

École Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

INSERM UMR-S 1109

THÈSE présentée par :

Floriane GALLAIS

soutenue le : **22 juin 2022**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline / Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé - Virologie

**Étude fonctionnelle de l'immunité adaptative
post-infectieuse et post-vaccinale
dirigée contre le SARS-CoV-2**

THÈSE dirigée par :

Mme FAFI-KREMER Samira

PU-PH, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme LAUNAY Odile

PU-PH, Université Paris Cité

M. LINA Bruno

PU-PH, Université de Lyon

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Mme SOULAS-SPRAUEL Pauline

PU-PH, Université de Strasbourg

MEMBRE INVITÉ :

M. KESSLER Romain

PU-PH, Université de Strasbourg

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde reconnaissance à ma directrice de thèse **Madame le Professeur Samira Fafi-Kremer**, qui m'a accueillie dans son équipe et encadrée pour ce travail dès la fin de l'internat il y a maintenant plus de trois ans. Je vous remercie pour la confiance que vous m'avez accordée, votre soutien, votre écoute, vos conseils avisés mais aussi votre enthousiasme communicatif qui m'aura transmis le virus de la recherche.

Je remercie vivement et avec un profond respect **Madame le Professeur Odile Launay** et **Monsieur le Professeur Bruno Lina** qui m'ont fait l'honneur d'accepter la charge de rapporteurs externes pour juger ce travail. Merci à vous pour me faire bénéficier de votre expertise scientifique et pour le temps consacré à l'examen de ce manuscrit de thèse et à la soutenance, que je sais très précieux au vu de votre investissement au cours de la pandémie.

Je souhaite également remercier **Madame le Professeur Pauline Soulas-Sprauel**, qui a accepté de juger ce travail en tant qu'examinatrice interne. Vous avez posé les bases de mes connaissances en immunologie avec une grande pédagogie au cours de vos enseignements à la faculté de pharmacie de Strasbourg, qui ont pu être mises à profit au cours de ce travail de thèse.

Je voudrais exprimer toute ma gratitude à **Monsieur le Professeur Romain Kessler** pour avoir bien voulu prendre part à mon jury de thèse. Vous avez suivi mon parcours dès mes premiers pas en recherche au laboratoire de Virologie, en ayant toujours à cœur de favoriser l'accomplissement de nos projets portant sur les patients suivis dans votre service de pneumologie. Nos échanges et votre expérience ont été pour moi riches d'enseignements sur les aspects cliniques de la transplantation pulmonaire. Notre collaboration étroite établie au cours de ces années sera j'en suis sûre la base de beaux projets à venir.

Ce travail n'aurait pas été possible sans les **patients** et les **personnels soignants** de l'Hôpital de Strasbourg qui ont donné leur accord et de leur temps pour participer aux projets de recherche présentés ici. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma gratitude.

Une partie de ce travail a été réalisée en collaboration avec l'Institut Pasteur. Je voudrais ici remercier **Madame le Docteur Delphine Planas**, **Monsieur le Docteur Timothée Bruel**, **Monsieur le Professeur Olivier Schwartz** et **Monsieur le Professeur Arnaud Fontanet** pour leur aide et leur disponibilité, en particulier pour la réalisation des tests de neutralisation sur virus entier.

Un très grand merci à **Monsieur le Docteur Benjamin Renaud-Picard**, interlocuteur privilégié du service de pneumologie, pour son investissement et sa grande disponibilité ainsi que nos discussions très constructives et teintées d'un enthousiasme partagé. C'est un réel plaisir de travailler avec toi tant sur le plan humain que scientifique et j'ai hâte que l'on poursuive nos projets communs.

Que **Madame Françoise Klein**, infirmière coordinatrice des transplantations pulmonaires, trouve aussi ici l'expression de ma reconnaissance pour son temps accordé à la collecte rétrospective des données vaccinales réalisée en un temps record, ainsi que pour son implication dans l'étude BKV-pneumo initiée en début de thèse avant l'émergence du SARS-CoV-2.

Je souhaiterais plus largement remercier tout le **personnel des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg impliqué dans l'étude SéroCoVHUS**, en particulier au sein du CIC, du service de Médecine du Travail, de l'UCBEC, et bien sûr des laboratoires de biochimie et de virologie et de la DRCI, dont la mobilisation a permis l'inclusion et le suivi d'un nombre important de participants malgré le contexte d'activité intense avec la pandémie.

Un grand merci également aux équipes de **technicien-ne-s de sérologie et de biologie moléculaire de virologie**, ainsi qu'aux **secrétaires** et aux **glimsettes** du Plateau Technique de Microbiologie, pour votre investissement professionnel et vos sourires aux quotidiens.

Merci à tous les **membres de notre unité de recherche UMR_1109**, notamment pour nos échanges instructifs lors de nos séminaires.

