0001). Et enfin, si nous analysons les sous-populations lymphocytaires T, c'est-à-dire les Ly TCD4 et TCD8, à J0, nous avons un taux à 0,29 G/L [0,19–0,43] pour les Ly TCD4 et à 0,08 G/L [0,05–0,1] pour les Ly TCD8, qui sont tout deux en baisse en comparaison du groupe contrôle, qui est de 1,00 G/L [0,74-1,26] pour les Ly TCD4 ( $p$ -value = 0,0004) et de 0,49 G/L [0,36-0,63] pour les Ly TCD8 ( $p$ -value = 0,0001) (Figure 21E et 21F). Donc, quel que soit le type de sous-population nous retrouvons, une lymphopénie à l'admission en service de réanimation qui perdure pendant une semaine.

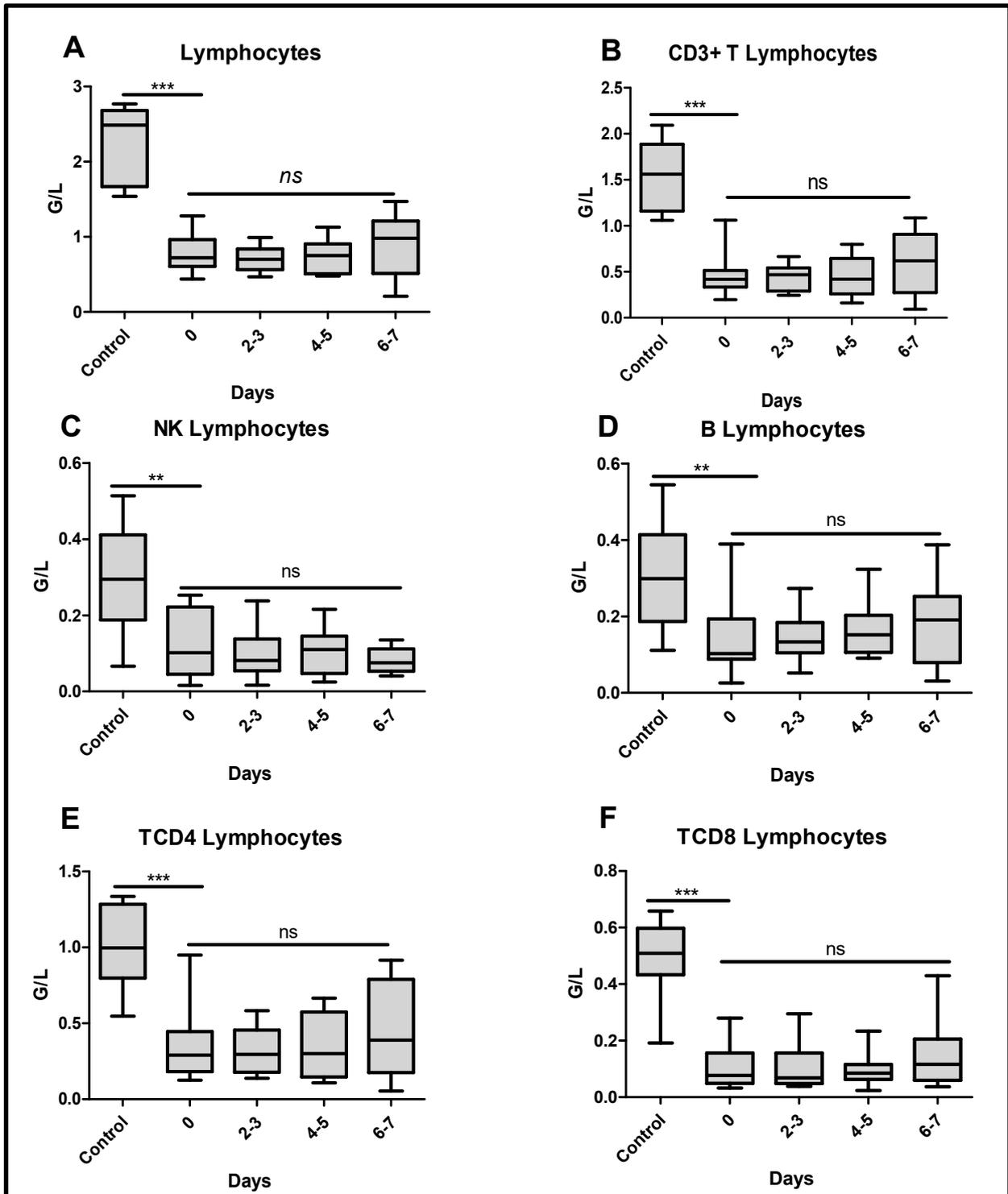


Figure 21 : Analyse par box-plot des populations lymphocytaires au cours de la première semaine en service de réanimation par CMF.

Les box-plot représentent les résultats du groupe contrôle et des patients donnent la médiane avec le premier et le troisième quartile. Les moustaches représentent les valeurs minimales et maximales. Les lignes entre crochets et les lignes pleines indiquent une comparaison de Mann-Whitney et d'ANOVA (test de Kruskal-Wallis) entre les contrôles et les patients en soins intensifs, respectivement. Les valeurs p du test sont représentées par \*, \*\* et \*\*\* pour  $p \leq 0,05$ ,  $p \leq 0,01$  et  $p \leq 0,001$  respectivement. Nombre absolu de Ly totaux (A), de LyT CD3+ (B), de LyNK (C), de LyB (D), de LyT CD4 (E) et de Ly TCD8 (F).

## **V.2. Etude des différents phénotypes lymphocytaires TCD4 et TCD8**

En ce qui concerne les phénotypes lymphocytaires TCD4 et TCD8, nous avons étudiés, par CMF, 4 phénotypes en fonction de divers marqueurs, dont CD45 RO et CCR7, à partir des données que nous avons en Figure 21 pour les taux de Ly TCD4 et de Ly TCD8. Tout d'abord, nous avons les Ly naïfs qui sont CD45RO - et CCR7 +. Ensuite, nous avons les Ly effecteurs qui sont CD45RO- et CCR7-. Puis, les Ly mémoires ont été étudiés ainsi que les Ly Central Memory qui sont CD45RO+ et CCR7+, et les Ly Effector Memory qui sont CD45RO+ et CCR7-

### **V.2.1. Phénotypes lymphocytaires TCD4**

Les résultats montrent que pour les Ly TCD4, nous avons à J0, un taux de Ly TCD4 effecteur à 2,28% [1,42-3,14] qui reste stable au cours du temps. Par comparaison au groupe contrôle, où nous avons un taux à 5,69% [4,07-7,31] de Ly TCD4 effecteur, nous avons donc une baisse du taux de Ly TCD4 effecteur pour les patients ( $p\text{-value} < 0,0001$ ) (Figure 22B). Tandis que pour les autres phénotypes lymphocytaires, que ce soit les Ly TCD4 naïfs et mémoires, nous ne constatons pas de différence significative par rapport au groupe contrôle et au cours du temps (Figure 22A, 22C et 22D).

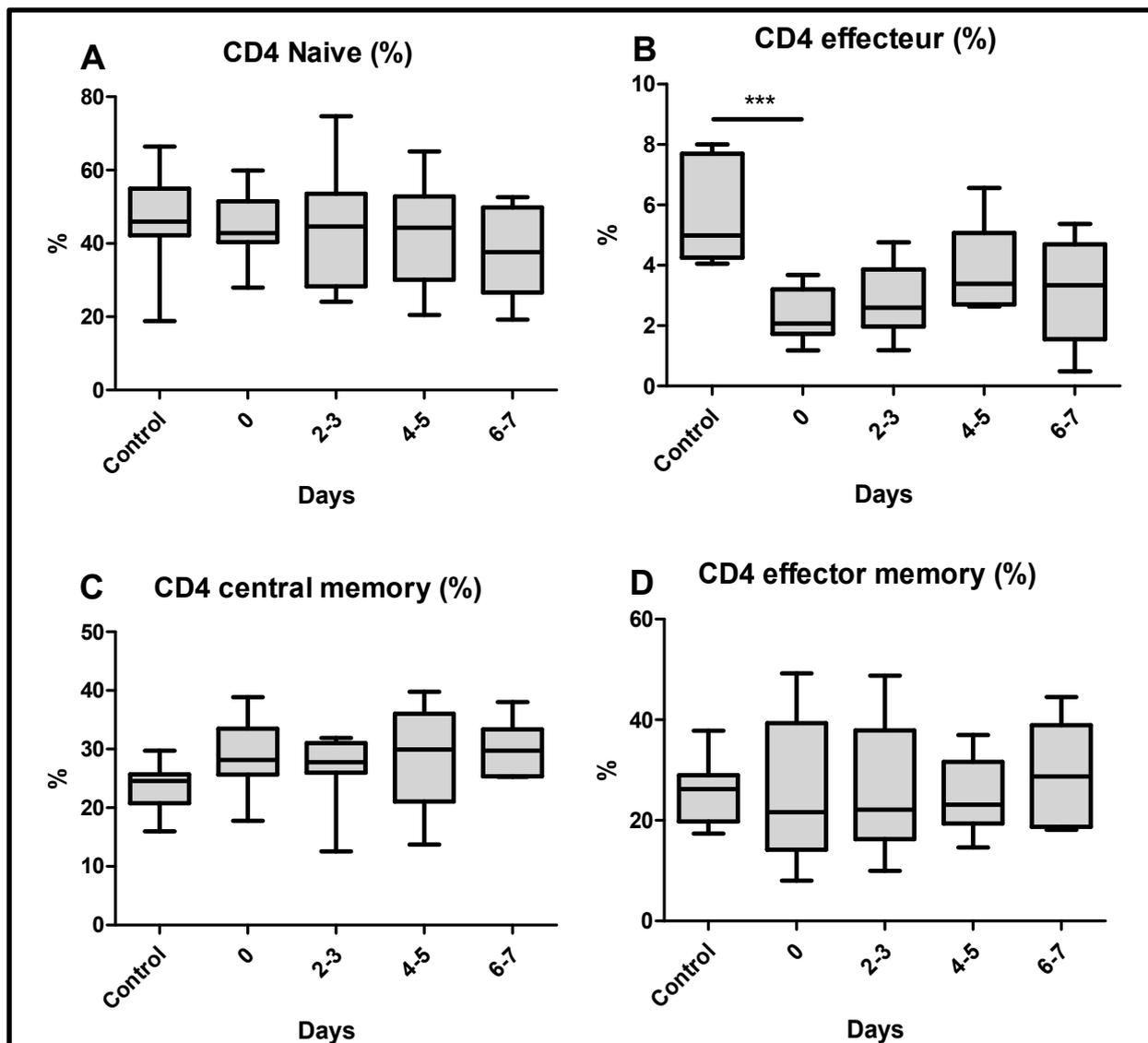


Figure 22 : Analyse par box-plot des sous-populations lymphocytaires TCD4 au cours de la première semaine de réanimation par CMF.

Les box-plot représentent les résultats du groupe contrôle et des patients donnant la médiane avec le premier et le troisième quartile. Les moustaches représentent les valeurs minimales et maximales. Les lignes entre crochets et les lignes pleines indiquent une comparaison de Mann-Whitney et d'ANOVA (test de Kruskal-Wallis) entre les contrôles et les patients en soins intensifs, respectivement. Les valeurs p du test sont représentées par \*, \*\* et \*\*\* pour  $p \leq 0,05$ ,  $p \leq 0,01$  et  $p \leq 0,001$  respectivement. Taux de LyT CD4 naïve (A), effecteur (B), central memory (C) et effector memory (D).

De plus, nous avons aussi étudié une sous-population de Ly TCD4, les LyT régulateurs qui sont des Ly nécessaire au maintien de la tolérance immunitaire participant au maintien de l'homéostasie cellulaire et exprimant à leur surface, le marqueur CD25 mais pas le CD127, ce qui nous a permis de les identifier par la suite en CMF.

L'analyse des Ly Tregs, nous montre une augmentation progressive de leur taux au cours du temps pour les patients passant de 8,41% [4,49-12,33] à J0 jusqu'à 10,38% [8,93-11,84] ( $p$ -value = 0,5288) à J4-5 ( $p$ -value = 0,0047) par comparaison au groupe contrôle, où le taux est de 7,23% [4,99-9,47] (Figure 23).

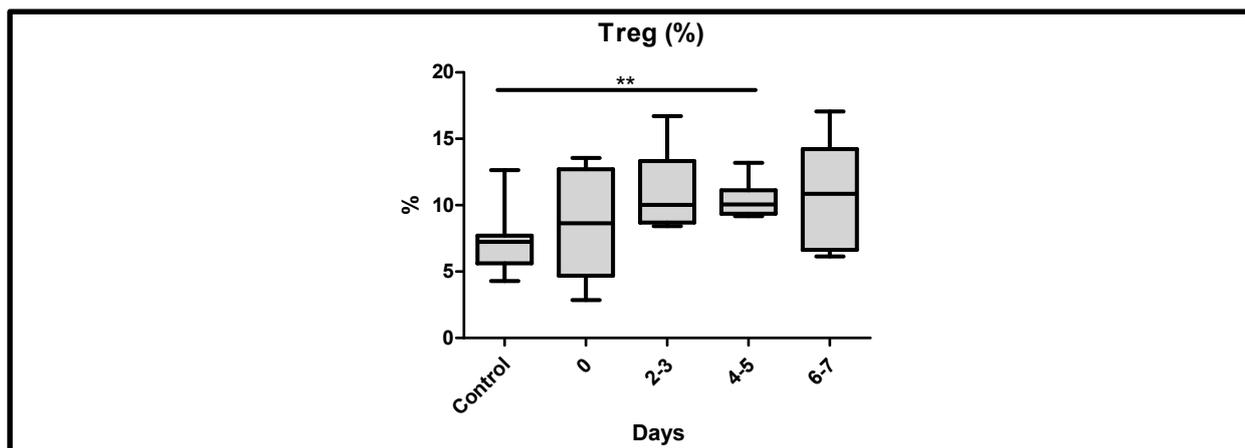


Figure 23 : Analyse par box-plot de la population Ly Treg au cours de la première semaine de réanimation par CMF.

Les box-plot représentent les résultats du groupe contrôle et des patients donnent la médiane avec le premier et le troisième quartile. Les moustaches représentent les valeurs minimales et maximales. Les lignes entre crochets et les lignes pleines indiquent une comparaison de Mann-Whitney et d'ANOVA (test de Kruskal-Wallis) entre les contrôles et les patients en soins intensifs, respectivement. Les valeurs p du test sont représentées par \*, \*\* et \*\*\* pour  $p \leq 0,05$ ,  $p \leq 0,01$  et  $p \leq 0,001$  respectivement. Taux de lymphocytes Tregs.

## V.2.2. Phénotypes lymphocytaires TCD8

Concernant les sous-populations lymphocytaires TCD8, pour les Ly TCD8 naïfs, nous avons pour le contrôle un taux à 34,06% [19,16-49,26] et pour les patients un taux à 18,29% [9,31-27,27] à J0 restant stable pendant une semaine. Nous constatons donc une diminution significative avec une  $p\text{-value} = 0,0355$  (Figure 24A). Pour les LyT CD8 effector memory, nous avons un taux à 47,36% [28,69-66,04] pour les patients à J0 et à 28,91% [24,05-33,78] pour le groupe contrôle. Ces résultats montrent une augmentation significative pour les patients par rapport au groupe contrôle ( $p\text{-value} = 0,0002$ ). Au cours du temps ce taux a une tendance non significative à augmenter (Figure 24D). Enfin, les Ly TCD8 effecteur et central memory ne varient pas par rapport au groupe contrôle ni au cours du temps (Figure 24B et 24C).

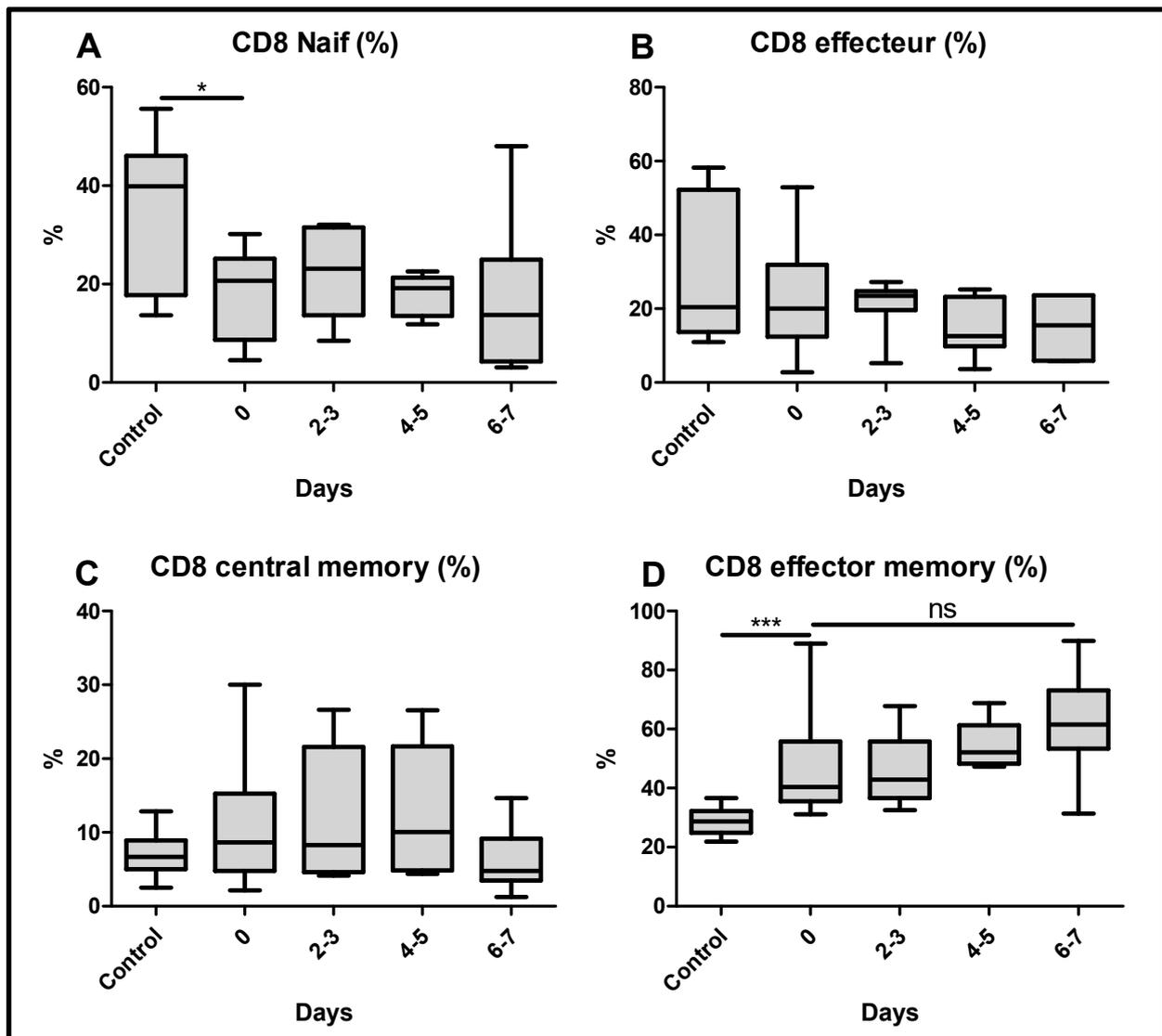


Figure 24 : Analyse par box-plot des sous-populations lymphocytaires TCD8 au cours de la première semaine de réanimation par CMF.

Les box-plot représentent les résultats du groupe contrôle et des patients donnent la médiane avec le premier et le troisième quartile. Les moustaches représentent les valeurs minimales et maximales. Les lignes entre crochets et les lignes pleines indiquent une comparaison de Mann-Whitney et d'ANOVA (test de Kruskal-Wallis) entre les contrôles et les patients en soins intensifs, respectivement. Les valeurs p du test sont représentées par \*, \*\* et \*\*\* pour  $p \leq 0,05$ ,  $p \leq 0,01$  et  $p \leq 0,001$  respectivement. Taux de LyT CD8 naïve (A), effecteur (B), central memory (C) et effecteur memory (D).

### V.3. Etude de l'expression de PD-1 et de CTLA-4 pour les différents phénotypes lymphocytaires

En parallèle de la lymphocytose, nous avons étudié l'expression des points de contrôle immunitaire inhibiteurs, tels que PD-1 et CTLA-4, exprimés principalement par les LyT. Dans un premier temps, l'expression de ces différents points de contrôle immunitaire a été étudiée par CMF pour les populations lymphocytaires T CD4 et T CD8, puis pour la population lymphocytaire Treg, spécifique des Ly TCD4.

Après analyse des résultats de CMF, pour les patients, nous constatons que durant les 3 premiers jours d'hospitalisation, une proportion faible de Ly TCD4 expriment CTLA-4 passant de 7,41% [3,86-10,97] à J0 à 8,31% [5,02-11,59] à J2-3 versus 4,34% [1,40-7,28] pour le groupe contrôle (Figure 25A), qui est plus faible que les patients ( $p$ -value = 0,0433). Tandis que pour PD-1, nous avons une expression à J0 similaire au groupe contrôle puis qui augmente progressivement jusqu'au 7ème jour pour atteindre un taux de 36,77% [23,41-50,14] ( $p$ -value = 0,011) (Figure 25B).

Concernant les Ly TCD8, l'expression de PD-1 est de 30,46% [19,51-41,40] pour le groupe contrôle, et de 54,31% [36,81-71,81] pour les patients à J0. En conséquence, nous avons une augmentation significative de l'expression de PD-1 pour les patients à J0 en comparaison du groupe contrôle ( $p$ -value = 0,0011), et stable pour les patients de J0 à J7 (Figure 25C). Alors que l'expression de CTLA-4 ne varie pas par rapport au groupe contrôle (Figure 25D).

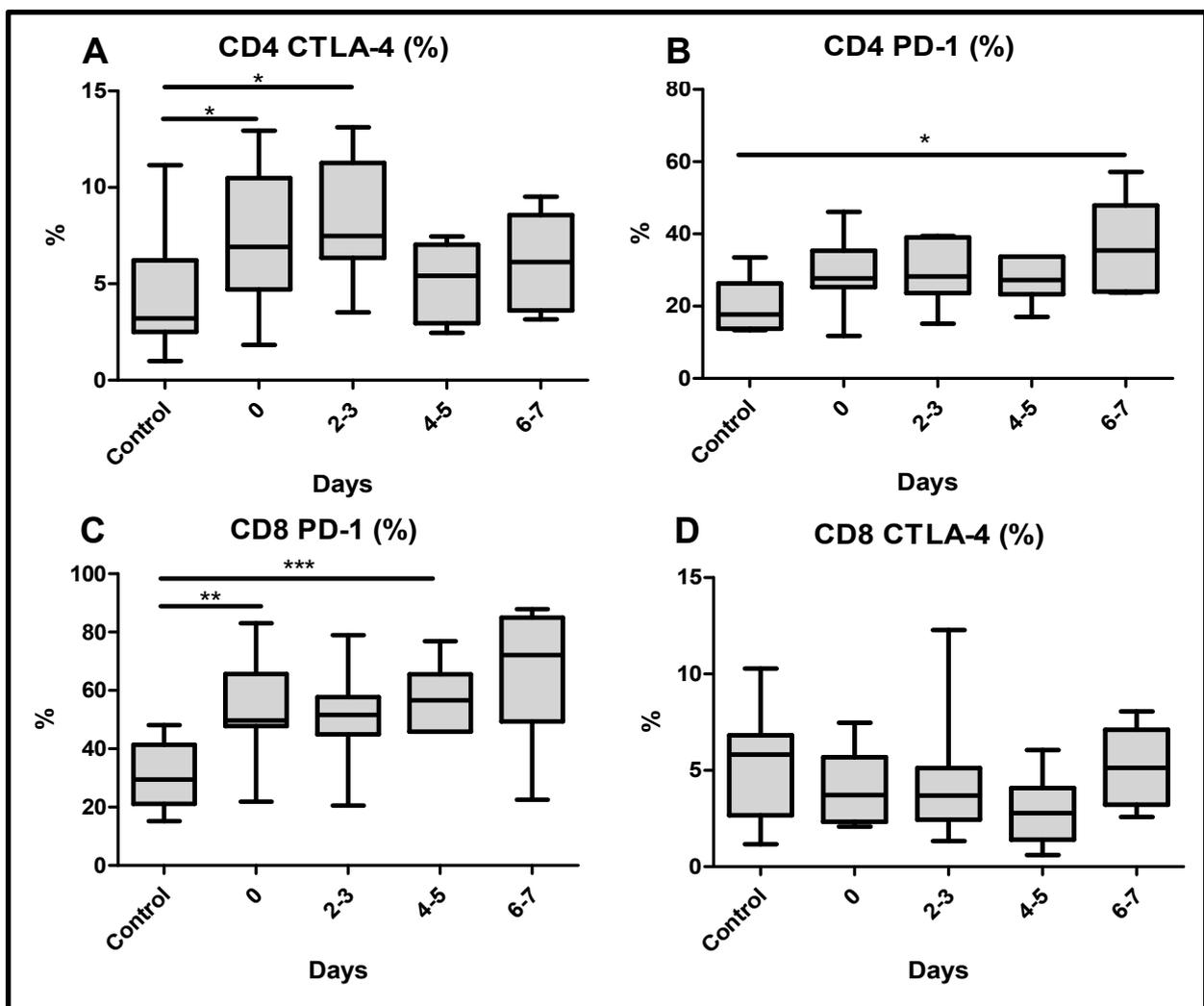


Figure 25 : Analyse par box-plot de l'expression des points de contrôles immunitaires au cours de la première semaine de réanimation par CMF.

Les box-plot représentent les résultats du groupe contrôle et des patients donnent la médiane avec le premier et le troisième quartile. Les moustaches représentent les valeurs minimales et maximales. Les lignes entre crochets et les lignes pleines indiquent une comparaison de Mann-Whitney et d'ANOVA (test de Kruskal-Wallis) entre les contrôles et les patients en soins intensifs, respectivement. Les valeurs p du test sont représentées par \*, \*\* et \*\*\* pour  $p \leq 0,05$ ,  $p \leq 0,01$  et  $p \leq 0,001$  respectivement. Taux d'expression de CTLA-4 et de PD-1 par les Ly TCD4 (A et B), et par les LyTCD8 (C et D).

Nous avons aussi étudié l'expression de CTLA-4 et PD-1 par les Ly Treg. En ce qui concerne cette population, un faible pourcentage de ces Ly exprime CTLA-4 à J0 avec un taux à 5,05% [3,02-7,08], persistant pendant une semaine, alors que les Ly Treg du groupe contrôle n'expriment quasiment pas CTLA-4 (2,44% [0,88-3,99]). Nous obtenons donc une augmentation significative de l'expression de CTLA-4 par rapport au groupe contrôle ( $p$ -value = 0,0052) (Figure 26A). Concernant PD-1, le taux d'expression augmente de façon stable et durable jusqu'à J7 passant de 46,23% [37,19-55,27] à 53,89% [43,64-64,13]. Par comparaison au groupe contrôle où nous avons un taux à 25,41% [16,47-34,34], l'expression de PD-1 est en forte hausse pour les patients avec une  $p$ -value = 0,0002 (Figure 26B).

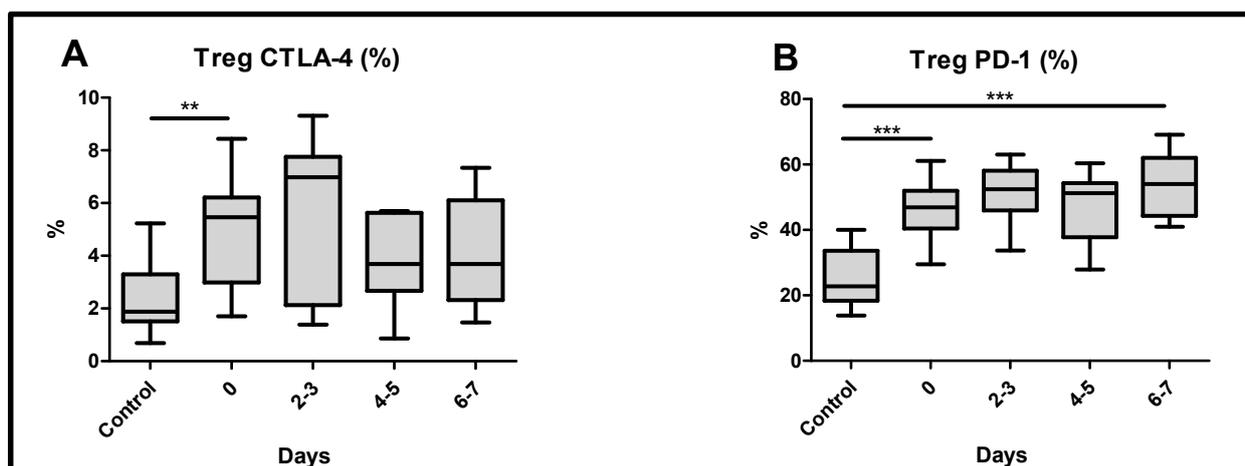


Figure 26 : Analyse par box-plot de l'expression des points de contrôles immunitaires PD-1 et CTLA-4 par les Ly Treg au cours de la première semaine dans le service de réanimation par CMF.

Les box-plot représentent les résultats du groupe contrôle et des patients donnent la médiane avec le premier et le troisième quartile. Les moustaches représentent les valeurs minimales et maximales. Les lignes entre crochets et les lignes pleines indiquent une comparaison de Mann-Whitney et d'ANOVA (test de Kruskal-Wallis) entre les contrôles et les patients en soins intensifs, respectivement. Les valeurs p du test sont représentées par \*, \*\* et \*\*\* pour  $p \leq 0,05$ ,  $p \leq 0,01$  et  $p \leq 0,001$  respectivement. Nombre absolu de lymphocytes Tregs (A) et taux d'expression par les Treg de CTLA-4 (B) et de PD-1 (C).

#### V.4. Analyse de la production cytokinique par les Ly TCD4 et les Ly TCD8

Nous savons que PD-1 peut servir soit de marqueur d'épuisement soit de marqueur d'activation, mais que c'est aussi un inducteur d'apoptose des Ly TCD8 lorsqu'il est activé. Lorsque les LyT sont activés, ils produisent, entre autres, des cytokines pro-inflammatoires. Par conséquent, une évaluation fonctionnelle des LyT par la production de cytokines a été réalisée au sein de l'équipe INSERM U1262/CNRS 7276, chez trois patients et des témoins à des fins de contrôle. L'utilisation d'un kit DurActive 1 (kit de stimulation) et d'un kit DuraClone IF T (kit d'activation des LyT) ont été nécessaires pour la réalisation de ces mesures.

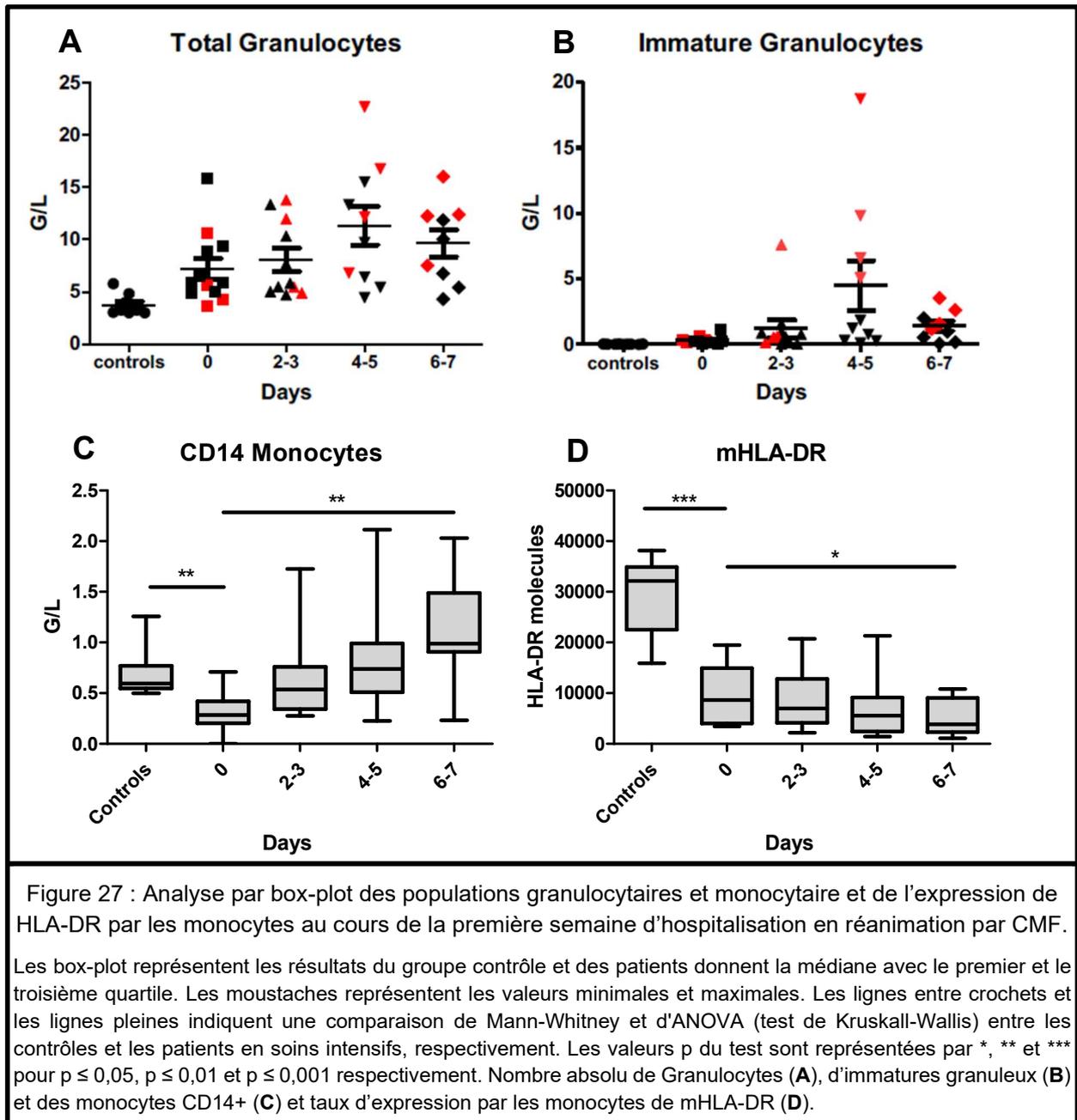
Nous constatons que la production de TNF- $\alpha$  et d'IL-2 demeure normale, alors que la production d'IFN- $\gamma$  par les Ly TCD4 diminue (Figure supplémentaire 1). En revanche, les Ly TCD8 produisent des niveaux plus importants d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$  (Figure supplémentaire 2). De plus, les taux circulants d'IL-6 et d'IL-8 ont augmenté de manière modérée mais significative et durable au fil du temps (Figure supplémentaire 3A et 3B).

## V.5. Etude des populations granulocytaires et monocytaires

En ce qui concerne les différentes populations non lymphocytaires, nous nous sommes intéressés aux taux de granulocytes totaux, d'immatures granuleux et de monocytes au cours de la 1<sup>ère</sup> semaine d'hospitalisation. Ces différentes populations interviennent dans la réponse immunitaire innée lors d'une infection virale par différents mécanismes. Nous les avons identifiés par CMF grâce aux marqueurs CD10 et CD16 pour les granuleux étant donné que les PNN sont CD10+ et CD16+, tandis que les immatures granuleux sont CD10+ et CD16-. Les monocytes ont été identifiés grâce aux marqueurs CD14 et CD11b tous deux exprimés par les monocytes.

Nos résultats, sur l'étude des différentes populations granuleuses, montrent que les granuleux totaux et les immatures granuleux ont une tendance non significative à augmenter avec une régression transitoire des immatures granuleux pour 4 patients à J4-5 (points rouge sur la figure) (Figure 27A et 27B). Lorsque l'on s'intéresse aux monocytes nous pouvons constater que, pour les patients, le taux de monocytes est de 0,69 G/L [0,45-0,93] à J0, légèrement diminué par rapport au groupe contrôle qui est de 0,31 G/L [0,11-0,51] (*p-value* = 0,0021). Ensuite, le taux de monocytes a tendance à augmenter au cours du temps jusqu'à atteindre un taux à 1,10 G/L [0,57-1,63] à J6-7, significativement plus élevé par rapport au groupe contrôle (*p-value* = 0,036 ; Figure 27C).

De plus, l'équipe INSERM U1262/CNRS 7276 a étudié l'expression d'HLA-DR par les monocytes, car HLA-DR est un marqueur exprimé à la surface de nombreuses cellules et a pour rôle de fixer l'Ag du « non-soi » et de le présenter aux CPA. Dans notre cas, nous avons mis en évidence que l'expression d'HLA-DR par les monocytes est fortement régulée à la baisse d'un facteur trois à J0 avec un taux à 9.698 molécules mHLA-DR [4.178-15.219] par rapport au groupe contrôle où nous avons un taux de 29.251 molécules mHLA-DR [21.785-36.718] (*p-value* = 0,0001), et cela persiste de façon importante pendant une semaine (Figure 27D). Cette diminution peut s'expliquer par l'altération de la présentation de l'antigène aux cellules immunitaires.



## V.6. Etude de l'expression de PD-L1 par les PNN et les monocytes

En parallèle de l'étude du taux de PNN et de monocytes, nous avons étudié l'expression de PD-L1 sur ces derniers. En ce qui concerne les monocytes, nous observons que le pourcentage d'expression de PD-L1 par le groupe contrôle est de 14,12% [5,45-22,78], alors que pour les patients à J2-3, le taux est de 42,16% [16,12-68,19]. Donc, nous constatons une augmentation significative de l'expression de PD-L1 surtout à J2-3 par rapport aux témoins, ( $p$ -value = 0,0336 ; Figure 28A). Cependant, pour les PNN, nous n'avons pas d'augmentation significative mais une tendance à une hausse de l'expression de PD-L1 au cours de la 1ère semaine d'hospitalisation en réanimation allant de 2,12% [0,93-3,31] à J0 jusqu'à 4,76% [3,81-5,72] à J7 (Figure 28B).

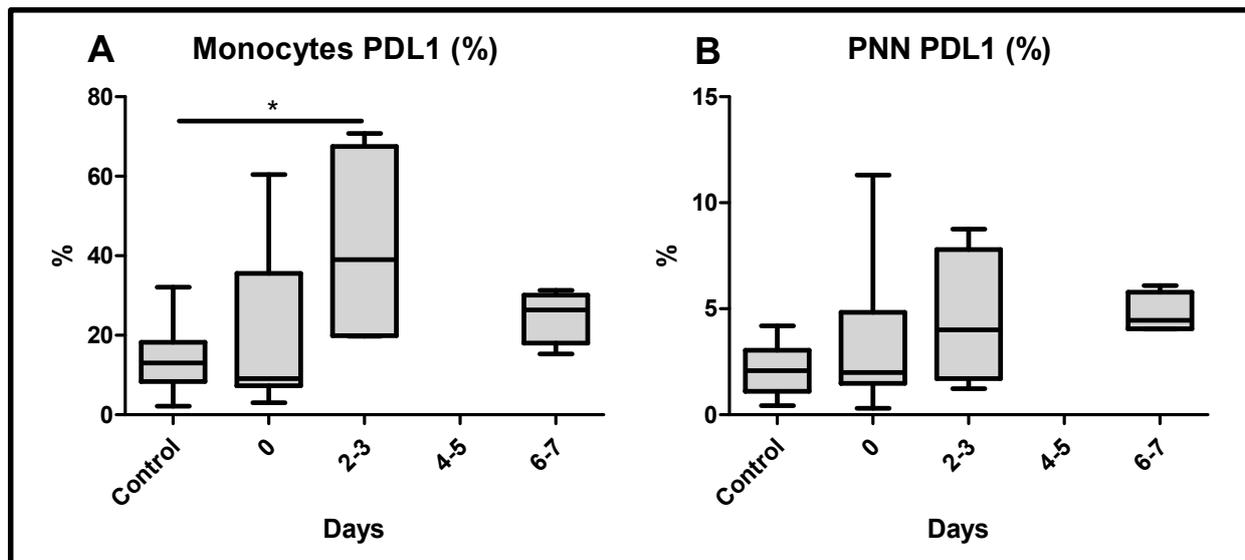


Figure 28 : Analyse par box-plot de l'expression de PD-L1 par les PNN et les monocytes au cours de la première semaine d'hospitalisation en réanimation par CMF.

Les box-plot représentent les résultats du groupe contrôle et des patients donnent la médiane avec le premier et le troisième quartile. Les moustaches représentent les valeurs minimales et maximales. Les lignes entre crochets et les lignes pleines indiquent une comparaison de Mann-Whitney et d'ANOVA (test de Kruskal-Wallis) entre les contrôles et les patients en soins intensifs, respectivement. Les valeurs p du test sont représentées par \*, \*\* et \*\*\* pour  $p \leq 0,05$ ,  $p \leq 0,01$  et  $p \leq 0,001$  respectivement. Taux d'expression de PD-L1 par les monocytes (A) et par les PNN (B).

## VI. Discussion

---

En mars 2020, nous n'étions qu'au début de la pandémie SARS-Cov-2. Peu d'informations sur ce virus étaient accessibles. Nous présentons ici l'une des premières études évaluant le statut immunitaire des patients atteints de formes sévères au SARS-Cov-2, confirmés par un test de dépistage au laboratoire et admis en unités de réanimation. Durant cette période, la connaissance des différents paramètres physiopathologiques, notamment des indicateurs immunologiques dont PD-1, PD-L1 et CTLA-4 était insuffisante pour la compréhension des mécanismes immuno-pathologiques impliqués. Aujourd'hui, de nombreuses études ont pu confirmer et détailler ces différents mécanismes lors d'une infection au SARS-Cov-2.

### VI.1. Une cohorte représentative de la population

Conformément aux autres études, au niveau épidémiologique, la présente étude a montré qu'une prédominance masculine dans l'incidence des formes sévères du SARS-Cov-2 est mise en évidence avec un sex ratio H/F à 1,6, indiquant que les hommes sont plus sensibles à l'infection par le SARS-CoV-2 que les femmes. De plus, les hommes plus âgés (> 50 ans), en particulier ceux qui présentent des comorbidités associées (diabète, hypertension, insuffisance respiratoire...), semblent aussi être le plus susceptibles de développer une forme sévère au SARS-Cov-2. Cela est retrouvé dans la population générale. Les manifestations cliniques les plus courantes au début de la maladie étaient la fièvre, la toux, la fatigue et la myalgie. Les cas graves présentaient plus fréquemment une dyspnée et ont développé par la suite un SDRA nécessitant une ventilation mécanique pour 77% des patients. En termes de résultats biologiques, nous obtenons à l'admission en réanimation, un PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> diminué à 122 confirmant une altération très sévère des échanges gazeux, et signe d'un SDRA.