Je remercie très chaleureusement tous les membres de l'Institut de Virologie qui m'ont soutenue et encouragée ces trois dernières années, en particulier à mes collègues biologistes **Morgane Solis, Aurélie Velay, Pierre Gantner, Elodie Laugel, Marie-Josée Wendling**, ainsi qu'à **Véronique Christ** et **Eric Soulier**. Merci pour vos conseils et votre aide précieuse au cours de ce travail réalisé en équipe, mais aussi pour votre sympathie et nos pauses café souvent animées qui s'ensuivent généralement d'un joli pic d'insuline.

Je remercie mes collègues microbiologistes **Pierre Boyer** et **Julie Denis** pour le partage de nos instants de stress, de nos doutes mais aussi pour nos moments de rires qui égayent nos journées au quotidien.

Je tiens aussi à remercier les personnes qui ont été de passage à l'Institut de Virologie et sont parties voler vers d'autres horizons. Merci à **Florian Pierre** pour son soutien indéfectible et à nos stagiaires qui ont contribué à l'accomplissement de ce travail, en particulier **Charlotte Nazon, Lauryne Bas dit Nugues, Emeline Chedoz, Ambre Schmitt** et **Léa Tokgoz**. L'enchaînement des Ficoll à un rythme aussi soutenu n'aurait pas été envisageable sans votre aide. Merci enfin à **Ilies Benotmane**, co-thésard de la première heure, qui bien que revenu à la clinique a toujours un pied dans le laboratoire et permet une collaboration étroite avec le service de néphrologie. Bon courage pour la dernière ligne droite, on fêtera ça à l'automne !

À ma belle-famille en qui j'ai trouvé un second foyer, un grand merci pour m'avoir accueillie à bras ouverts il y a maintenant plus de quinze ans, pour votre gentillesse et pour tous ces moments conviviaux très chaleureux que nous avons partagé.

À ma famille, merci pour votre soutien et pour avoir toujours été présents dans les moments importants.

À mon chat Katniss, merci pour toutes ces heures passées à mes côtés lors de la rédaction de ce manuscrit et pour nos pauses câlins sources d'inspiration.

À Olivier, difficile de résumer en quelques lignes ce que tu m'apportes depuis tant d'années. Merci infiniment pour l'histoire que nous construisons chaque jour, pour m'aimer comme je suis, pour me faire sentir capable de prendre des chemins que je n'aurais pas cru possibles, pour nos discussions où l'on refait le monde, et pour être toi, tout simplement. Je t'aime.

Table des matières

Liste des abréviations.....	4
Liste des figures.....	6
Introduction	8
Revue Bibliographique	11
I. Le SARS-CoV-2.....	11
A. Taxonomie	11
B. Structure	13
1. Génome.....	13
2. Protéines structurales et accessoires.....	14
C. Cycle de réplication	16
1. Entrée virale	16
2. Réplication et expression des gènes viraux	23
3. Assemblage et libération des particules virales.....	25
D. Variabilité génétique et variants du SARS-CoV-2.....	27
1. Mécanismes de variabilité génétique	27
2. Variants du SARS-CoV-2.....	29
II. Caractéristiques de l'infection par le SARS-CoV-2 : la COVID-19.....	41
A. Épidémiologie de la COVID-19.....	41
1. Voies de transmission du SARS-CoV-2	41
2. Périodes de circulation virale au cours de la pandémie	42
3. Taux de mortalité et facteurs de risques de sévérité	44
B. Période d'incubation et contagiosité	45
C. Manifestations cliniques	46
III. Physiopathologie de la COVID-19.....	49
A. Dommages cellulaires induits par le SARS-CoV-2	49
B. Réponse immunitaire développée au cours de l'infection par le SARS-CoV-2	50
1. Réponse immunitaire innée et inflammatoire	50
2. Réponse immunitaire adaptative.....	58
IV. Diagnostic et prise en charge de la COVID-19	77
A. Diagnostic	77
1. Signes paracliniques d'orientation	77
2. Diagnostic virologique.....	78
B. Prise en charge thérapeutique	83

1. Traitements symptomatiques.....	84
2. Traitements anti-inflammatoires.....	84
3. Traitements antiviraux	85
4. Traitements à base d'anticorps anti-SARS-CoV-2	86
V. Prophylaxie contre la COVID-19.....	90
A. Anticorps monoclonaux.....	90
B. Vaccination	91
1. Vaccins disponibles contre le SARS-CoV-2.....	92
2. Schémas de vaccination recommandés en France.....	98
3. Couverture vaccinale	102
4. Immunité vaccinale anti-SARS-CoV-2	104
5. Efficacité vaccinale en vie réelle contre la COVID-19	108
Objectifs de la Thèse.....	111
Partie I : Immunité adaptative développée après infection par le SARS-CoV-2.....	112
I. Recherche d'une immunité cellulaire chez des sujets exposés séronégatifs.....	112
A. Contexte et objectifs de l'étude	112
B. Principaux résultats.....	113
C. Article n°1.....	114
D. Discussion.....	126
II. Étude longitudinale de la réponse humorale et du risque de réinfection au cours de la première année suivant l'infection.....	130
A. Contexte et objectifs de l'étude	130
B. Principaux résultats.....	130
C. Article n°2.....	133
D. Discussion.....	146
III. Caractérisation de l'immunité cellulaire post-infectieuse.....	152
A. Contexte et objectifs de l'étude	152
B. Résultats	153
1. Réponse cellulaire	153
2. Réponse humorale	155
3. Corrélation entre les réponses humorale et cellulaire	157
C. Discussion.....	157
Partie II : Réponse vaccinale chez les patients immunodéprimés.....	160
I. Réponse vaccinale chez les patients traités par rituximab	160
A. Contexte et objectifs de l'étude	160
B. Principaux résultats.....	161
C. Article n°3.....	163