### VI.2. Une immunosuppression sévère chez les patients admis en réanimation

Dans notre étude, nous avons noté que l'infection sévère par le SARS-CoV-2 entraîne une réduction significative et persistante des Ly circulants à 0,72 G/L au cours de la première semaine d'hospitalisation en service de réanimation. Il en est de même pour les sous-populations lymphocytaires que ce soit les LyT, LyB et LyNK, contrairement aux formes moins sévères où la lymphopénie est quasi absente (Vardhana SA et al., 2020). Cependant, comme vu précédemment, la diminution des LyB et LyNK reste moins importante que la lymphopénie T qui elle est sévère chez ces patients. Une lymphopénie des sous-population lymphocytaires T, que ce soit les Ly TCD4 ou les Ly TCD8 a aussi été observée. Cette infection induit donc une immunosuppression sévère et globale que nous retrouvons dans d'autres infections virales chroniques telles que le VIH (Parsa N et al., 2020). Au niveau fonctionnel, les Ly TCD4 sont connus pour jouer un rôle central dans la régulation des réponses immunitaires, en orchestrant la suppression et l'amplification des cellules immunitaires, notamment des Ly TCD8. Ces LyT CD4 facilitent la production d'anticorps spécifiques du virus via l'activation T-dépendante des LyB (Xu X et al., 2004). Ceci peut expliquer que dans notre étude, nous avons, outre un lien avec la lymphopénie sévère des Ly TCD4, une réponse tardive du système immunitaire face à une infection au SARS-Cov-2, comme dans le cas du VIH (Parsa N et al., 2020). Il serait intéressant de mieux comprendre les facteurs affectant les Ly, en particulier le taux de LyT, et leur association avec la gravité de la maladie chez ces patients infectés par le SARS-CoV-2. Pour appuyer nos résultats, une étude ultérieure sur le SARS-CoV-2 a démontré que la déplétion des LyT au moment de l'infection n'affecte pas la réplication ou la clairance virale (Nomura T et al., 2021). L'étude de Chen G et al. (2020) a démontré que la

déplétion des LyT entraîne une pneumonie interstitielle à médiation immunitaire accrue et un retard dans la clairance du SARS-Cov-2 dans les poumons, ce qui démontre le rôle vital des LyT dans l'infection primaire du SARS-CoV-2. De plus, les proportions de LyT sont fortement impactées avec une chute très sévère. Il est rapporté pour d'autres infections que les mécanismes homéostatiques périphériques sont cruciaux dans le contrôle des LyT et, de façon concomitante, dans le maintien de la tolérance immunitaire chez les individus sains, ce qui peut expliquer en partie l'origine des conséquences néfastes et contribuer au développement des formes sévères au SARS-Cov-2, qui a fait l'objet d'une étude (Wang H et al., 2021). La question de savoir si les proportions modifiées de LyT observées dans cette étude expliquent la gravité du SARS-Cov-2, ou si elles sont corrélées à la virémie mérite d'être approfondi. Pour les LyNK, l'étude Bao C et al. (2021) a démontré que la diminution de ces cellules est corrélée à un taux de survie plus faible et à une durée d'excrétion du virus plus longue. Et pour les LyB, l'étude de Sosa-Hernández VA et al. (2020) a mis en évidence que la gravité du SARS-Cov-2 s'accompagne de perturbations dans les sous-populations B, et qu'une diminution de ces populations lymphocytaires est liée aux formes sévères et est à l'origine des signes cliniques. Individuellement, les patients qui ont survécu à une infection par le SARS-CoV-2 présentaient généralement de meilleures réponses immunitaires que ceux qui n'ont pas survécu ou qui ont eu des séquelles importants suite à l'infection. Ces résultats laissent suggérer l'importance des différentes sous-populations lymphocytaires T mais aussi de manière moins importante, des LyB et des LyNK dans le contrôle de l'infection et de la pathogenèse par le SARS-Cov-2.

### **VI.3. Réponse inflammatoire initiale**

Nous avons mis en évidence une augmentation des PNN et des monocytes pendant la première semaine d'hospitalisation en réanimation que nous retrouvons pour d'autres virus respiratoires (Narasaraju T et al., 2011). Cette augmentation pourrait refléter la mise en place d'une réponse inflammatoire face à l'infection au SARS-Cov-2, et jouer un rôle dans l'initiation de la réponse immunitaire adaptative et l'interaction avec les LyT. L'équipe Bao C et al. (2021) a démontré l'intérêt de ces cellules dans la réponse antivirale. Cependant les mécanismes responsables de l'augmentation de ces populations nécessitent d'être approfondis. Ensuite, la diminution de l'expression de HLA-DR par les monocytes peut expliquer, en partie, l'altération de la présentation de l'antigène aux cellules immunitaires. Cette diminution de l'expression monocyttaire de HLA-DR (mHLA-DR) représente un indicateur fiable de l'altération monocyttaire, permettant d'évaluer l'état général fonctionnel du système immunitaire.

### **VI.4. CTLA-4 et PD-1 à l'origine d'un dérèglement immunitaire**

En ce qui concerne l'expression des points de contrôle immunitaire, l'expression augmentée de CTLA-4 par les LyT, en particulier pour les Ly TCD4 et les Ly Treg, démontre un dérèglement précoce de la réponse immunitaire survenant durant les premiers jours d'hospitalisation. L'étude portant sur l'expression de PD1 par les LyT montre que le taux d'expression de PD-1 à la surface des différentes populations lymphocytaires T que ce soit les Ly TCD4, les Ly TCD8 ou les Ly Treg, est augmenté plus tardivement chez les patients. Cette augmentation tardive laisse suggérer un dérèglement du système immunitaire retardé par rapport à CTLA-4 et est en faveur de rôles distincts de ces points de contrôle dans la régulation des réponses immunitaires antivirales.

De plus, PD-L1 joue aussi un rôle fondamental se manifestant par une expression tardive de PD-L1 sur les monocytes et les polynucléaires neutrophiles. Cette augmentation tardive de

l'expression de PD-1 sur les différentes populations lymphocytaires et de PD-L1 sur les monocytes et les polynucléaires neutrophiles peut expliquer en partie comment le virus échappe à la réponse immunitaire de l'hôte. Plus précisément, cette augmentation accroît les probabilités que PD-L1 se fixe sur PD-1 et induise par la suite une inhibition de l'activation des LyT et donc de la réponse immunitaire.

Ces schémas différentiels d'expression de CTLA-4 et de PD-1 confirment l'hypothèse selon laquelle CTLA-4 intervient précocement dans l'induction de la tolérance virale et PD-1 agit tardivement pour maintenir la tolérance à long terme. L'expression augmentée de CTLA-4 sur les Ly Treg et sur les Ly TCD4 et de PD-1 sur toutes les populations lymphocytaires T contribue donc à la régulation des LyT. Cette étude confirmant que CTLA-4 et PD-1 utilisent des schémas distincts de régulation immunitaire, pourrait faire l'objet d'une étude ultérieure des combinaisons de points de contrôle immunitaires en clinique, et la mise en place de traitement ciblant ces deux points de contrôles immunitaires. Conformément au rôle de PD-1 dans la suppression de l'activité des LyT, l'inhibition de l'axe PD-1/PD-L1 pourrait augmenter les réponses immunitaires antivirales contre le SARS-Cov-2 ce qui a déjà été démontré dans d'autres études (Erickson JJ et al., 2012 ; Liu J et al., 2014). En conséquence, le blocage de CTLA-4 et de l'axe PD-1/PD-L1 pourrait induire, par un effet synergique, la prolifération d'un plus grand nombre de LyT au début de la réponse immunitaire, de restaurer par la suite les réponses immunitaires des LyT précédemment activés qui se sont épuisés, et de réduire l'immunosuppression médiée par les Ly Tregs, cela a été démontré dans le cadre des tumeurs (Selby MJ et al., 2016). Il serait donc intéressant d'étudier de nouvelles thérapies inhibant spécifiquement PD-1, PD-L1 ou CTLA-4. Cependant, même si la combinaison du blocage de CTLA-4 et de l'axe PD-1/PD-L1 afin d'augmenter l'efficacité thérapeutique est hautement souhaitable, le traitement combiné pourrait s'avérer toxique en induisant une prolifération anormale et incontrôlée des Ly Tregs. Plusieurs paramètres qui reflètent l'état immunitaire général des patients, tels que le nombre absolu de Ly, l'expression des marqueurs immunitaires PD-1, PD-L1 et CTLA-4 pourront être considérés comme des marqueurs prédictifs de la réponse à tout traitement. Il a été démontré pour le Virus de l'Hépatite C par exemple, que le blocage de l'axe PD-1/PD-L1 au cours d'une infection chronique virale réactive les fonctions des LyT antiviraux et réduit la charge virale (Billerbeck E et al., 2017). Le ciblage de l'axe PD-1/PD-L1 pendant les infections rétrovirales, dont le VIH, a des effets bénéfiques pour le contrôle du virus (Velu V et al., 2015). Il est possible que l'inhibition de la signalisation PD-1 pendant la stimulation des Ly TCD8 entraîne une diminution de l'activation, tandis que le blocage de PD-1 des LyT effecteurs augmente l'activation immunitaire établie pour le VIH (Garcia-Bates TM et al., 2019).

## **VI.5. Surproduction de cytokines pro-inflammatoire**

L'évaluation fonctionnelle des LyT par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoire nous a permis de constater que la production de TNF- $\alpha$  et d'IL-2 est normale, alors que la production d'IFN- $\gamma$  par les Ly TCD4 est diminuée, indiquant un processus d'épuisement des Ly TCD4. En revanche, les Ly TCD8 peuvent être impliqués dans la réponse immunitaire antivirale puisqu'ils produisent des niveaux plus importantes d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$ , suggérant que les tempêtes de cytokines pourraient être associées à la gravité de la maladie et que les LyT exercent, entre autre, leurs effets immunitaires par la sécrétion de ces cytokines (Hadjadj J et al., 2020). La production d'IFN- $\gamma$  est essentielle à la résistance contre l'infection de divers agents pathogènes. En tant que source majeure d'IFN- $\gamma$ , la capacité des LyT à répondre à l'infection fait partie de la réponse immunitaire tardive donc adaptative qui prend plusieurs jours pour

développer une réponse IFN- $\gamma$  proéminente. Par ailleurs, les taux circulants d'IL-6 et d'IL-8 ont augmenté de manière modérée mais significative et durable au fil du temps, reflétant la réponse inflammatoire subaiguë des cellules immunitaires liée au SARS-CoV-2 (Vardhana SA et al., 2020). Ces résultats suggèrent que la surproduction de certaines cytokines pro-inflammatoires, pourraient expliquer, au moins en partie, l'immunogénicité du SARS-Cov-2.

### **VI.6. Limites de l'étude**

Toutefois, notre étude présente certaines limites. Premièrement, nous avons principalement évalué le taux de LyB, de LyNK, des sous-ensembles de LyT et des populations granulocytaires et monocytaires, mais la fonction explicite de ces cellules dans la réponse antivirale reste à démontrer. Deuxièmement, cette étude n'a porté que sur un petit échantillon de patients ; les résultats doivent donc être interprétés avec prudence et comparés à une population plus large. Etant donné que nous ne disposons pas de toutes les données sur le profil virémique du SARS-CoV-2 aux différents temps, d'autres études sont nécessaires pour étudier la corrélation entre la cinétique de la charge virale et la dynamique des réponses immunitaires cellulaires antivirales dans les formes sévères comparée aux formes légères ou modérées. Et enfin, l'origine de ces perturbations immunologiques pour les marqueurs PD-1, PD-L1 et CTLA-4 nécessite une exploration plus approfondie en amont. La clarification de ces questions permettra de disséquer davantage la pathogenèse complexe du SARS-CoV-2, avec des implications potentielles pour le développement de nouvelles thérapies.

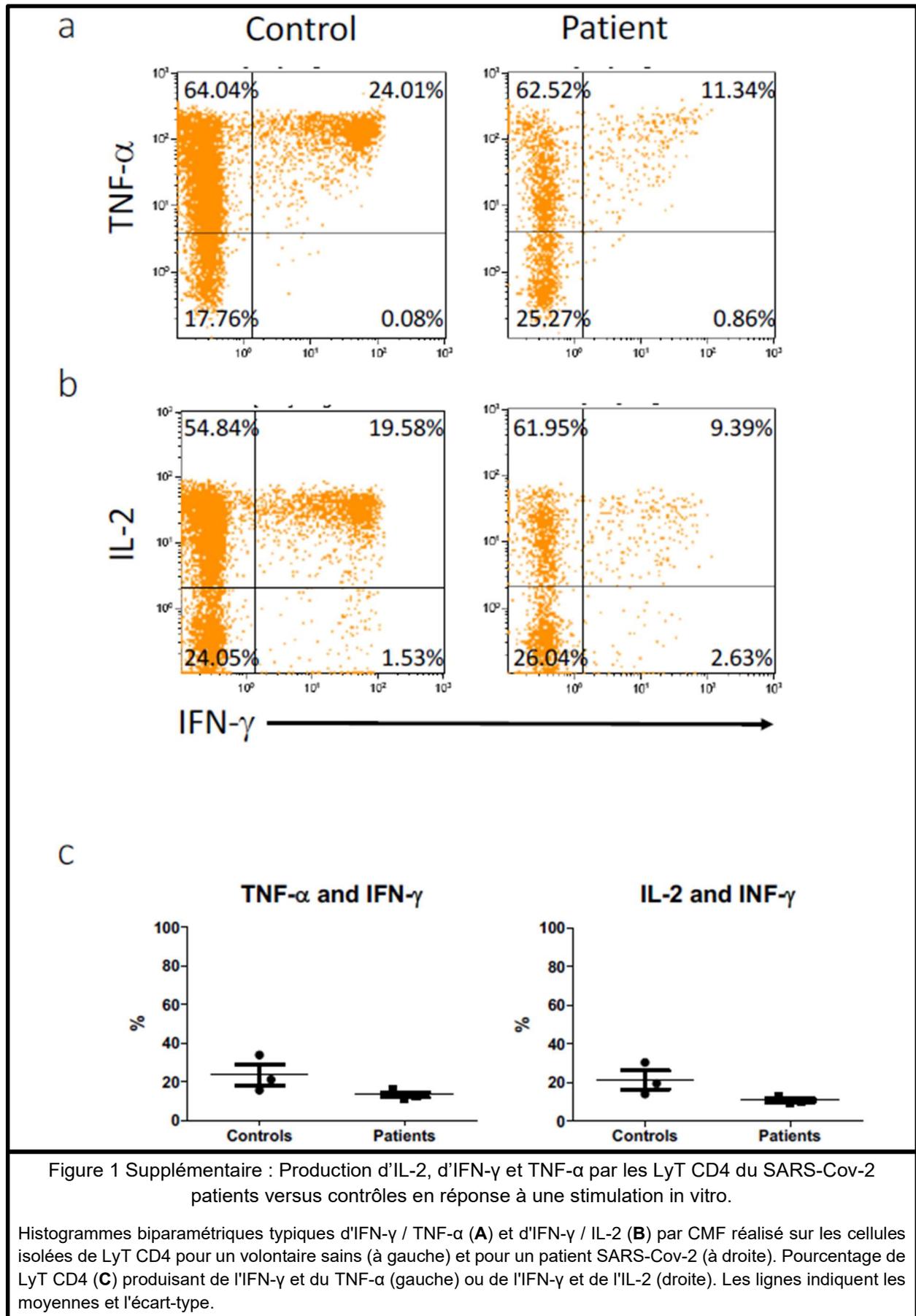
### **VI.7. Intérêt pronostic**

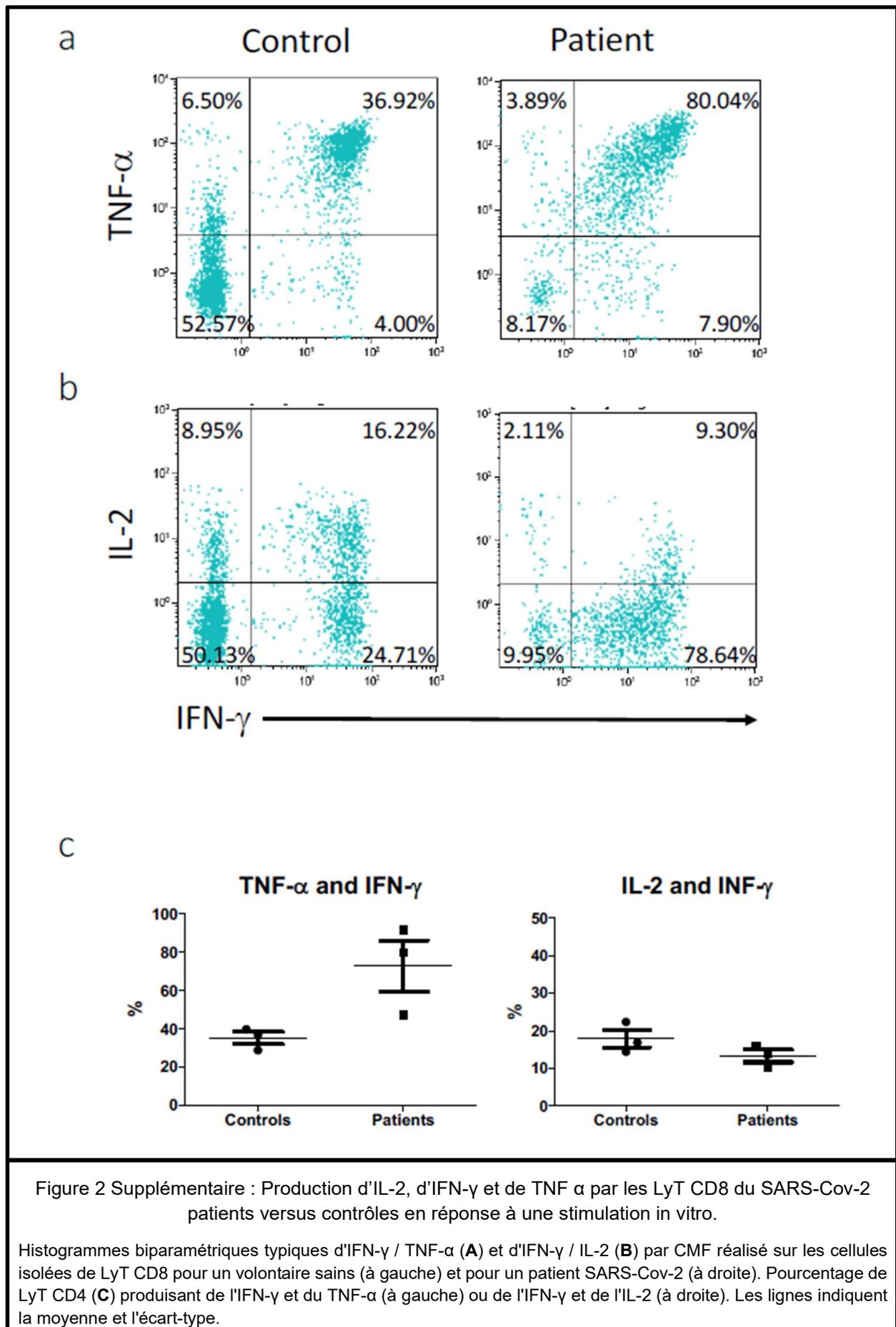
La mesure de l'état fonctionnel de la réponse immunitaire dans un échantillon de sang d'un patient atteint de SARS-Cov-2 devrait améliorer la prédiction du pronostic et l'identification de patients présentant un risque accru d'évolution vers une pneumonie au SARS-Cov-2, voir à un SDRA, ainsi que la prédiction du bénéfice clinique de la ventilation invasive en soins intensifs. Cela devrait permettre aussi de déterminer le traitement le plus adapté, d'évaluer l'effet de nouveaux traitements sur la réponse immunitaire, de développer de meilleurs modèles pour prédire l'évolution de la pandémie, de soutenir le développement de vaccins optimaux, de développer des traitements immunomodulateurs sûrs afin d'améliorer la réponse immunitaire avec un rapport bénéfice/risque optimal, tout en inhibant la réponse inflammatoire associée à la pneumonie et au SDRA.

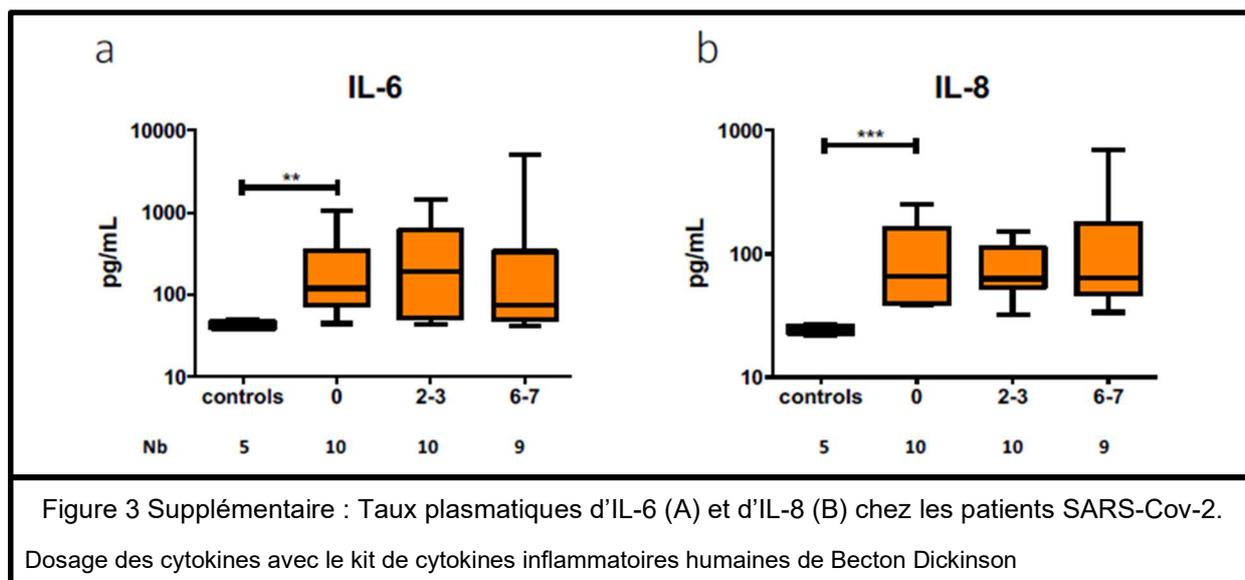
## VII. Conclusion

---

Bien que nos résultats méritent d'être confirmés sur une cohorte plus importante, nos analyses suggèrent fortement que le virus a un effet dévastateur à multiples facettes entraînant une déplétion de pratiquement toutes les populations lymphocytaires et une régulation positive de puissants mécanismes immunosuppresseurs chez les patients atteints du SARS-Cov-2 et gravement malades. Nous n'étions qu'au tout début de notre compréhension de l'interaction entre l'immunité innée et l'immunité adaptative et de l'impact à la fois dans le contrôle viral et dans la toxicité pour l'hôte lors d'infections graves par le SARS-Cov-2. Aujourd'hui, la pandémie du SARS-Cov-2 continue de représenter une grave menace pour la santé publique des nations du monde entier, même si des vaccins efficaces ont vu le jour grâce aux connaissances scientifiques acquises et aux résultats de nombreuses études. Malgré tout, l'objectif principal de lutte contre la pandémie du SARS-Cov-2 a été et reste toujours de limiter au maximum la transmission et de définir une gestion clinique qui améliore le taux de guérison et réduise efficacement le taux de mortalité global. Pour atteindre cet objectif, une compréhension plus approfondie de tous les aspects du coronavirus, dont les caractéristiques immunologiques que nous avons commencés à étudier, est nécessaire pour prévenir ou réduire au maximum la menace que ce virus représente pour la société. De plus, une compréhension approfondie de l'épidémiologie, de la physiopathologie et des efforts de réponse à la pandémie pour combattre la COVID-19 est une leçon inestimable pour la société, fournissant un protocole pour combattre les futures pandémies à l'avenir. Néanmoins, des thérapeutiques antivirales efficaces ciblant l'entrée du virus, la réponse et les points de contrôle immunitaire dont PD-1 et CTLA-4, n'ont pas encore été mises au point en particulier dans les formes sévères, afin de mettre en place une meilleure gestion clinique des complications secondaires.







## Références bibliographiques

---

Abdelsamed HA, Moustaki A, Fan Y, Dogra P, Ghoneim HE, Zebley CC, Triplett BM, Sekaly RP, Youngblood B. Human memory CD8 T cell effector potential is epigenetically preserved during in vivo homeostasis. *J Exp Med*. 2017 Jun 5;214(6):1593-1606.

Aghbash PS, Eslami N, Shamekh A, Entezari-Maleki T, Baghi HB. SARS-CoV-2 infection: The role of PD-1/PD-L1 and CTLA-4 axis. *Life Sci*. 2021 Apr 1;270:119124.

Ahn E, Araki K, Hashimoto M, Li W, Riley JL, Cheung J, Sharpe AH, Freeman GJ, Irving BA, Ahmed R. Role of PD-1 during effector CD8 T cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 May 1;115(18):4749-4754.

Aichele P, Unsoeld H, Koschella M, Schweier O, Kalinke U, Vucikujja S. CD8 T cells specific for lymphocytic choriomeningitis virus require type I IFN receptor for clonal expansion. *J Immunol*. 2006 Apr 15;176(8):4525-9.

Akbari O, Stock P, Singh AK, Lombardi V, Lee WL, Freeman GJ, Sharpe AH, Umetsu DT, Dekruyff RH. PD-L1 and PD-L2 modulate airway inflammation and iNKT-cell-dependent airway hyperreactivity in opposing directions. *Mucosal Immunol*. 2010 Jan;3(1):81-91.

Akondy RS, Fitch M, Edupuganti S, Yang S, Kissick HT, Li KW, Youngblood BA, Abdelsamed HA, McGuire DJ, Cohen KW, Alexe G, Nagar S, McCausland MM, Gupta S, Tata P, Haining WN, McElrath MJ, Zhang D, Hu B, Greenleaf WJ, Goronzy JJ, Mulligan MJ, Hellerstein M, Ahmed R. Origin and differentiation of human memory CD8 T cells after vaccination. *Nature*. 2017 Dec 21;552(7685):362-367.

Amanat F, Krammer F. SARS-CoV-2 Vaccines: Status Report. *Immunity*. 2020 Apr 14;52(4):583-589.

ARDS Definition Task Force, Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, Fan E, Camporota L, Slutsky AS. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA*. 2012 Jun 20;307(23):2526-33.

Asano S, Ito S, Takahashi K, Furuya K, Kondo M, Sokabe M, Hasegawa Y. Matrix stiffness regulates migration of human lung fibroblasts. *Physiol Rep*. 2017 May;5(9):e13281.

Auffray C, Fogg D, Garfa M, Elain G, Join-Lambert O, Kayal S, Sarnacki S, Cumano A, Lauvau G, Geissmann F. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science*. 2007 Aug 3;317(5838):666-70.

Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:669-92.

Bai Y, Yao L, Wei T, Tian F, Jin DY, Chen L, Wang M. Presumed Asymptomatic Carrier Transmission of COVID-19. *JAMA*. 2020 Apr 14;323(14):1406-1407.

- Bao C, Tao X, Cui W, Hao Y, Zheng S, Yi B, Pan T, Young KH, Qian W. Natural killer cells associated with SARS-CoV-2 viral RNA shedding, antibody response and mortality in COVID-19 patients. *Exp Hematol Oncol*. 2021 Jan 27;10(1):5.
- Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, Freeman GJ, Ahmed R. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature*. 2006 Feb 9;439(7077):682-7.
- Barnes E. Unravelling the fate of functional PD1+ T cells in chronic viral hepatitis. *J Clin Invest*. 2018 Feb 1;128(2):573-576.
- Bengsch B, Martin B, Thimme R. Restoration of HBV-specific CD8+ T cell function by PD-1 blockade in inactive carrier patients is linked to T cell differentiation. *J Hepatol*. 2014 Dec;61(6):1212-9.
- Bhatraju PK, Ghassemieh BJ, Nichols M, Kim R, Jerome KR, Nalla AK, Greninger AL, Pipavath S, Wurfel MM, Evans L, Kritek PA, West TE, Luks A, Gerbino A, Dale CR, Goldman JD, O'Mahony S, Mikacenic C. Covid-19 in Critically Ill Patients in the Seattle Region - Case Series. *N Engl J Med*. 2020 May 21;382(21):2012-2022.
- Billerbeck E, Wolfisberg R, Fahnøe U, Xiao JW, Quirk C, Luna JM, Cullen JM, Hartlage AS, Chiriboga L, Ghoshal K, Lipkin WI, Bukh J, Scheel TKH, Kapoor A, Rice CM. Mouse models of acute and chronic hepatitis B virus infection. *Science*. 2017 Jul 14;357(6347):204-208.
- Blanco-Melo D, Nilsson-Payant BE, Liu WC, Uhl S, Hoagland D, Møller R, Jordan TX, Oishi K, Panis M, Sachs D, Wang TT, Schwartz RE, Lim JK, Albrecht RA, tenOever BR. Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. *Cell*. 2020 May 28;181(5):1036-1045.e9.
- Blattman JN, Wherry EJ, Ha SJ, van der Most RG, Ahmed R. Impact of epitope escape on PD-1 expression and CD8 T-cell exhaustion during chronic infection. *J Virol*. 2009 May;83(9):4386-94.
- Bordon J, Aliberti S, Fernandez-Botran R, Uriarte SM, Rane MJ, Duvvuri P, Peyrani P, Morlacchi LC, Blasi F, Ramirez JA. Understanding the roles of cytokines and neutrophil activity and neutrophil apoptosis in the protective versus deleterious inflammatory response in pneumonia. *Int J Infect Dis*. 2013 Feb;17(2):e76-83.
- Borges L, Pithon-Curi TC, Curi R, Hatanaka E. COVID-19 and Neutrophils: The Relationship between Hyperinflammation and Neutrophil Extracellular Traps. *Mediators Inflamm*. 2020 Dec 2;2020:8829674.
- Bouaziz JD, Yanaba K, Venturi GM, Wang Y, Tisch RM, Poe JC, Tedder TF. Therapeutic B cell depletion impairs adaptive and autoreactive CD4+ T cell activation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Dec 26;104(52):20878-83.
- Bouwman W, Verhaegh W, Holtzer L, van de Stolpe A. Measurement of Cellular Immune Response to Viral Infection and Vaccination. *Front Immunol*. 2020 Oct 19;11:575074.

Brodin P, Davis MM. Human immune system variation. *Nat Rev Immunol*. 2017 Jan;17(1):21-29.

Broers AE, van Der Holt R, van Esser JW, Gratama JW, Henzen-Logmans S, Kuenen-Boumeester V, Löwenberg B, Cornelissen JJ. Increased transplant-related morbidity and mortality in CMV-seropositive patients despite highly effective prevention of CMV disease after allogeneic T-cell-depleted stem cell transplantation. *Blood*. 2000 Apr 1;95(7):2240-5.

Brown JA, Dorfman DM, Ma FR, Sullivan EL, Munoz O, Wood CR, Greenfield EA, Freeman GJ. Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. *J Immunol*. 2003 Feb 1;170(3):1257-66.

Brummelman J, Pilipow K, Lugli E. The Single-Cell Phenotypic Identity of Human CD8+ and CD4+ T Cells. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2018;341:63-124.

Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *Am J Clin Oncol*. 2016 Feb;39(1):98-106.

Butcher EC, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science*. 1996 Apr 5;272(5258):60-6.

Butte MJ, Keir ME, Phamduy TB, Sharpe AH, Freeman GJ. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity*. 2007 Jul;27(1):111-22.

Butte MJ, Peña-Cruz V, Kim MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. Interaction of human PD-L1 and B7-1. *Mol Immunol*. 2008 Aug;45(13):3567-72.

Caldas LA, Carneiro FA, Higa LM, Monteiro FL, da Silva GP, da Costa LJ, Durigon EL, Tanuri A, de Souza W. Ultrastructural analysis of SARS-CoV-2 interactions with the host cell via high resolution scanning electron microscopy. *Sci Rep*. 2020 Sep 30;10(1):16099.

Chamoto K, Al-Habsi M, Honjo T. Role of PD-1 in Immunity and Diseases. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2017;410:75-97.

Chan JF, Yuan S, Kok KH, To KK, Chu H, Yang J, Xing F, Liu J, Yip CC, Poon RW, Tsoi HW, Lo SK, Chan KH, Poon VK, Chan WM, Ip JD, Cai JP, Cheng VC, Chen H, Hui CK, Yuen KY. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *Lancet*. 2020 Feb 15;395(10223):514-523.

Channappanavar R, Perlman S. Pathogenic human coronavirus infections: causes and consequences of cytokine storm and immunopathology. *Semin Immunopathol*. 2017 Jul;39(5):529-539.

Chaudhri A, Xiao Y, Klee AN, Wang X, Zhu B, Freeman GJ. PD-L1 Binds to B7-1 Only In Cis on the Same Cell Surface. *Cancer Immunol Res*. 2018 Aug;6(8):921-929.

Chen G, Wu D, Guo W, Cao Y, Huang D, Wang H, Wang T, Zhang X, Chen H, Yu H, Zhang X, Zhang M, Wu S, Song J, Chen T, Han M, Li S, Luo X, Zhao J, Ning Q. Clinical and

immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. *J Clin Invest*. 2020 May 1;130(5):2620-2629.

Chen J, Lau YF, Lamirande EW, Paddock CD, Bartlett JH, Zaki SR, Subbarao K. Cellular immune responses to severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) infection in senescent BALB/c mice: CD4<sup>+</sup> T cells are important in control of SARS-CoV infection. *J Virol*. 2010 Feb;84(3):1289-301.

Chen L. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nat Rev Immunol*. 2004;4:336–347.

Christie D, Zhu J. Transcriptional regulatory networks for CD4 T cell differentiation. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2014;381:125-72.

Collins AV, Brodie DW, Gilbert RJ, Iaboni A, Manso-Sancho R, Walse B, Stuart DI, van der Merwe PA, Davis SJ. The interaction properties of costimulatory molecules revisited. *Immunity*. 2002 Aug;17(2):201-10.

Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol*. 2001 Nov;22(11):633-40.

Corse E, Allison JP. Cutting edge: CTLA-4 on effector T cells inhibits in trans. *J Immunol*. 2012 Aug 1;189(3):1123-7.

Costa S, Bevilacqua D, Cassatella MA, Scapini P. Recent advances on the crosstalk between neutrophils and B or T lymphocytes. *Immunology*. 2019 Jan;156(1):23-32.

COVID-19 Treatment Guidelines Panel. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Treatment Guidelines. National Institutes of Health. [https:// www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/](https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/) [1 September 2020]

Crawford A, Angelosanto JM, Kao C, Doering TA, Odorizzi PM, Barnett BE, Wherry EJ. Molecular and transcriptional basis of CD4<sup>+</sup> T cell dysfunction during chronic infection. *Immunity*. 2014 Feb 20;40(2):289-302.

David P, Megger DA, Kaiser T, Werner T, Liu J, Chen L, Sitek B, Dittmer U, Zelinskyy G. The PD-1/PD-L1 Pathway Affects the Expansion and Function of Cytotoxic CD8<sup>+</sup> T Cells During an Acute Retroviral Infection. *Front Immunol*. 2019 Feb 5;10:54.

De Biasi S, Meschiari M, Gibellini L, Bellinazzi C, Borella R, Fidanza L, Gozzi L, Iannone A, Lo Tartaro D, Mattioli M, Paolini A, Menozzi M, Milić J, Franceschi G, Fantini R, Tonelli R, Sita M, Sarti M, Trenti T, Brugioni L, Cicchetti L, Facchinetti F, Pietrangelo A, Clini E, Girardis M, Guaraldi G, Mussini C, Cossarizza A. Marked T cell activation, senescence, exhaustion and skewing towards TH17 in patients with COVID-19 pneumonia. *Nat Commun*. 2020 Jul 6;11(1):3434.

Derhovanessian E, Maier AB, Hähnel K, Beck R, de Craen AJM, Slagboom EP, Westendorp RGJ, Pawelec G. Infection with cytomegalovirus but not herpes simplex virus induces the accumulation of late-differentiated CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cells in humans. *J Gen Virol*. 2011 Dec;92(Pt 12):2746-2756.

Diao B, Wang C, Tan Y, Chen X, Liu Y, Ning L, Chen L, Li M, Liu Y, Wang G, Yuan Z, Feng Z, Zhang Y, Wu Y, Chen Y. Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Front Immunol*. 2020 May 1;11:827.

Dong S, Maiella S, Xhaard A, Pang Y, Wenandy L, Larghero J, Becavin C, Benecke A, Bianchi E, Socié G, Rogge L. Multiparameter single-cell profiling of human CD4+FOXP3+ regulatory T-cell populations in homeostatic conditions and during graft-versus-host disease. *Blood*. 2013 Sep 5;122(10):1802-12.

Drosten C, Günther S, Preiser W, van der Werf S, Brodt HR, Becker S, Rabenau H, Panning M, Kolesnikova L, Fouchier RA, Berger A, Burguière AM, Cinatl J, Eickmann M, Escriou N, Grywna K, Kramme S, Manuguerra JC, Müller S, Rickerts V, Stürmer M, Vieth S, Klenk HD, Osterhaus AD, Schmitz H, Doerr HW. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med*. 2003 May 15;348(20):1967-76.

Duan K, Liu B, Li C, Zhang H, Yu T, Qu J, Zhou M, Chen L, Meng S, Hu Y, Peng C, Yuan M, Huang J, Wang Z, Yu J, Gao X, Wang D, Yu X, Li L, Zhang J, Wu X, Li B, Xu Y, Chen W, Peng Y, Hu Y, Lin L, Liu X, Huang S, Zhou Z, Zhang L, Wang Y, Zhang Z, Deng K, Xia Z, Gong Q, Zhang W, Zheng X, Liu Y, Yang H, Zhou D, Yu D, Hou J, Shi Z, Chen S, Chen Z, Zhang X, Yang X. Effectiveness of convalescent plasma therapy in severe COVID-19 patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020 Apr 28;117(17):9490-9496.

Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*. 2004;21: 137–148.

Egen JG, Allison JP. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 accumulation in the immunological synapse is regulated by TCR signal strength. *Immunity*. 2002;16:23–35.

Egen JG, Kuhns MS, Allison JP. CTLA-4 : new insights into its biological function and use in tumor immunotherapy. *Nat Immunol*. 2002;3:611–618.

EI-Far M, Ancuta P, Routy JP, Zhang Y, Bakeman W, Bordi R, DaFonseca S, Said EA, Gosselin A, Tep TS, Eichbaum Q, van Grevenynghe J, Schwartz O, Freeman GJ, Haddad EK, Chomont N, Sékaly RP. Nef promotes evasion of human immunodeficiency virus type 1-infected cells from the CTLA-4-mediated inhibition of T-cell activation. *J Gen Virol*. 2015 Jun;96(Pt 6):1463-1477.

EI-Far M, Isabelle C, Chomont N, Bourbonnière M, Fonseca S, Ancuta P, Peretz Y, Chouikh Y, Halwani R, Schwartz O, Madrenas J, Freeman GJ, Routy JP, Haddad EK, Sékaly RP. Down-regulation of CTLA-4 by HIV-1 Nef protein. *PLoS One*. 2013;8(1):e54295.

Erickson JJ, Gilchuk P, Hastings AK, Tollefson SJ, Johnson M, Downing MB, Boyd KL, Johnson JE, Kim AS, Joyce S, Williams JV. Viral acute lower respiratory infections impair CD8+ T cells through PD-1. *J Clin Invest*. 2012 Aug;122(8):2967-82.

Esensten JH, Helou YA, Chopra G, Weiss A, Bluestone JA. CD28 Costimulation: From Mechanism to Therapy. *Immunity*. 2016 May 17;44(5):973-88.

Fife BT, Bluestone JA. Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. *Immunol Rev*. 2008;224:166–182.

Rémy Formento | Thèse d'exercice | Université de Limoges | 2022

Forster P, Forster L, Renfrew C, Forster M. Phylogenetic network analysis of SARS-CoV-2 genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020 Apr 28;117(17):9241-9243.

Francisco LM, Salinas VH, Brown KE, Vanguri VK, Freeman GJ, Kuchroo VK, Sharpe AH. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J Exp Med*. 2009 Dec 21;206(13):3015-29.

Frasca L, Piazza C, Piccolella E. CD4+ T cells orchestrate both amplification and deletion of CD8+ T cells. *Crit Rev Immunol*. 1998;18(6):569-94.

Frebel H, Nindl V, Schuepbach RA, Braunschweiler T, Richter K, Vogel J, Wagner CA, Loffing-Cueni D, Kurrer M, Ludewig B, Oxenius A. Programmed death 1 protects from fatal circulatory failure during systemic virus infection of mice. *J Exp Med*. 2012 Dec 17;209(13):2485-99.

Garcia-Bates TM, Palma ML, Shen C, Gambotto A, Macatangay BJC, Ferris RL, Rinaldo CR, Mailliard RB. Contrasting Roles of the PD-1 Signaling Pathway in Dendritic Cell-Mediated Induction and Regulation of HIV-1-Specific Effector T Cell Functions. *J Virol*. 2019 Feb 19;93(5):e02035-18.

Garcia-Diaz A, Shin DS, Moreno BH, Saco J, Escuin-Ordinas H, Rodriguez GA, Zaretsky JM, Sun L, Hugo W, Wang X, Parisi G, Saus CP, Torrejon DY, Graeber TG, Comin-Anduix B, Hu-Lieskovan S, Damoiseaux R, Lo RS, Ribas A. Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression. *Cell Rep*. 2017 May 9;19(6):1189-1201.

Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*. 2003 Jul;19(1):71-82.

Giacalone VD, Margaroli C, Mall MA, Tirouvanziam R. Neutrophil Adaptations upon Recruitment to the Lung: New Concepts and Implications for Homeostasis and Disease. *Int J Mol Sci*. 2020 Jan 28;21(3):851.

Goldrath AW, Bevan MJ. Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature*. 1999;402:255-262.

Good C, Wells AI, Coyne CB. Type III interferon signaling restricts enterovirus 71 infection of goblet cells. *Sci Adv*. 2019 Mar 6;5(3):eaau4255.

Gordon DE, Jang GM, Bouhaddou M, Xu J, Obernier K, White KM, O'Meara MJ, Rezelj VV, Guo JZ, Swaney DL, Tummino TA, Hüttenhain R, Kaake RM, Richards AL, Tutuncuoglu B, Foussard H, Batra J, Haas K, Modak M, Kim M, Haas P, Polacco BJ, Braberg H, Fabius JM, Eckhardt M, Soucheray M, Bennett MJ, Cakir M, McGregor MJ, Li Q, Meyer B, Roesch F, Vallet T, Mac Kain A, Miorin L, Moreno E, Naing ZZC, Zhou Y, Peng S, Shi Y, Zhang Z, Shen W, Kirby IT, Melnyk JE, Chorba JS, Lou K, Dai SA, Barrio-Hernandez I, Memon D, Hernandez-Armenta C, Lyu J, Mathy CJP, Perica T, Pilla KB, Ganesan SJ, Saltzberg DJ, Rakesh R, Liu X, Rosenthal SB, Calviello L, Venkataramanan S, Liboy-Lugo J, Lin Y, Huang XP, Liu Y, Wankowicz SA, Bohn M, Safari M, Ugur FS, Koh C, Savar NS, Tran QD, Shengjuler D, Fletcher SJ, O'Neal MC, Cai Y, Chang JCJ, Broadhurst DJ, Klippsten S, Sharp PP, Wenzell NA, Kuzuoglu-Ozturk D, Wang HY, Trenker R, Young JM, Cavero DA, Hiatt J,

Roth TL, Rathore U, Subramanian A, Noack J, Hubert M, Stroud RM, Frankel AD, Rosenberg OS, Verba KA, Agard DA, Ott M, Emerman M, Jura N, von Zastrow M, Verdin E, Ashworth A, Schwartz O, d'Enfert C, Mukherjee S, Jacobson M, Malik HS, Fujimori DG, Ideker T, Craik CS, Floor SN, Fraser JS, Gross JD, Sali A, Roth BL, Ruggero D, Taunton J, Kortemme T, Beltrao P, Vignuzzi M, García-Sastre A, Shokat KM, Shoichet BK, Krogan NJ. A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. *Nature*. 2020 Jul;583(7816):459-468.

Gralinski LE, Menachery VD. Return of the Coronavirus: 2019-nCoV. *Viruses*. 2020 Jan 24;12(2):135.

Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:515–548.

Guan WJ, Ni ZY, Hu Y, Liang WH, Ou CQ, He JX, Liu L, Shan H, Lei CL, Hui DSC, Du B, Li LJ, Zeng G, Yuen KY, Chen RC, Tang CL, Wang T, Chen PY, Xiang J, Li SY, Wang JL, Liang ZJ, Peng YX, Wei L, Liu Y, Hu YH, Peng P, Wang JM, Liu JY, Chen Z, Li G, Zheng ZJ, Qiu SQ, Luo J, Ye CJ, Zhu SY, Zhong NS; China Medical Treatment Expert Group for Covid-19. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N Engl J Med*. 2020 Apr 30;382(18):1708-1720.

Gupta MD, Girish MP, Yadav G, Shankar A, Yadav R. Coronavirus disease 2019 and the cardiovascular system: Impacts and implications. *Indian Heart J*. 2020 Jan-Feb;72(1):1-6.

Guzik TJ, Mohiddin SA, Dimarco A, Patel V, Savvatis K, Marelli-Berg FM, Madhur MS, Tomaszewski M, Maffia P, D'Acquisto F, Nicklin SA, Marian AJ, Nosalski R, Murray EC, Guzik B, Berry C, Touyz RM, Kreutz R, Wang DW, Bhella D, Sagliocco O, Crea F, Thomson EC, McInnes IB. COVID-19 and the cardiovascular system: implications for risk assessment, diagnosis, and treatment options. *Cardiovasc Res*. 2020 Aug 1;116(10):1666-1687.

Hadjadj J, Yatim N, Barnabei L, Corneau A, Boussier J, Smith N, Péré H, Charbit B, Bondet V, Chenevier-Gobeaux C, Breillat P, Carlier N, Gauzit R, Morbieu C, Pène F, Marin N, Roche N, Szwebel TA, Merklings SH, Treluyer JM, Veyer D, Mouthon L, Blanc C, Tharaux PL, Rozenberg F, Fischer A, Duffy D, Rieux-Laucat F, Kernéis S, Terrier B. Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. *Science*. 2020 Aug 7;369(6504):718-724.

Harker JA, Lewis GM, Mack L, Zuniga EI. Late interleukin-6 escalates T follicular helper cell responses and controls a chronic viral infection. *Science*. 2011 Nov 11;334(6057):825-9.

Hart OM, Athie-Morales V, O'Connor GM, Gardiner CM. TLR7/8-mediated activation of human NK cells results in accessory cell-dependent IFN-gamma production. *J Immunol*. 2005 Aug 1;175(3):1636-42.

Hashimoto M, Kamphorst AO, Im SJ, Kissick HT, Pillai RN, Ramalingam SS, Araki K, Ahmed R. CD8 T Cell Exhaustion in Chronic Infection and Cancer: Opportunities for Interventions. *Annu Rev Med*. 2018 Jan 29;69:301-318.

Hayakawa Y, Screpanti V, Yagita H, Grandien A, Ljunggren HG, Smyth MJ, Chambers BJ. NK cell TRAIL eliminates immature dendritic cells in vivo and limits dendritic cell vaccination efficacy. *J Immunol*. 2004 Jan 1;172(1):123-9.

He Z, Zhao C, Dong Q, Zhuang H, Song S, Peng G, Dwyer DE. Effects of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus infection on peripheral blood lymphocytes and their subsets. *Int J Infect Dis*. 2005 Nov;9(6):323-30.

Henson SM, Riddell NE, Akbar AN. Properties of end-stage human T cells defined by CD45RA re-expression. *Curr Opin Immunol*. 2012 Aug;24(4):476-81.

Hodgson J. The pandemic pipeline. *Nat Biotechnol*. 2020 May;38(5):523-532.

Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, Schiergens TS, Herrler G, Wu NH, Nitsche A, Müller MA, Drosten C, Pöhlmann S. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*. 2020 Apr 16;181(2):271-280.e8.

Hoffmann M, Pantazis N, Martin GE, Hickling S, Hurst J, Meyerowitz J, Willberg CB, Robinson N, Brown H, Fisher M, Kinloch S, Babiker A, Weber J, Nwokolo N, Fox J, Fidler S, Phillips R, Frater J; SPARTAC and CHERUB Investigators. Exhaustion of Activated CD8 T Cells Predicts Disease Progression in Primary HIV-1 Infection. *PLoS Pathog*. 2016 Jul 14;12(7):e1005661.

Honda T, Egen JG, Lämmermann T, Kastenmüller W, Torabi-Parizi P, Germain RN. Tuning of antigen sensitivity by T cell receptor-dependent negative feedback controls T cell effector function in inflamed tissues. *Immunity*. 2014 Feb 20;40(2):235-247.

Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, Zhang L, Fan G, Xu J, Gu X, Cheng Z, Yu T, Xia J, Wei Y, Wu W, Xie X, Yin W, Li H, Liu M, Xiao Y, Gao H, Guo L, Xie J, Wang G, Jiang R, Gao Z, Jin Q, Wang J, Cao B. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. 2020 Feb 15;395(10223):497-506.

Huang ZY, Xu P, Li JH, Zeng CH, Song HF, Chen H, Zhu YB, Song YY, Lu HL, Shen CP, Zhang XG, Wu MY, Wang XF. Clinical Significance of Dynamics of Programmed Death Ligand-1 Expression on Circulating CD14+ Monocytes and CD19+ B Cells with the Progression of Hepatitis B Virus Infection. *Viral Immunol*. 2017 Apr;30(3):224-231.

Huppert LA, Matthay MA, Ware LB. Pathogenesis of Acute Respiratory Distress Syndrome. *Semin Respir Crit Care Med*. 2019 Feb;40(1):31-39.

Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J*. 1992 Nov;11(11):3887-95.

Jacob J, Kelsoe G, Rajewsky K, Weiss U. Intraclonal generation of antibody mutants in germinal centres. *Nature*. 1991 Dec 5;354(6352):389-92.

Jacobs RF, Tabor DR, Burks AW, Campbell GD. Elevated interleukin-1 release by human alveolar macrophages during the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis*. 1989 Dec;140(6):1686-92.

Jeannot R, Daix T, Formento R, Feuillard J, François B. Severe COVID-19 is associated with deep and sustained multifaceted cellular immunosuppression. *Intensive Care Med*. 2020 Sep;46(9):1769-1771.

Johansson S, Berg L, Hall H, Höglund P. NK cells: elusive players in autoimmunity. *Trends Immunol*. 2005 Nov;26(11):613-8.

Jørgensen AS, Rosenkilde MM, Hjortø GM. Biased signaling of G protein-coupled receptors - From a chemokine receptor CCR7 perspective. *Gen Comp Endocrinol*. 2018 Mar 1;258:4-14.

Kahan SM, Wherry EJ, Zajac AJ. T cell exhaustion during persistent viral infections. *Virology*. 2015 May;479-480:180-93.

Kaufmann DE, Kavanagh DG, Pereyra F, Zaunders JJ, Mackey EW, Miura T, Palmer S, Brockman M, Rathod A, Piechocka-Trocha A, Baker B, Zhu B, Le Gall S, Waring MT, Ahern R, Moss K, Kelleher AD, Coffin JM, Freeman GJ, Rosenberg ES, Walker BD. Upregulation of CTLA-4 by HIV-specific CD4+ T cells correlates with disease progression and defines a reversible immune dysfunction. *Nat Immunol*. 2007 Nov;8(11):1246-54.

Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:677-704.

Keir ME, Liang SC, Guleria I, Latchman YE, Qipo A, Albacker LA, Koulmanda M, Freeman GJ, Sayegh MH, Sharpe AH. Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *J Exp Med*. 2006 Apr 17;203(4):883-95.

Kim D, Lee JY, Yang JS, Kim JW, Kim VN, Chang H. The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. *Cell*. 2020 May 14;181(4):914-921.e10.

Kimmig S, Przybylski GK, Schmidt CA, Laurisch K, Möwes B, Radbruch A, Thiel A. Two subsets of naive T helper cells with distinct T cell receptor excision circle content in human adult peripheral blood. *J Exp Med*. 2002 Mar 18;195(6):789-94.

Kleinpeter P, Remy-Ziller C, Winter E, Gantzer M, Nourtier V, Kempf J, Hortelano J, Schmitt D, Schultz H, Geist M, Brua C, Hoffmann C, Schlesinger Y, Villeval D, Thioudellet C, Erbs P, Foloppe J, Silvestre N, Fend L, Quemeneur E, Marchand JB. By Binding CD80 and CD86, the Vaccinia Virus M2 Protein Blocks Their Interactions with both CD28 and CTLA4 and Potentiates CD80 Binding to PD-L1. *J Virol*. 2019 May 15;93(11):e00207-19.

Kolumam GA, Thomas S, Thompson LJ, Sprent J, Murali-Krishna K. Type I interferons act directly on CD8 T cells to allow clonal expansion and memory formation in response to viral infection. *J Exp Med*. 2005 Sep 5;202(5):637-50.

Lam KP, Kühn R, Rajewsky K. In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. *Cell*. 1997 Sep 19;90(6):1073-83.

Lamichhane PP, Samarasinghe AE. The Role of Innate Leukocytes during Influenza Virus Infection. *J Immunol Res*. 2019 Sep 12;2019:8028725.

Lanier LL. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:225-74.

Lansbury L, Rodrigo C, Leonardi-Bee J, Nguyen-Van-Tam J, Shen Lim W. Corticosteroids as adjunctive therapy in the treatment of influenza. *Emergencias*. 2021 Dec;33(6):466-467.

Laouar Y, Sutterwala FS, Gorelik L, Flavell RA. Transforming growth factor-beta controls T helper type 1 cell development through regulation of natural killer cell interferon-gamma. *Nat Immunol*. 2005 Jun;6(6):600-7.

Laribi K, Lemaire P, Sandrini J, Baugier de Materre A. Advances in the understanding and management of T-cell prolymphocytic leukemia. *Oncotarget*. 2017 Nov 1;8(61):104664-104686.

Lazear HM, Schoggins JW, Diamond MS. Shared and Distinct Functions of Type I and Type III Interferons. *Immunity*. 2019 Apr 16;50(4):907-923.

Le Bon A, Tough DF. Links between innate and adaptive immunity via type I interferon. *Curr Opin Immunol*. 2002 Aug;14(4):432-6.

LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood*. 2008 Sep 1;112(5):1570-80.

Lee SJ, Jang BC, Lee SW, Yang YI, Suh SI, Park YM, Oh S, Shin JG, Yao S, Chen L, Choi IH. Interferon regulatory factor-1 is prerequisite to the constitutive expression and IFN-gamma-induced upregulation of B7-H1 (CD274). *FEBS Lett*. 2006 Feb 6;580(3):755-62.

Levelt CN, Carsetti R, Eichmann K. Regulation of thymocyte development through CD3. II. Expression of T cell receptor beta CD3 epsilon and maturation to the CD4+8+ stage are highly correlated in individual thymocytes. *J Exp Med*. 1993 Dec 1;178(6):1867-75.

Levi M, Thachil J, Iba T, Levy JH. Coagulation abnormalities and thrombosis in patients with COVID-19. *Lancet Haematol*. 2020 Jun;7(6):e438-e440.

Li Q, Guan X, Wu P, Wang X, Zhou L, Tong Y, Ren R, Leung KSM, Lau EHY, Wong JY, Xing X, Xiang N, Wu Y, Li C, Chen Q, Li D, Liu T, Zhao J, Liu M, Tu W, Chen C, Jin L, Yang R, Wang Q, Zhou S, Wang R, Liu H, Luo Y, Liu Y, Shao G, Li H, Tao Z, Yang Y, Deng Z, Liu B, Ma Z, Zhang Y, Shi G, Lam TTY, Wu JT, Gao GF, Cowling BJ, Yang B, Leung GM, Feng Z. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus-Infected Pneumonia. *N Engl J Med*. 2020 Mar 26;382(13):1199-1207.

Lin DY, Tanaka Y, Iwasaki M, Gittis AG, Su HP, Mikami B, Okazaki T, Honjo T, Minato N, Garboczi DN. The PD-1/PD-L1 complex resembles the antigen-binding Fv domains of antibodies and T cell receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Feb 26;105(8):3011-6.

Linsley PS, Bradshaw J, Greene J, Peach R, Bennett KL, Mittler RS. Intracellular trafficking of CTLA-4 and focal localization towards sites of TCR engagement. *Immunity*. 1996 Jun;4(6):535-43.

Lippi G, Lavie CJ, Henry BM, Sanchis-Gomar F. Do genetic polymorphisms in angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) gene play a role in coronavirus disease 2019 (COVID-19)? Clin Chem Lab Med. 2020 Jun 29;58(9):1415-1422.

Liu J, Zhang E, Ma Z, Wu W, Kosinska A, Zhang X, Möller I, Seiz P, Glebe D, Wang B, Yang D, Lu M, Roggendorf M. Enhancing virus-specific immunity in vivo by combining therapeutic vaccination and PD-L1 blockade in chronic hepatitis B infection. PLoS Pathog. 2014 Jan;10(1):e1003856.

Long EO. Ready for prime time: NK cell priming by dendritic cells. Immunity. 2007 Apr;26(4):385-7.

Lugli E, Dominguez MH, Gattinoni L, Chattopadhyay PK, Bolton DL, Song K, Klatt NR, Brenchley JM, Vaccari M, Gostick E, Price DA, Waldmann TA, Restifo NP, Franchini G, Roederer M. Superior T memory stem cell persistence supports long-lived T cell memory. J Clin Invest. 2013 Feb;123(2):594-9.

Lukens MV, van de Pol AC, Coenjaerts FE, Jansen NJ, Kamp VM, Kimpen JL, Rossen JW, Ulfman LH, Tacke CE, Viveen MC, Koenderman L, Wolfs TF, van Bleek GM. A systemic neutrophil response precedes robust CD8(+) T-cell activation during natural respiratory syncytial virus infection in infants. J Virol. 2010 Mar;84(5):2374-83.

MacLeod MK, Kappler JW, Marrack P. Memory CD4 T cells: generation, reactivation and re-assignment. Immunology. 2010 May;130(1):10-5.

Mangino M, Roederer M, Beddall MH, Nestle FO, Spector TD. Innate and adaptive immune traits are differentially affected by genetic and environmental factors. Nat Commun. 2017 Jan 5;8:13850.

Matloubian M, Concepcion RJ, Ahmed R. CD4+ T cells are required to sustain CD8+ cytotoxic T-cell responses during chronic viral infection. J Virol. 1994 Dec;68(12):8056-63.

Matsuyama S, Nao N, Shirato K, Kawase M, Saito S, Takayama I, Nagata N, Sekizuka T, Katoh H, Kato F, Sakata M, Tahara M, Kutsuna S, Ohmagari N, Kuroda M, Suzuki T, Kageyama T, Takeda M. Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-expressing cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2020 Mar 31;117(13):7001-7003.

McCluskey J, Kanaan C, Diviney M. Nomenclature and Serology of HLA Class I and Class II Alleles. Curr Protoc Immunol. 2017 Aug 1;118:A.1S.1-A.1S.6.

McHeyzer-Williams LJ, McHeyzer-Williams MG. Antigen-specific memory B cell development. Annu Rev Immunol. 2005;23:487-513.

McKinney EF, Smith KGC. Metabolic exhaustion in infection, cancer and autoimmunity. Nat Immunol. 2018 Mar;19(3):213-221.

McKinstry KK, Strutt TM, Swain SL. The potential of CD4 T-cell memory. Immunology. 2010 May;130(1):1-9.

Mehta P, McAuley DF, Brown M, Sanchez E, Tattersall RS, Manson JJ; HLH Across Speciality Collaboration, UK. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet*. 2020 Mar 28;395(10229):1033-1034.

Milne CD, Paige CJ. IL-7: a key regulator of B lymphopoiesis. *Semin Immunol*. 2006 Feb;18(1):20-30.

Miyara M, Chader D, Sage E, Sugiyama D, Nishikawa H, Bouvry D, Claër L, Hingorani R, Balderas R, Rohrer J, Warner N, Chapelier A, Valeyre D, Kannagi R, Sakaguchi S, Amoura Z, Gorochoy G. Sialyl Lewis x (CD15s) identifies highly differentiated and most suppressive FOXP3high regulatory T cells in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Jun 9;112(23):7225-30.

Mueller SN, Vanguri VK, Ha SJ, West EE, Keir ME, Glickman JN, Sharpe AH, Ahmed R. PD-L1 has distinct functions in hematopoietic and nonhematopoietic cells in regulating T cell responses during chronic infection in mice. *J Clin Invest*. 2010 Jul;120(7):2508-15.

Murthy S, Gomersall CD, Fowler RA. Care for Critically Ill Patients With COVID-19. *JAMA*. 2020 Apr 21;323(15):1499-1500.

Narasaraju T, Yang E, Samy RP, Ng HH, Poh WP, Liew AA, Phoon MC, van Rooijen N, Chow VT. Excessive neutrophils and neutrophil extracellular traps contribute to acute lung injury of influenza pneumonitis. *Am J Pathol*. 2011 Jul;179(1):199-210.

Narni-Mancinelli E, Ugolini S, Vivier E. Les cellules natural killer - Adaptation et mémoire dans le système immunitaire inné [Natural killer cells: adaptation and memory in innate immunity]. *Med Sci (Paris)*. 2013 Apr;29(4):389-95. French.

Ng CT, Snell LM, Brooks DG, Oldstone MB. Networking at the level of host immunity: immune cell interactions during persistent viral infections. *Cell Host Microbe*. 2013 Jun 12;13(6):652-64.

Nguyen A, David JK, Maden SK, Wood MA, Weeder BR, Nellore A, Thompson RF. Human Leukocyte Antigen Susceptibility Map for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. *J Virol*. 2020 Jun 16;94(13):e00510-20.

Nguyen QP, Deng TZ, Witherden DA, Goldrath AW. Origins of CD4+ circulating and tissue-resident memory T-cells. *Immunology*. 2019 May;157(1):3-12.

Nomura T, Yamamoto H, Nishizawa M, Hau TTT, Harada S, Ishii H, Seki S, Nakamura-Hoshi M, Okazaki M, Daigen S, Kawana-Tachikawa A, Nagata N, Iwata-Yoshikawa N, Shiwa N, Iida S, Katano H, Suzuki T, Park ES, Maeda K, Suzuki Y, Ami Y, Matano T. Subacute SARS-CoV-2 replication can be controlled in the absence of CD8+ T cells in cynomolgus macaques. *PLoS Pathog*. 2021 Jul 19;17(7):e1009668.

Omilusik KD, Goldrath AW. The origins of memory T cells. *Nature*. 2017 Dec 21;552(7685):337-339.

Ong EZ, Chan KR, Ooi EE. Viral Manipulation of Host Inhibitory Receptor Signaling for Immune Evasion. *PLoS Pathog*. 2016 Sep 1;12(9):e1005776.

Rémy Formento | Thèse d'exercice | Université de Limoges | 2022

Parackova Z, Zentsova I, Bloomfield M, Vrabцова P, Smetanova J, Klocperk A, Mesežnikov G, Casas Mendez LF, Vymazal T, Sediva A. Disharmonic Inflammatory Signatures in COVID-19: Augmented Neutrophils' but Impaired Monocytes' and Dendritic Cells' Responsiveness. *Cells*. 2020 Sep 29;9(10):2206.

Parham P. MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nat Rev Immunol*. 2005 Mar;5(3):201-14.

Park JJ, Omiya R, Matsumura Y, Sakoda Y, Kuramasu A, Augustine MM, Yao S, Tsushima F, Narazaki H, Anand S, Liu Y, Strome SE, Chen L, Tamada K. B7-H1/CD80 interaction is required for the induction and maintenance of peripheral T-cell tolerance. *Blood*. 2010 Aug 26;116(8):1291-8.

Parry RV, Chemnitz JM, Frauwirth KA, Lanfranco AR, Braunstein I, Kobayashi SV, Linsley PS, Thompson CB, Riley JL. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol*. 2005 Nov;25(21):9543-53.

Parsa N, Zaheri PM, Hewitt RG, Karimi Akhormeh A, Taravatmanesh S, Wallin L. The rapid CD4 + T-lymphocyte decline and human immunodeficiency virus progression in females compared to males. *Sci Rep*. 2020 Oct 8;10(1):16816.

Pedersen SF, Ho YC. SARS-CoV-2: a storm is raging. *J Clin Invest*. 2020 May 1;130(5):2202-2205.

Pentcheva-Hoang T, Egen JG, Wojnoonski K, Allison JP. B7-1 and B7-2 selectively recruit CTLA-4 and CD28 to the immunological synapse. *Immunity*. 2004 Sep;21(3):401-13.

Petrelli A, Mijnheer G, Hoytema van Konijnenburg DP, van der Wal MM, Giovannone B, Mocholi E, Vazirpanah N, Broen JC, Hijnen D, Oldenburg B, Coffey PJ, Vastert SJ, Prakken BJ, Spierings E, Pandit A, Mokry M, van Wijk F. PD-1+CD8+ T cells are clonally expanding effectors in human chronic inflammation. *J Clin Invest*. 2018 Oct 1;128(10):4669-4681.

Piccirillo CA, Shevach EM. Naturally-occurring CD4+CD25+ immunoregulatory T cells: central players in the arena of peripheral tolerance. *Semin Immunol*. 2004 Apr;16(2):81-8.

Pillay J, Kamp VM, van Hoffen E, Visser T, Tak T, Lammers JW, Ulfman LH, Leenen LP, Pickkers P, Koenderman L. A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *J Clin Invest*. 2012 Jan;122(1):327-36.

Pollard CA, Morran MP, Nestor-Kalinoski AL. The COVID-19 pandemic: a global health crisis. *Physiol Genomics*. 2020 Nov 1;52(11):549-557.

Poschke I, Mougiakakos D, Kiessling R. Camouflage and sabotage: tumor escape from the immune system. *Cancer Immunol Immunother*. 2011 Aug;60(8):1161-71.

Quezada SA, Peggs KS. Exploiting CTLA-4, PD-1 and PD-L1 to reactivate the host immune response against cancer. *Br J Cancer*. 2013 Apr 30;108(8):1560-5.

Qureshi OS, Kaur S, Hou TZ, Jeffery LE, Poulter NS, Briggs Z, Kenefeck R, Willox AK, Royle SJ, Rappoport JZ, Sansom DM. Constitutive clathrin-mediated endocytosis of CTLA-4 persists during T cell activation. *J Biol Chem*. 2012 Mar 16;287(12):9429-40.

Qureshi OS, Zheng Y, Nakamura K, Attridge K, Manzotti C, Schmidt EM, Baker J, Jeffery LE, Kaur S, Briggs Z, Hou TZ, Futter CE, Anderson G, Walker LS, Sansom DM. Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science*. 2011 Apr 29;332(6029):600-3.

Ragab D, Salah Eldin H, Taeimah M, Khattab R, Salem R. The COVID-19 Cytokine Storm; What We Know So Far. *Front Immunol*. 2020 Jun 16;11:1446.

Raulet DH. Interplay of natural killer cells and their receptors with the adaptive immune response. *Nat Immunol*. 2004 Oct;5(10):996-1002.

Riley JL, June CH. The CD28 family: a T-cell rheostat for therapeutic control of T-cell activation. *Blood*. 2005 Jan 1;105(1):13-21.

Robbins SH, Bessou G, Cornillon A, Zucchini N, Rupp B, Ruzsics Z, Sacher T, Tomasello E, Vivier E, Koszinowski UH, Dalod M. Natural killer cells promote early CD8 T cell responses against cytomegalovirus. *PLoS Pathog*. 2007 Aug 24;3(8):e123.

Robson F, Khan KS, Le TK, Paris C, Demirbag S, Barfuss P, Rocchi P, Ng WL. Coronavirus RNA Proofreading: Molecular Basis and Therapeutic Targeting. *Mol Cell*. 2020 Dec 17;80(6):1136-1138.

Romero P, Zippelius A, Kurth I, Pittet MJ, Touvrey C, Iancu EM, Corthesy P, Devedre E, Speiser DE, Rufer N. Four functionally distinct populations of human effector-memory CD8+ T lymphocytes. *J Immunol*. 2007 Apr 1;178(7):4112-9.

Rosales C. Neutrophils at the crossroads of innate and adaptive immunity. *J Leukoc Biol*. 2020 Jul;108(1):377-396.

Rothe C, Schunk M, Sothmann P, Bretzel G, Froeschl G, Wallrauch C, Zimmer T, Thiel V, Janke C, Guggemos W, Seilmaier M, Drosten C, Vollmar P, Zwirgmaier K, Zange S, Wölfel R, Hoelscher M. Transmission of 2019-nCoV Infection from an Asymptomatic Contact in Germany. *N Engl J Med*. 2020 Mar 5;382(10):970-971.

Rozali EN, Hato SV, Robinson BW, Lake RA, Lesterhuis WJ. Programmed death ligand 2 in cancer-induced immune suppression. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:656340.

Russell CD, Unger SA, Walton M, Schwarze J. The Human Immune Response to Respiratory Syncytial Virus Infection. *Clin Microbiol Rev*. 2017 Apr;30(2):481-502.

Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol*. 2010 Jul;10(7):490-500.

Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:745-63.

- Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*. 1999 Oct 14;401(6754):708-12.
- Sallusto F. Heterogeneity of Human CD4(+) T Cells Against Microbes. *Annu Rev Immunol*. 2016 May 20;34:317-34.
- Samuel CE. Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev*. 2001 Oct;14(4):778-809.
- Sathaliyawala T, Kubota M, Yudanin N, Turner D, Camp P, Thome JJ, Bickham KL, Lerner H, Goldstein M, Sykes M, Kato T, Farber DL. Distribution and compartmentalization of human circulating and tissue-resident memory T cell subsets. *Immunity*. 2013 Jan 24;38(1):187-97.
- Schneider H, Downey J, Smith A, Zinselmeyer BH, Rush C, Brewer JM, Wei B, Hogg N, Garside P, Rudd CE. Reversal of the TCR stop signal by CTLA-4. *Science*. 2006 Sep 29;313(5795):1972-5.
- Schönrich G, Raftery MJ. The PD-1/PD-L1 Axis and Virus Infections: A Delicate Balance. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019 Jun 13;9:207.
- Schurich A, Khanna P, Lopes AR, Han KJ, Peppas D, Micco L, Nebbia G, Kennedy PT, Geretti AM, Dusheiko G, Maini MK. Role of the coinhibitory receptor cytotoxic T lymphocyte antigen-4 on apoptosis-prone CD8 T cells in persistent hepatitis B virus infection. *Hepatology*. 2011 May;53(5):1494-503.
- Schwarz BA, Bhandoola A. Trafficking from the bone marrow to the thymus: a prerequisite for thymopoiesis. *Immunol Rev*. 2006 Feb;209:47-57.
- Selby MJ, Engelhardt JJ, Johnston RJ, Lu LS, Han M, Thudium K, Yao D, Quigley M, Valle J, Wang C, Chen B, Cardarelli PM, Blanset D, Korman AJ. Preclinical Development of Ipilimumab and Nivolumab Combination Immunotherapy: Mouse Tumor Models, In Vitro Functional Studies, and Cynomolgus Macaque Toxicology. *PLoS One*. 2016 Sep 9;11(9):e0161779.
- Serbina NV, Jia T, Hohl TM, Pamer EG. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:421-52.
- Shahid Z, Kalayanamitra R, McClafferty B, Kepko D, Ramgobin D, Patel R, Aggarwal CS, Vunnam R, Sahu N, Bhatt D, Jones K, Golamari R, Jain R. COVID-19 and Older Adults: What We Know. *J Am Geriatr Soc*. 2020 May;68(5):926-929.
- Shang W, Yang Y, Rao Y, Rao X. The outbreak of SARS-CoV-2 pneumonia calls for viral vaccines. *NPJ Vaccines*. 2020 Mar 6;5(1):18.
- Sharpe AH, Pauken KE. The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. *Nat Rev Immunol*. 2018 Mar;18(3):153-167.
- Sharpe AH, Wherry EJ, Ahmed R, Freeman GJ. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat Immunol*. 2007 Mar;8(3):239-45.

Shen C, Wang Z, Zhao F, Yang Y, Li J, Yuan J, Wang F, Li D, Yang M, Xing L, Wei J, Xiao H, Yang Y, Qu J, Qing L, Chen L, Xu Z, Peng L, Li Y, Zheng H, Chen F, Huang K, Jiang Y, Liu D, Zhang Z, Liu Y, Liu L. Treatment of 5 Critically Ill Patients With COVID-19 With Convalescent Plasma. *JAMA*. 2020 Apr 28;323(16):1582-1589.

Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2011 Oct 10;11(11):762-74.

Shimizu M. Clinical features of cytokine storm syndrome. In: *Cytokine Storm Syndrome*, edited by Cron RQ, Behrens EM. Cham, Switzerland : Springer International Publishing, 2019, p. 31–41.

Shlomchik MJ. Sites and stages of autoreactive B cell activation and regulation. *Immunity*. 2008 Jan;28(1):18-28.

Sivori S, Falco M, Della Chiesa M, Carlomagno S, Vitale M, Moretta L, Moretta A. CpG and double-stranded RNA trigger human NK cells by Toll-like receptors: induction of cytokine release and cytotoxicity against tumors and dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jul 6;101(27):10116-21.

Smyth MJ, Teng MW, Swann J, Kyriakopoulos K, Godfrey DI, Hayakawa Y. CD4+CD25+ T regulatory cells suppress NK cell-mediated immunotherapy of cancer. *J Immunol*. 2006 Feb 1;176(3):1582-7.

Sosa-Hernández VA, Torres-Ruiz J, Cervantes-Díaz R, Romero-Ramírez S, Páez-Franco JC, Meza-Sánchez DE, Juárez-Vega G, Pérez-Fragoso A, Ortiz-Navarrete V, Ponce-de-León A, Llorente L, Berrón-Ruiz L, Mejía-Domínguez NR, Gómez-Martín D, Maravillas-Montero JL. B Cell Subsets as Severity-Associated Signatures in COVID-19 Patients. *Front Immunol*. 2020 Dec 3;11:611004.

Su KY, Watanabe A, Yeh CH, Kelsoe G, Kuraoka M. Efficient Culture of Human Naive and Memory B Cells for Use as APCs. *J Immunol*. 2016 Nov 15;197(10):4163-4176.

Sugiura D, Maruhashi T, Okazaki IM, Shimizu K, Maeda TK, Takemoto T, Okazaki T. Restriction of PD-1 function by cis-PD-L1/CD80 interactions is required for optimal T cell responses. *Science*. 2019 May 10;364(6440):558-566.

Sun C, Mezzadra R, Schumacher TN. Regulation and Function of the PD-L1 Checkpoint. *Immunity*. 2018 Mar 20;48(3):434-452.

Surh CD, Sprent J. Homeostasis of naive and memory T cells. *Immunity*. 2008 Dec 19;29(6):848-62.

Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, Sakaguchi S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med*. 2000 Jul 17;192(2):303-10.

Tan JT, Ernst B, Kieper WC, LeRoy E, Sprent J, Surh CD. Interleukin (IL)-15 and IL-7 jointly regulate homeostatic proliferation of memory phenotype CD8<sup>+</sup> cells but are not required for memory phenotype CD4<sup>+</sup> cells. *J Exp Med*. 2002 Jun 17;195(12):1523-32.

Tan W, Aboulhosn J. The cardiovascular burden of coronavirus disease 2019 (COVID-19) with a focus on congenital heart disease. *Int J Cardiol*. 2020 Jun 15;309:70-77.

Tang N, Li D, Wang X, Sun Z. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. *J Thromb Haemost*. 2020 Apr;18(4):844-847.

Tay MZ, Poh CM, Rénia L, MacAry PA, Ng LFP. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat Rev Immunol*. 2020 Jun;20(6):363-374.

Taylor GA, Feng CG, Sher A. p47 GTPases: regulators of immunity to intracellular pathogens. *Nat Rev Immunol*. 2004 Feb;4(2):100-9.

Terawaki S, Chikuma S, Shibayama S, Hayashi T, Yoshida T, Okazaki T, Honjo T. IFN- $\alpha$  directly promotes programmed cell death-1 transcription and limits the duration of T cell-mediated immunity. *J Immunol*. 2011 Mar 1;186(5):2772-9.

Terpos E, Ntanasis-Stathopoulos I, Elalamy I, Kastritis E, Sergentanis TN, Politou M, Psaltopoulou T, Gerotziafas G, Dimopoulos MA. Hematological findings and complications of COVID-19. *Am J Hematol*. 2020 Jul;95(7):834-847.

Thompson BT, Chambers RC, Liu KD. Acute Respiratory Distress Syndrome. *N Engl J Med*. 2017 Nov 9;377(19):1904-1905.

Tian X, Zhang A, Qiu C, Wang W, Yang Y, Qiu C, Liu A, Zhu L, Yuan S, Hu H, Wang W, Wei Q, Zhang X, Xu J. The upregulation of LAG-3 on T cells defines a subpopulation with functional exhaustion and correlates with disease progression in HIV-infected subjects. *J Immunol*. 2015 Apr 15;194(8):3873-82.

Trautmann L, Janbazian L, Chomont N, Said EA, Gimmig S, Bessette B, Boulassel MR, Delwart E, Sepulveda H, Balderas RS, Routy JP, Haddad EK, Sekaly RP. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat Med*. 2006 Oct;12(10):1198-202.

Tubo NJ, Jenkins MK. TCR signal quantity and quality in CD4<sup>+</sup> T cell differentiation. *Trends Immunol*. 2014 Dec;35(12):591-596.

Uddin M, Mustafa F, Rizvi TA, Loney T, Suwaidi HA, Al-Marzouqi AHH, Eldin AK, Alsabeeha N, Adrian TE, Stefanini C, Nowotny N, Alsheikh-Ali A, Senok AC. SARS-CoV-2/COVID-19: Viral Genomics, Epidemiology, Vaccines, and Therapeutic Interventions. *Viruses*. 2020 May 10;12(5):526.

van Dommelen SL, Sumaria N, Schreiber RD, Scalzo AA, Smyth MJ, Degli-Esposti MA. Perforin and granzymes have distinct roles in defensive immunity and immunopathology. *Immunity*. 2006 Nov;25(5):835-48.

Vardhana SA, Wolchok JD. The many faces of the anti-COVID immune response. *J Exp Med.* 2020 Jun 1;217(6):e20200678.

Veiga-Parga T, Sehrawat S, Rouse BT. Role of regulatory T cells during virus infection. *Immunol Rev.* 2013 Sep;255(1):182-96.

Velu V, Shetty RD, Larsson M, Shankar EM. Role of PD-1 co-inhibitory pathway in HIV infection and potential therapeutic options. *Retrovirology.* 2015 Feb 8;12:14.

Verdecchia P, Cavallini C, Spanevello A, Angeli F. The pivotal link between ACE2 deficiency and SARS-CoV-2 infection. *Eur J Intern Med.* 2020 Jun;76:14-20.

Verma K, Ogonek J, Varanasi PR, Luther S, Bünting I, Thomay K, Behrens YL, Mischak-Weissinger E, Hambach L. Human CD8+ CD57- TEMRA cells: Too young to be called "old". *PLoS One.* 2017 May 8;12(5):e0177405.

Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol.* 2008 Jul;8(7):523-32.

Virgin HW, Wherry EJ, Ahmed R. Redefining chronic viral infection. *Cell.* 2009 Jul 10;138(1):30-50.

Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol.* 2008 May;9(5):503-10.

von Andrian UH, Mackay CR. T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N Engl J Med.* 2000 Oct 5;343(14):1020-34.

Walker LS, Sansom DM. The emerging role of CTLA4 as a cell-extrinsic regulator of T cell responses. *Nat Rev Immunol.* 2011 Nov 25;11(12):852-63.

Walzer T, Dalod M, Robbins SH, Zitvogel L, Vivier E. Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force". *Blood.* 2005 Oct 1;106(7):2252-8.

Wang CJ, Kenefeck R, Wardzinski L, Attridge K, Manzotti C, Schmidt EM, Qureshi OS, Sansom DM, Walker LS. Cutting edge: cell-extrinsic immune regulation by CTLA-4 expressed on conventional T cells. *J Immunol.* 2012 Aug 1;189(3):1118-22.

Wang H, Wang Z, Cao W, Wu Q, Yuan Y, Zhang X. Regulatory T cells in COVID-19. *Aging Dis.* 2021 Oct 1;12(7):1545-1553.

Wang L, Pino-Lagos K, de Vries VC, Guleria I, Sayegh MH, Noelle RJ. Programmed death 1 ligand signaling regulates the generation of adaptive Foxp3+CD4+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Jul 8;105(27):9331-6.

Weber F, Kochs G, Haller O. Inverse interference: how viruses fight the interferon system. *Viral Immunol.* 2004;17(4):498-515.

Wei F, Zhong S, Ma Z, Kong H, Medvec A, Ahmed R, Freeman GJ, Krogsgaard M, Riley JL. Strength of PD-1 signaling differentially affects T-cell effector functions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Jul 2;110(27):E2480-9.

Wen W, Su W, Tang H, Le W, Zhang X, Zheng Y, Liu X, Xie L, Li J, Ye J, Dong L, Cui X, Miao Y, Wang D, Dong J, Xiao C, Chen W, Wang H. Immune cell profiling of COVID-19 patients in the recovery stage by single-cell sequencing. *Cell Discov*. 2020 Jun 20;6:41.

Westmeier J, Paniskaki K, Karaköse Z, Werner T, Sutter K, Dolff S, Overbeck M, Limmer A, Liu J, Zheng X, Brenner T, Berger MM, Witzke O, Trilling M, Lu M, Yang D, Babel N, Westhoff T, Dittmer U, Zelinskyy G. Impaired Cytotoxic CD8+ T Cell Response in Elderly COVID-19 Patients. *mBio*. 2020 Sep 18;11(5):e02243-20.

Wherry EJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, van der Most R, Ahmed R. Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. *J Virol*. 2003 Apr;77(8):4911-27.

Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol*. 2015 Aug;15(8):486-99.

Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol*. 2011 Jun;12(6):492-9.

Wu C, Chen X, Cai Y, Xia J, Zhou X, Xu S, Huang H, Zhang L, Zhou X, Du C, Zhang Y, Song J, Wang S, Chao Y, Yang Z, Xu J, Zhou X, Chen D, Xiong W, Xu L, Zhou F, Jiang J, Bai C, Zheng J, Song Y. Risk Factors Associated With Acute Respiratory Distress Syndrome and Death in Patients With Coronavirus Disease 2019 Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA Intern Med*. 2020 Jul 1;180(7):934-943.

Xiao Y, Yu S, Zhu B, Bedoret D, Bu X, Francisco LM, Hua P, Duke-Cohan JS, Umetsu DT, Sharpe AH, DeKruyff RH, Freeman GJ. RGMb is a novel binding partner for PD-L2 and its engagement with PD-L2 promotes respiratory tolerance. *J Exp Med*. 2014 May 5;211(5):943-59.

Xu X, Gao X. Immunological responses against SARS-coronavirus infection in humans. *Cell Mol Immunol*. 2004 Apr;1(2):119-22.

Yamano T, Nedjic J, Hinterberger M, Steinert M, Koser S, Pinto S, Gerdes N, Lutgens E, Ishimaru N, Busslinger M, Brors B, Kyewski B, Klein L. Thymic B Cells Are Licensed to Present Self Antigens for Central T Cell Tolerance Induction. *Immunity*. 2015 Jun 16;42(6):1048-61.

Yanaba K, Bouaziz JD, Haas KM, Poe JC, Fujimoto M, Tedder TF. A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity*. 2008 May;28(5):639-50.

Ye Q, Wang B, Mao J. The pathogenesis and treatment of the 'Cytokine Storm' in COVID-19. *J Infect*. 2020 Jun;80(6):607-613.

- Yokosuka T, Kobayashi W, Takamatsu M, Sakata-Sogawa K, Zeng H, Hashimoto-Tane A, Yagita H, Tokunaga M, Saito T. Spatiotemporal basis of CTLA-4 costimulatory molecule-mediated negative regulation of T cell activation. *Immunity*. 2010 Sep 24;33(3):326-39.
- Youngblood B, Hale JS, Kissick HT, Ahn E, Xu X, Wieland A, Araki K, West EE, Ghoneim HE, Fan Y, Dogra P, Davis CW, Konieczny BT, Antia R, Cheng X, Ahmed R. Effector CD8 T cells dedifferentiate into long-lived memory cells. *Nature*. 2017 Dec 21;552(7685):404-409.
- Youngnak P, Kozono Y, Kozono H, Iwai H, Otsuki N, Jin H, Omura K, Yagita H, Pardoll DM, Chen L, Azuma M. Differential binding properties of B7-H1 and B7-DC to programmed death-1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Aug 1;307(3):672-7.
- Yuki K, Fujiogi M, Koutsogiannaki S. COVID-19 pathophysiology: A review. *Clin Immunol*. 2020 Jun;215:108427.
- Zak KM, Kitel R, Przetocka S, Golik P, Guzik K, Musielak B, Dömling A, Dubin G, Holak TA. Structure of the Complex of Human Programmed Death 1, PD-1, and Its Ligand PD-L1. *Structure*. 2015 Dec 1;23(12):2341-2348.
- Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus AD, Fouchier RA. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N Engl J Med*. 2012 Nov 8;367(19):1814-20.
- Zhang D, Guo R, Lei L, Liu H, Wang Y, Wang Y, Qian H, Dai T, Zhang T, Lai Y, Wang J, Liu Z, Chen T, He A, O'Dwyer M, Hu J. Frontline Science: COVID-19 infection induces readily detectable morphologic and inflammation-related phenotypic changes in peripheral blood monocytes. *J Leukoc Biol*. 2021 Jan;109(1):13-22.
- Zhang JY, Zhang Z, Wang X, Fu JL, Yao J, Jiao Y, Chen L, Zhang H, Wei J, Jin L, Shi M, Gao GF, Wu H, Wang FS. PD-1 up-regulation is correlated with HIV-specific memory CD8+ T-cell exhaustion in typical progressors but not in long-term nonprogressors. *Blood*. 2007 Jun 1;109(11):4671-8.
- Zhang N, Bevan MJ. CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system. *Immunity*. 2011 Aug 26;35(2):161-8.
- Zhang Q, Xiang R, Huo S, Zhou Y, Jiang S, Wang Q, Yu F. Molecular mechanism of interaction between SARS-CoV-2 and host cells and interventional therapy. *Signal Transduct Target Ther*. 2021 Jun 11;6(1):233.
- Zhang X, Schwartz JC, Guo X, Bhatia S, Cao E, Lorenz M, Cammer M, Chen L, Zhang ZY, Edidin MA, Nathenson SG, Almo SC. Structural and functional analysis of the costimulatory receptor programmed death-1. *Immunity*. 2004 Mar;20(3):337-47.
- Zheng YY, Ma YT, Zhang JY, Xie X. COVID-19 and the cardiovascular system. *Nat Rev Cardiol*. 2020 May;17(5):259-260.
- Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z, Xiang J, Wang Y, Song B, Gu X, Guan L, Wei Y, Li H, Wu X, Xu J, Tu S, Zhang Y, Chen H, Cao B. Clinical course and risk factors for mortality

of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet*. 2020 Mar 28;395(10229):1054-1062.

Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, Si HR, Zhu Y, Li B, Huang CL, Chen HD, Chen J, Luo Y, Guo H, Jiang RD, Liu MQ, Chen Y, Shen XR, Wang X, Zheng XS, Zhao K, Chen QJ, Deng F, Liu LL, Yan B, Zhan FX, Wang YY, Xiao GF, Shi ZL. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020 Mar;579(7798):270-273.

Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, Zhao X, Huang B, Shi W, Lu R, Niu P, Zhan F, Ma X, Wang D, Xu W, Wu G, Gao GF, Tan W; China Novel Coronavirus Investigating and Research Team. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med*. 2020 Feb 20;382(8):727-733.

Ziegler-Heitbrock L. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol*. 2007 Mar;81(3):584-92.

Zimmermann P, Curtis N. Factors That Influence the Immune Response to Vaccination. *Clin Microbiol Rev*. 2019 Mar 13;32(2):e00084-18.

Zinselmeyer BH, Heydari S, Sacristán C, Nayak D, Cammer M, Herz J, Cheng X, Davis SJ, Dustin ML, McGavern DB. PD-1 promotes immune exhaustion by inducing antiviral T cell motility paralysis. *J Exp Med*. 2013 Apr 8;210(4):757-74.

Zou X, Chen K, Zou J, Han P, Hao J, Han Z. Single-cell RNA-seq data analysis on the receptor ACE2 expression reveals the potential risk of different human organs vulnerable to 2019-nCoV infection. *Front Med*. 2020 Apr;14(2):185-192.

## Annexes

---

Annexe 1 : Article : « Severe COVID-19 is associated with deep and sustained multifaceted cellular immunosuppression ».

LETTER

# Severe COVID-19 is associated with deep and sustained multifaceted cellular immunosuppression



Robin Jeannet<sup>1,2</sup>, Thomas Daix<sup>2,3</sup>, Rémy Formento<sup>1,4</sup>, Jean Feuillard<sup>1,4</sup> and Bruno François<sup>2,3,5\*</sup>

© 2020 Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature

Dear Editor,

SARS-CoV-2 infection is associated with marked lymphopenia that correlates with morbidity and mortality [1, 2]. Here, we present the first report on serial immunophenotypic and functional changes in 13 consecutively recruited patients infected with SARS-CoV-2 virus during their first week of ICU stay (Supplementary Table 1) with 10 healthy donors used as controls.

Patients uniformly exhibited deep global and persisting T, NK and B cell lymphopenia from ICU admission (D0) to day 7 (D7) (Fig. 1a to d). On D0, median absolute lymphocyte count was dramatically reduced at 0.72 [0.65–0.88] G/L as were CD4 and CD8 T cell counts at 0.29 [0.19–0.43] and 0.08 [0.05–0.1] G/L (Fig. 1a, e, f), such CD4 T cell levels reflecting profound immunosuppression in HIV-infected patients. Few CD4 T cells transiently expressed CTLA-4 during the first 3 days (Fig. 1g) while expression of PD-1 was observed at D0 and increased until D7 (Fig. 1h). CD8 T cells significantly and persistently expressed PD-1 from D0 to D7 while CTLA-4 expression remained unchanged (Fig. 1i, j).

Being heterogeneous at D0 (Fig. 1k), percentages of regulatory T cells (Tregs) increased during time. Few of them over-expressed CTLA-4 while PD-1 expression was strongly and stably increased until D7 (Fig. 1l, m). Total granulocytes were moderately increased with a transient egression of immature granulocytes in 4/10 patients at day 4–5 (Supplementary Figure 1). Monocyte counts

increased during the first week. Nevertheless, HLA-DR expression was strongly down-regulated by a threefold factor at D0. Strikingly this decrease persisted unabated until D7, possibly impairing antigen presentation, and was associated with increased PD-L1 expression (Fig. 1n, o and Supplementary Figure 4d).

Being either an exhaustion or an activation marker, PD-1 is an inducer of CD8 T cell apoptosis when activated. Therefore, functional evaluation of T-lymphocytes was performed in three patients and controls for comparison. Meanwhile production of TNF- $\alpha$  and IL-2 was normal, CD4 T cell IFN- $\gamma$  production was decreased (Supplementary Figure 2), indicating a CD4 exhaustion process. In contrast, CD8 T cells could be involved in anti-viral immune response since they produced higher levels of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  (Supplementary Figure 3). Consistently, percentages of effector CD4 T cells were decreased while those of effector memory and activated CD8 T cells were increased (Supplementary Figure 4a to 4c). Circulating levels of IL-6 and IL-8 were moderately but significantly and sustainably increased over time, reflecting the known SARS-CoV-2 related sub-acute inflammatory response of innate immune cells [4] (Supplementary Figure 5).

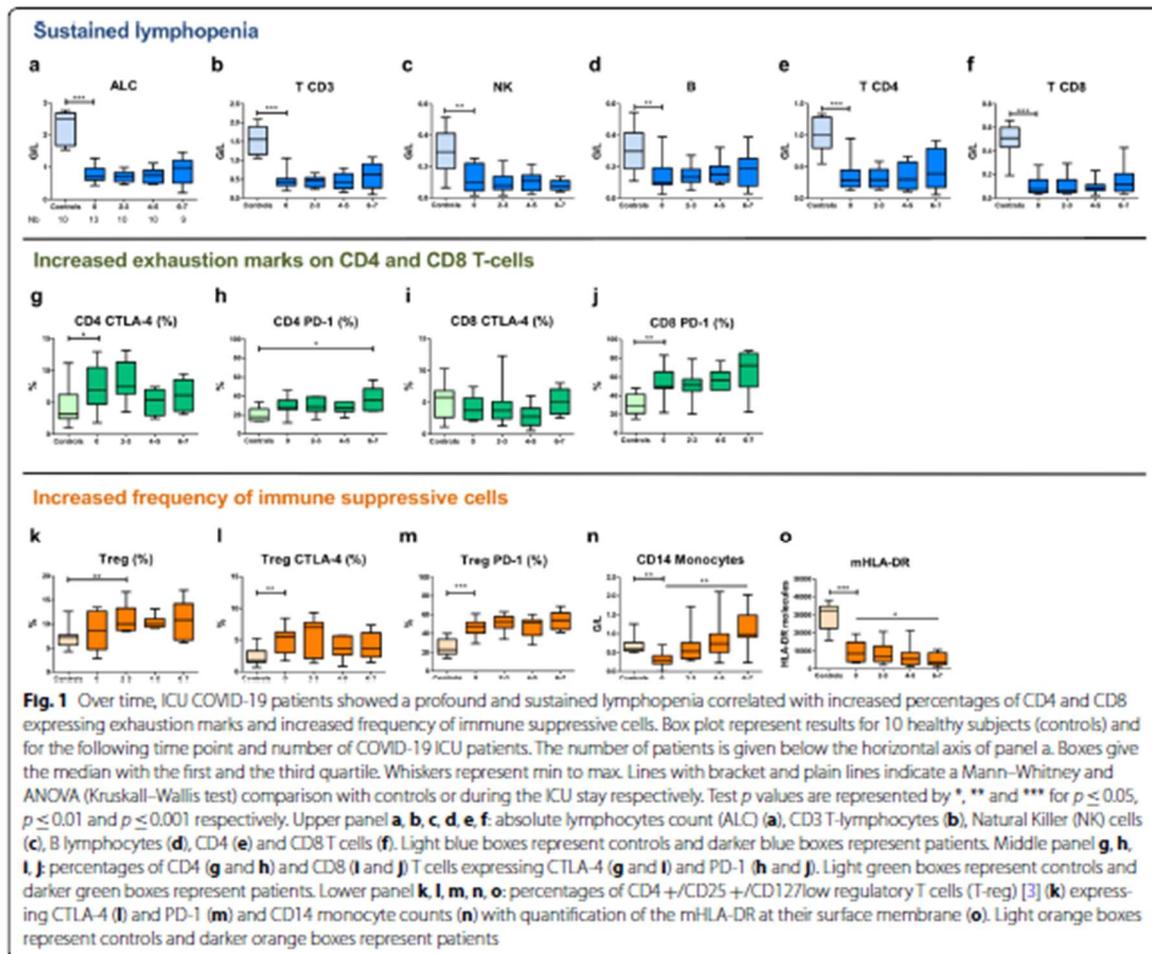
Although our results warrant further confirmation in larger cohort, they strongly suggest a multifaceted devastating effect of the virus to cause depletion of virtually all classes of adaptive immune cells and to cause upregulation of potent T cell killing and immunosuppressive mechanisms in critically-ill COVID-19 patients. Since T cells are essential for definitive viral clearance, these results call into question therapies (e.g., anti-IL-6, corticosteroids, JAK inhibitors) that aim to block the ability of the patient to mount an effective immune response to

\*Correspondence: b.francois@unilim.fr

<sup>5</sup>Réanimation Polyvalente, CHU Dupuytren, 2 Avenue Martin-Luther King, 87042 Limoges, France

Full author information is available at the end of the article  
Robin Jeannet, Thomas Daix and Rémy Formento have contributed equally to this study.





the invading SARS-CoV-2. Knowing that almost all anti-inflammatory therapies have also chronically failed in sepsis, consideration to therapies that boost host immunity in selected severe ARDS ICU patients (e.g., IL-7, IFN- $\gamma$  or checkpoint inhibitors) may be appropriate [5, 6].

#### Electronic supplementary material

The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00134-020-06127-x>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

#### Author details

<sup>1</sup> UMR CNRS 7276, INSERM 1262, Faculty of Medicine, University of Limoges, 87000 Limoges, France. <sup>2</sup> Inserm CIC 1435 & UMR 1092, Dupuytren Teaching Hospital, 87000 Limoges, France. <sup>3</sup> Medical-Surgical Intensive Care Unit, Dupuytren Teaching Hospital, 87000 Limoges, France. <sup>4</sup> Laboratory of Hematology, Dupuytren Teaching Hospital, 87000 Limoges, France. <sup>5</sup> Réanimation

Polyvalente, CHU Dupuytren, 2 Avenue Martin-Luther King, 87042 Limoges, France.

#### Acknowledgements

The authors want to thank the hematology flow cytometry and the virology Laboratories from Limoges as well as the French Reference Laboratory for Herpesviruses, and Prs. Sylvie Rogez and Sophie Alain. The authors acknowledge that without the implication of the nurses from the Clinical Investigation Center this work would not have been possible. They also thank Prs. Philippe Vignon and Richard Hotchkiss for their discussion and proofreading of the letter.

#### Authors' contributions

TD, BF included patients. RJ, RF, JF analyzed the data. RJ, TD drafted the manuscript. JF, BF, and RF reviewed the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

#### Funding

None.

#### Compliance with ethical standards

#### Conflicts of interest

None.

#### Ethics approval

Biological collection Inserm CIC 1435-DC-2008-604.

#### Consent to participate

All patients agreed on the use of anonymized information as per the French law on the General Data Protection Regulation (GDPR).

#### Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Accepted: 19 May 2020

Published online: 08 June 2020

#### References

1. Wang Y, Liu Y, Liu L, Wang X, Luo N, Ling L (2020) Clinical outcome of 55 asymptomatic cases at the time of hospital admission infected with SARS-coronavirus-2 in Shenzhen, China. *J Infect Dis*. <https://doi.org/10.1093/infdis/jaa119>
2. Chen G, Wu D, Guo W, Cao Y, Huang D, Wang H, Wang T, Zhang X, Chen H, Yu H, Zhang X, Zhang M, Wu S, Song J, Chen T, Han M, Li S, Luo X, Zhao J, Ning Q (2019) Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. *J Clin Invest*. <https://doi.org/10.1172/JCI137244>
3. Saison J, Demaret J, Venet F, Chidiac C, Makus C, Poitevin-Later F, Tardy JC, Ferry T, Monneret G (2013) CD4 + CD25 + CD127 - assessment as a surrogate phenotype for FOXP3 + regulatory T cells in HIV-1 infected viremic and aviremic subjects. *Cytometry B Clin Cytom* 84(1):50–54. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21047>
4. Vardhana SA, Wolchok JD (2020) The many faces of the anti-COVID immune response. *J Exp Med* 217(6):e20200678. <https://doi.org/10.1084/jem.20200678>
5. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D (2013) Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect Dis* 13(3):260–268. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70001-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70001-X)
6. Francots B, Jeannot R, Daix T, Walton AH, Shotwell MS, Unsinger J, Monneret G, Rimmelé T, Blood T, Morre M, Gregoire A, Mayo GA, Blood J, Durum SK, Sherwood ER, Hotchkiss RS (2018) Interleukin-7 restores lymphocytes in septic shock: the IRIS-7 randomized clinical trial. *JCI Insight* 3(5):e98960. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.98960>

# SEVERE COVID-19 IS ASSOCIATED WITH DEEP AND SUSTAINED CELLULAR IMMUNOSUPPRESSION

Robin Jeannet, PhD<sup>1,2\*</sup>, Thomas Daix, MD<sup>2,3\*</sup>, Rémy Formento<sup>1,4\*</sup>, Jean Feuillard, MD, PhD<sup>1,4</sup>, Bruno François, MD, <sup>2,3</sup>

## Supplementary materials and methods, tables and legends:

### Supplementary materials and methods

#### *Flow Cytometry and leukocyte subset identification*

Leukocytes populations were counted using a Sysmex XN automate (Sysmex, Kobe, Japan). Flow cytometry was performed using a Navios flow cytometer (Beckman Coulter Diagnostics, Brea, CA).

In brief, all surface staining were done on 100µL of EDTA whole blood. Concentration of WBC was adjusted at  $10 \cdot 10^6$  cells/mL with PBS. Antibodies are listed in supplementary table 2 and were used at concentrations recommended by the supplier. Antibody panel 1 was used to target the following populations: total CD3+ T cells, CD4+ and CD8+ T cells, CD19+ B cells, CD56+ NK cells. Panel 2 was for CD4 and CD8 T-cells, including naïve (CCR7+CD45RO-), central memory (CCR7+CD45RO+), effector memory (CCR7-CD45RO+) and effector (CCR7-CD45RO-) T cells. Regulatory T cells were gated on CD4+CD25+CD127<sup>low</sup> events. Expression of PD-1 and CTLA-4 was studied on these different subsets. Quantification of HLA-DR molecule on monocytes was performed with the antibody from panel 3 according to recommendations of the manufacturer (Quantibrite beads from BD

Bioscience, San Jose, CA). Antibody panel 4 was used for activated CD8 T cells (CD38+ HLA-DR+). Finally, panel 5 was for CD14+ monocytes. Flow cytometry analysis was performed with the Kaluza software (Beckman Coulter). Statistics were done with the Graphpad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA). Comparison between controls and patients were done using the Mann-Whitney test. ANOVA (Kruskal-Wallis) was used for global analysis of the cohort during the ICU stay.

*Functional study:*

Flow cytometry quantification of cytokine production of CD4 and CD8 T-cells was assayed with the Duractive 1 and DuraClone IF T Stimulation and Activation kits (Beckman Coulter) following the manufacturer's protocols for 3 patients at D6-7. Briefly, cells from 50µl of whole peripheral blood were first stimulated for 3h at 37°C with Phorbol-Myristate-acetate (PMA) and Ionomycin in presence of Brefeldin A for inhibition of cytokine secretion. Surface membrane and intracellular labeling were performed as recommended. Kaluza software was used to analyze the results. Results were acquired on the Navios flow cytometer and analyzed with the Kaluza software.

**Supplementary table 1: clinical and biological characteristics of the 13 patients at the ICU admission.**

Criteria	Study population, n=13
Age*	72 [64 – 76]
Gender, n (%):	
- Male	8 (62)
BMI*	26.4 [24.2 – 32]
- BMI > 30 kg m <sup>-2</sup> , n (%):	5 (38)
SAPS II*	31 [27 – 35]
Comorbidities, n (%)	
- Diabetes	3 (23)
- Hypertension	5 (38)
- Chronic respiratory disease	2 (15)
- Chronic heart disease	1 (8)
- Chronic kidney disease	1 (8)
- Immunosuppression	1 (8)
Days from onset of disease to:	
- Hospital admission	7 [5 – 8]
- ICU admission	9 [6 – 12]
Positive RT-PCR at ICU admission, n (%)	13 (100)
Biological at admission:	
- PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub>	122 [81-155]
- Lactate, mmol/l	1.21 [0.93 – 1.31]
- Creatinine, mmol/l	65 [53 -93]
- Bilirubin, μmol/l	6.9 [4.6 – 12.25]
- Platelets, G/L	228 [184 - 277]
Mechanical ventilation, n (%)	10 (77)
Severe ARDS at admission*, n (%)	2 (15)
Severe ARDS at Day 7 <sup>**</sup> , n (%)	8 (80)
Patient with suspected secondary infection before day 7 <sup>**</sup> , n (%)	4 (40)

Patient with suspected secondary infection during ICU stay**, n (%)	7 (70)
Dead at Day 7, n	0
Dead at ICU discharge, n	1

\*: BMI: body mass index; SAPSII: simplified acute physiology score II; ARDS: acute respiratory distress syndrome based on Berlin definition (Ranieri et al, JAMA 2012 Jun 20;307(23):2526-33).

\*\* : Day 3 to day 7 follow up informations are given for the 10 remaining patients.

**Supplementary table 2: antibodies used in the study:**

<b>Panel n°1</b>				
<b>Antigen</b>	<b>Fluorochrome</b>	<b>Clone</b>	<b>Companies</b>	<b>References</b>
CD4	FITC	13B8.2	Beckman Coulter	A07750
CD19	PE	HD37	Beckman Coulter	A07769
TCR $\gamma\delta$		11F2	Beckman Coulter	B49176
CD8	ECD	SFCI21Thy2D35,6,22,23	Beckman Coulter	737659
CD3	PC5.5	UCHT1	Beckman Coulter	B49203
CD56	PC7	NKH-1	Beckman Coulter	A21692
CD10	APC	ABL1	Beckman Coulter	B92400
CD7	AA700	8H8.1	Beckman Coulter	B36290
CD5	AA750	BL1a	Beckman Coulter	B92413
CD16	PB	3G8	Beckman Coulter	B36292
CD45	KO	J.33	Beckman Coulter	B36294

<b>Panel n°2</b>				
<b>Antigen</b>	<b>Fluorochrome</b>	<b>Clone</b>	<b>Companies</b>	<b>References</b>
CD3	PerCp-Cy5.5	UCHT1	Biologend	300430
CD4	PE-Cy7	SK3	BD	557852
CD8	APC-H7	SK1	BD	560179
PD-1 (CD279)	PE	EH12.2H7	Biologend	329906
CTLA-4 (CD152)	BV421	BNI3	BD	562743
CD25	PE-CF594	M-A251	BD	562403
CD127	APC	IL-7R $\alpha$	Biologend	351316
CD45 RO	BB515	UCHL1	BD	564529
CCR7 (CD197)	BV510	3D12	BD	563449

<b>Panel n°3</b>				
<b>Antigen</b>	<b>Fluorochrome</b>	<b>Clone</b>	<b>Companies</b>	<b>References</b>
HLA-DR	PE	L243	BD	340827
CD14	PerCP-Cy5.5	M $\Phi$ P9	BD	

<b>Panel n°4</b>				
<b>Antigen</b>	<b>Fluorochrome</b>	<b>Clone</b>	<b>Companies</b>	<b>References</b>
CD4	FITC	RPA-T4	Biologend	300506
PD-1 (CD279)	PE	EH12.2H7	Biologend	329906
CD3	PerCP/Cy5.5	UCHT1	Biologend	300430
HLA-DR	PE/Cy7	L243	Biologend	307616
CD127	APC	A019D5	Biologend	351316
CD8	APC/Cy7	SK1	Biologend	344714
CD38	BV421	HB-7	Biologend	303526

<b>Panel n°5</b>				
<b>Antigen</b>	<b>Fluorochrome</b>	<b>Clone</b>	<b>Companies</b>	<b>References</b>
CD64	PE	22	Beckman Coulter	IM3601U
CD14	FITC	RM052	Beckman Coulter	B36297
CD3	APC	UCHT1	Beckman Coulter	IM2467
CD16	PC7	3G8	Beckman Coulter	6607118
CD45	KrO	J.33	Beckman Coulter	B36294

## Supplementary legends

Supplementary Figure 1: Levels of total and immature granulocytes. The 4 patients that exhibited transient increase in circulating CD16neg immature granulocytes at day 4-5 are highlighted in red. It is of note that these patients were those for which a secondary bacterial infection was suspected.

Supplementary Figures 2 and 3: COVID-19 CD4 T-cells (Supplementary Figure 2) produced less IFN- $\gamma$  than their healthy counterparts while CD8 T-cells (Supplementary Figure 3) produced more IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  in response to *in vitro* stimulation.

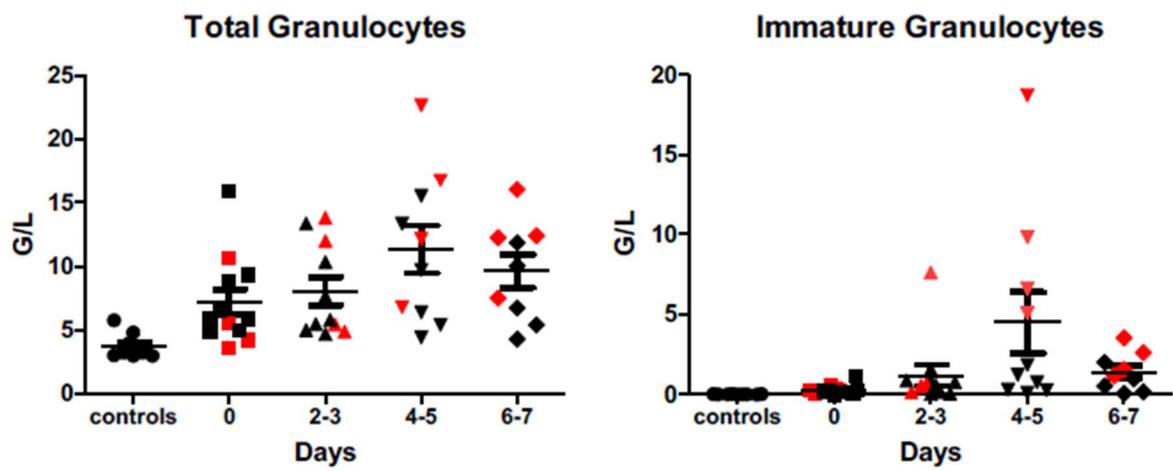
Supplementary Figure 2a, 2b, 3a and 3b: typical biparametric IFN- $\gamma$  / TNF- $\alpha$  (2a and 3a) and IFN- $\gamma$  / IL-2 (2b and 3b) flow cytometry biparametric histograms gated on CD4 and CD8 T-cells respectively for one healthy volunteer (left) and one COVID-19 patient (right).

Supplementary Figure 2c and 3c: percentages of CD4 (2c) and CD8 (3c) T-cells producing IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  (left) or IFN- $\gamma$  and IL-2 (right). Lines indicate means and standards deviation.

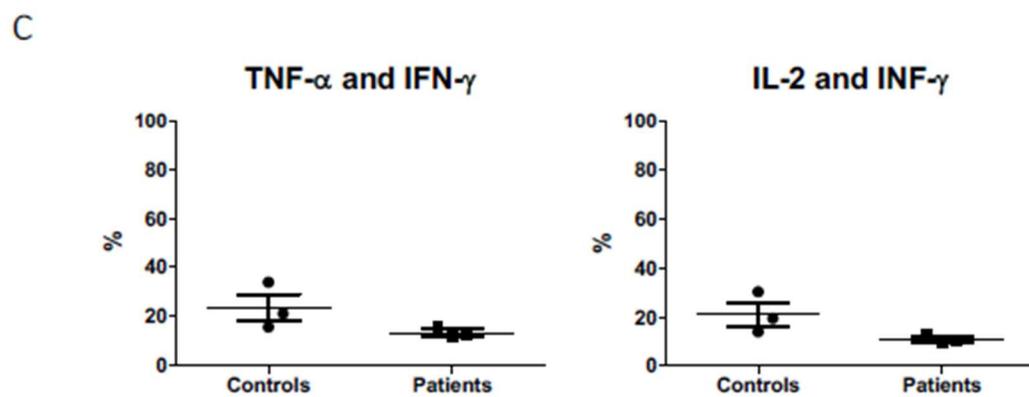
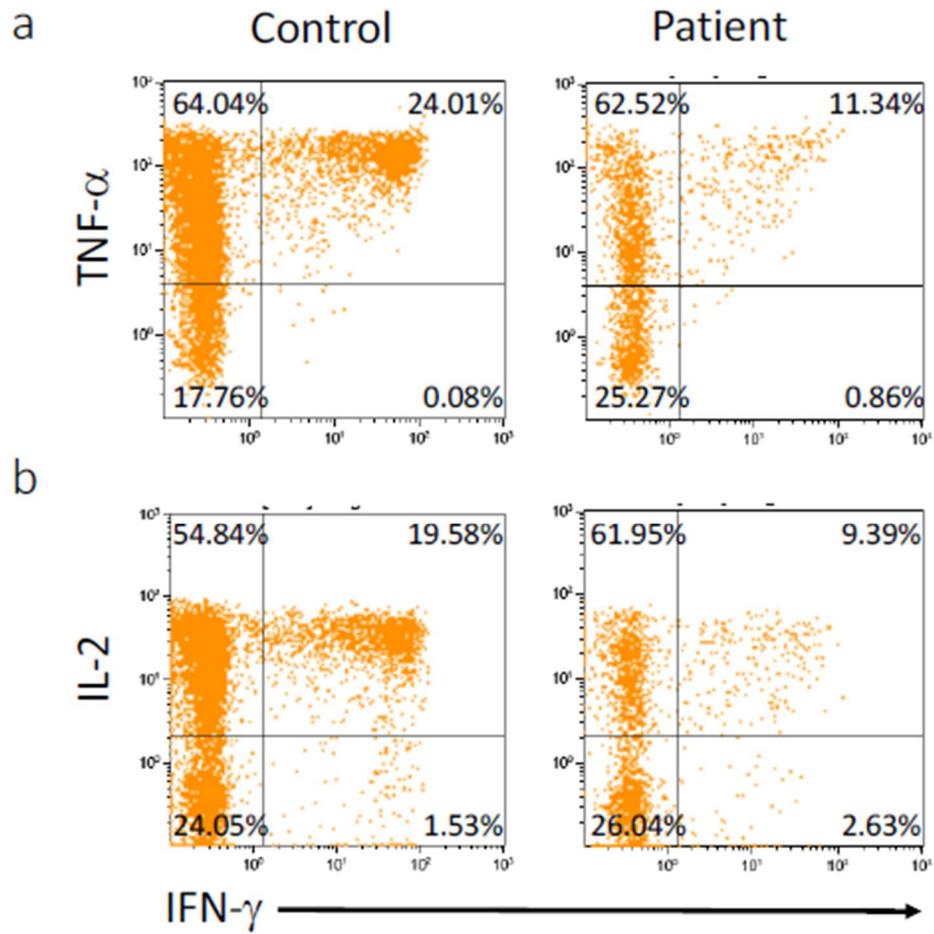
Supplementary Figure 4: T cells subset analysis by flow cytometry of COVID-19 patients reveals decreased proportions of CCR7-/CD45RO- CD4 effector T-cells (a), and increased frequencies of both CCR7-/CD45RO+ effector memory (b) and HLA-DR+/CD38+ activated CD8 T-cells (c) when compared to controls. Percentage of monocyte expressing PD-L1 is increased in patients when compared to control at D2 (note: patient were not analyzed at D4-5 for this marker).

Supplementary Figure 5: plasma levels of IL-6 (a) and IL-8 (b) were moderately but persistently and significantly increased in COVID-19 patients. Cytokine dosages were performed with the Human Inflammatory Cytokines Kit from Becton Dickinson.

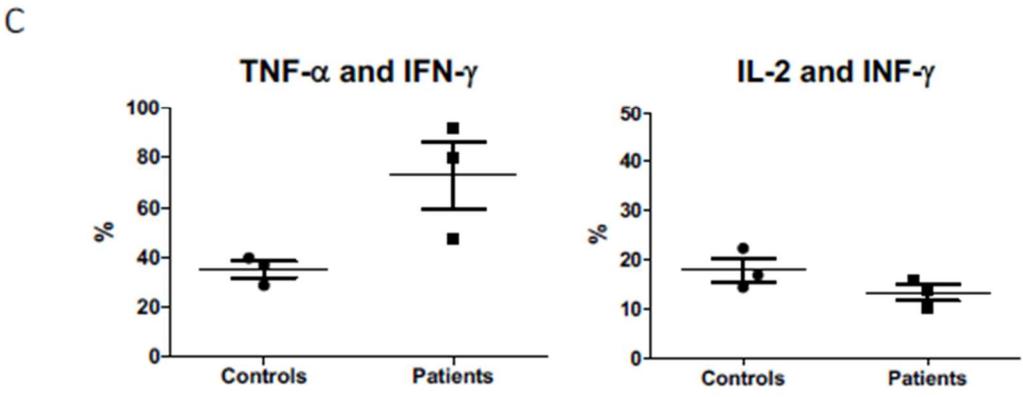
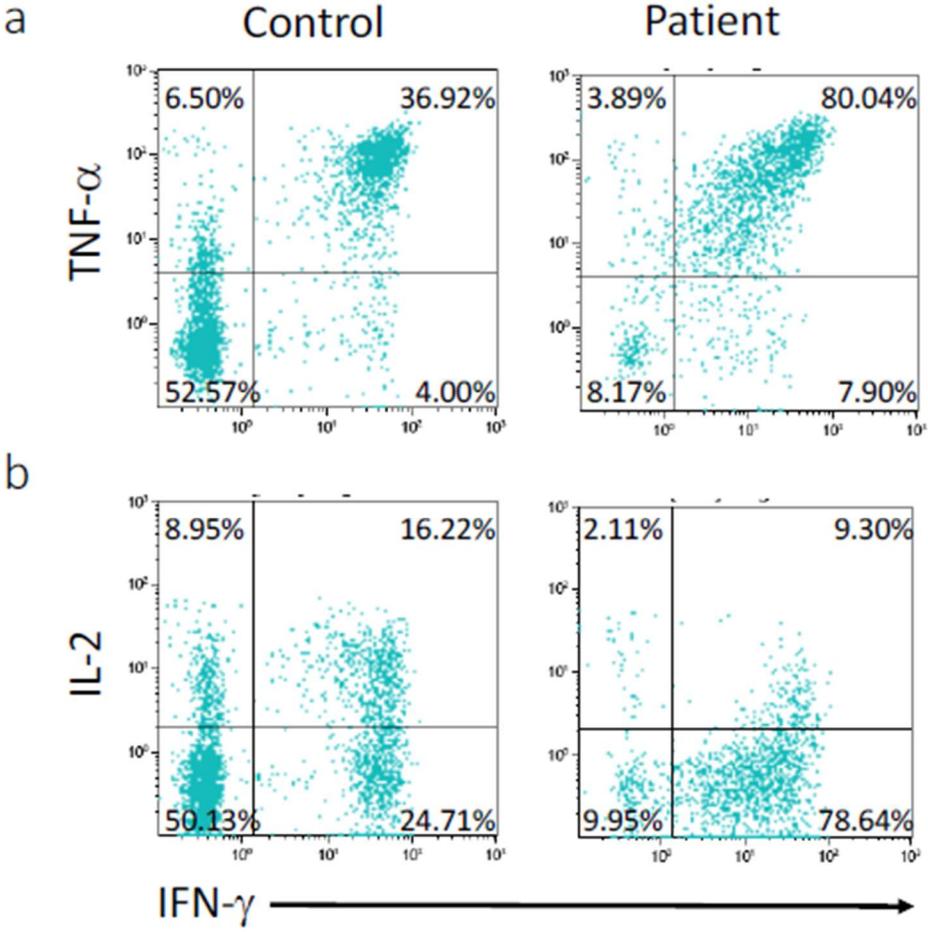
# Supplementary Figure 1



# Supplementary Figure 2

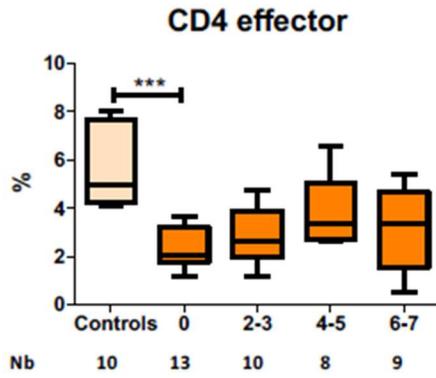


# Supplementary Figure 3

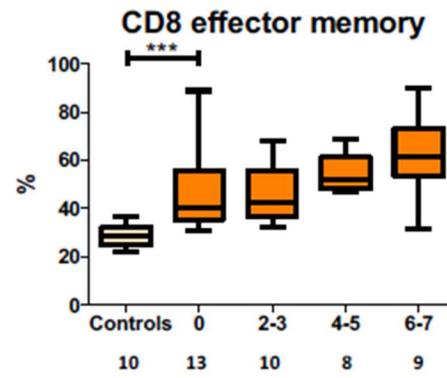


# Supplementary Figure 4

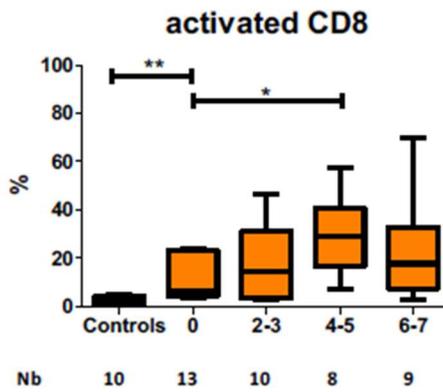
a



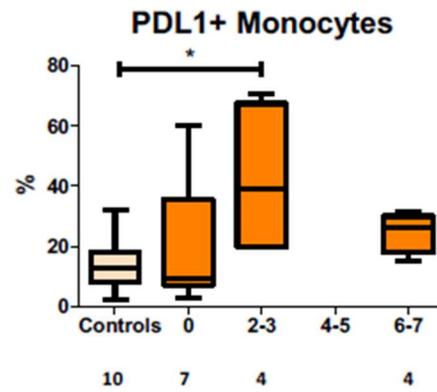
b



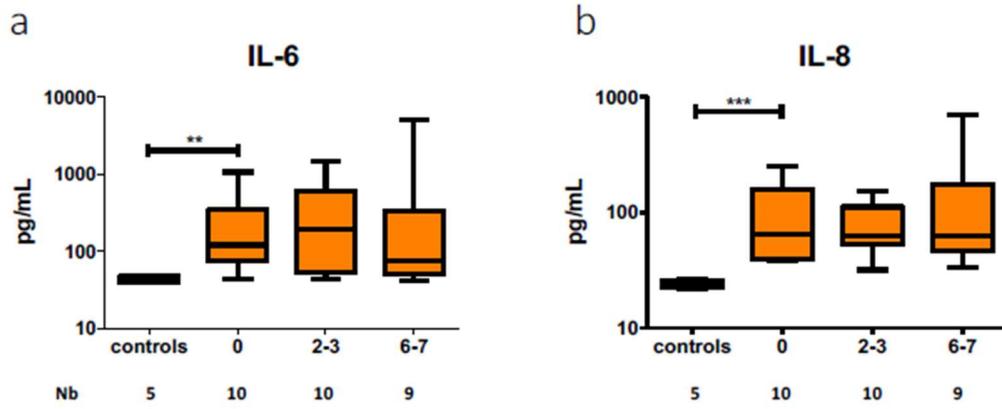
c



d



## Supplementary Figure 5



## Serment De Galien

---

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

## Impact d'une infection sévère au SARS-Cov-2 sur le système immunitaire

---

La pandémie SARS-Cov-2 est une infection touchant le monde entier. De transmission interhumaine, la majorité des patients infectés développent une forme légère à modérée de la maladie et guérissent sans hospitalisation. Cependant, certains patients développent une forme sévère de la maladie avec des symptômes cliniques graves allant jusqu'au syndrome de détresse respiratoire aiguë. Pour ces patients, une hospitalisation en service de réanimation est nécessaire. Mais lors d'une infection, une réponse immunitaire est mise en place. Corrélée avec la morbidité et la mortalité, l'infection par un virus induit un dérèglement de ce système immunitaire. Néanmoins, très peu d'études, au début de la pandémie, ont caractérisé les conséquences de l'infection sur la réponse immunitaire. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés, en Mars 2020 au début de la pandémie en France, à l'impact du SARS-Cov-2 sur les populations lymphocytaires, granulocytaires et monocytaires dans les formes sévères, et à l'expression de points de contrôle inhibiteurs CTLA-4, PD-1 et PD-L1 pendant la première semaine d'hospitalisation en service de réanimation au CHU de Limoges par cytométrie en flux. Nos résultats montrent une lymphopénie profonde et persistante, associée à une augmentation des polynucléaires neutrophiles et des monocytes. Et nous avons une expression augmentée de CTLA-4 sur les différentes populations lymphocytaires dans les premiers jours d'hospitalisation en réanimation. Tandis que l'expression de PD-1 sur les lymphocytes T, et de PD-L1 sur les polynucléaires neutrophiles et les monocytes augmentent plus tardivement au cours de l'hospitalisation en service de réanimation. Pour conclure, nous avons une immunodépression sévère chez ces patients affectant toutes les populations lymphocytaires associée à un dérèglement immunitaire en lien avec l'expression des différents points de contrôles inhibiteurs. A travers ce travail, nous avons pu démontrer une première approche sur l'impact du SARS-Cov-2 sur le système immunitaire.

---

Mots-clés : SARS-Cov-2, lymphocytes, PD-1/PD-L1, CTLA-4

## Impact of severe SARS-Cov-2 infection on the immune system

---

The SARS-Cov-2 pandemic is a worldwide infection. With human-to-human transmission, the majority of infected patients develop a mild to moderate form of the disease and heal without hospitalisation. However, some patients develop a severe form of the disease with severe clinical symptoms up to acute respiratory distress syndrome. For these patients, hospitalisation in an intensive care unit is necessary. But in the case of infection, an immune response is established. Correlated with morbidity and mortality, infection with a virus induces a disruption of the immune system. Nevertheless, very few studies, at the beginning of the pandemic characterised the consequences of the infection on the response immune. This is why we were interested, in March 2020 at the beginning of the pandemic in France, in the impact of SARS-Cov-2 on lymphocyte, granulocyte and monocyte populations in severe forms, and in the expression of inhibitory checkpoints such as CTLA-4, PD-1 and PD-L1 during the first week of hospitalisation in the intensive care unit at the University Hospital of Limoges by flow cytometry. Our results show a profound and persistent lymphopenia, associated with an increase in neutrophils and monocytes. And we have an increased expression of CTLA-4 on the different lymphocyte populations during the first days of hospitalization in intensive care. While PD-1 expression on T cells and PD-L1 expression on neutrophils and monocytes increase later during hospitalization in the intensive care unit. To conclude, we have a severe immunodepression in these patients affecting all lymphocyte populations associated with immune dysregulation related to the expression of inhibitory checkpoints. Through this work, we have demonstrated a first approach on the impact of SARS-Cov-2 on the immune system.

---

Keywords : SARS-Cov-2, lymphocytes, PD-1/PD-L1, CTLA-4