D. Discussion.....	172
II. Réponse vaccinale chez les patients transplantés pulmonaires.....	176
A. Contexte et objectifs de l'étude	176
B. Principaux résultats.....	177
C. Article n°4.....	179
D. Discussion.....	211
Partie III : Caractérisation de l'immunité anamnétique dans deux cas d'infection post-vaccinale.....	215
I. Contexte et objectifs de l'étude	215
II. Principaux résultats	217
III. Article n°5.....	218
IV. Discussion.....	229
Conclusion et perspectives	232
Références.....	236
Annexes	262

Liste des abréviations

ACE2 : Enzyme de conversion de l'angiotensine de type 2
ADE : *Antibody-dependant enhancement*
AND : Acide désoxyribonucléique
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : ARN messenger
BAU : *Binding antibody units*
BCR : *B-cell receptor*
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
CMIA : *chemiluminescent microparticule immunoassay*
COVID-19 : *Coronavirus Disease 2019*
DAMPs : *Damage-Associated Molecular Patterns*
DMVs : Vésicules à double membrane
ELISA : *Enzyme-linked immunosorbent assay*
HAS : Haute Autorité de Santé
HCoV : Coronavirus humains
HR : Heptapeptide de séquence répétée
ICTV : Comité International de Taxonomie des Virus
IFN : Interféron
IFNARs : *Interferon alpha-beta receptors*
IC50 : Concentration inhibitrice à 50%
IC95 : Intervalle de confiance à 95 %
IL : Interleukine
IQR : Interquartile
IRF3 : *Interferon regulatory factor 3*
ISG : *Interferon-Stimulated Genes*
LT : Lymphocytes T
LTfh : Lymphocytes T auxiliaires folliculaires (*follicular helper*)
MERS-CoV : *Meadle-East respiratory syndrome coronavirus*
Myd88 : *Myeloid differentiation primary response 88*
nsp : Protéine non structurale
nt : Nucléotide
NFκB : *nuclear factor kappa B*
NK : *Natural killer*
NTD : *N-terminal domain*
OR : Odds Ratio ajusté
ORF : *Open reading frame*

OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PAMPs : *Pathogen associated molecular patterns*
PBMCs : *Peripheral blood mononuclear cells*
Protéine E : Protéine d'enveloppe
Protéine M : Protéine de membrane
Protéine N : Protéine de nucléocapside
Protéine S : Protéine de spicule (*spike*)
PRRs : *Pattern recognition receptors*
RBD : *Receptor binding domain*
RBM : *Receptor binding motif*
RdRp : ARN polymérase ARN-dépendante
RE : Réticulum endoplasmique
RLRs : Hélicases du groupe des *RIG-I-like receptors*
RTC : Complexe de réplication et de traduction
RT-PCR : *Reverse transcription polymerase chain reaction*
S1 : Sous-unité S1 de la protéine de spicule
S2 : Sous-unité S2 de la protéine de spicule
SARS-CoV : *Severe acute respiratory syndrome coronavirus*
SARS-CoV-2 : *Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*
SFU : *Spot forming units*
SDRA : Syndrome de détresse respiratoire aigu
SpO₂ : Saturation pulsée en oxygène
TCR : *T-cell receptor*
TNF-α : *Tumor necrosis factor alpha*
TLR : *Toll-like receptor*
TMPRSS2 : Protéase sérine transmembranaire 2
TRIF : *TIR domain-containing adaptor inducing interferon-beta*
TP : Patients transplantés pulmonaires
TRS : Séquences de régulation de la transcription
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine
VOC : *Variant of concern*
VOI : *Variant of interest*

Liste des figures

Figure 1 : Structure du SARS-CoV-2.....	13
Figure 2 : Protéines exprimées à partir du génome du SARS-CoV-2.....	14
Figure 3 : Structure de la protéine de spicule (S).....	17
Figure 4 : Sites de clivage protéolytique de la glycoprotéine S.	19
Figure 5 : Expression du récepteur ACE2 au niveau du tractus respiratoire.	20
Figure 6 : Étapes de l'internalisation virale dans la cellule hôte par fusion.....	23
Figure 7 : Mécanisme de réplication et de transcription discontinue des coronavirus.	25
Figure 8 : Cycle viral du SARS-CoV-2.....	26
Figure 9 : Impact de la mutation D614G sur la conformation du RBD de la protéine S.	29
Figure 10 : Evolution des proportions de variants du SARS-CoV-2 en France.	34
Figure 11 : Mutations des variants préoccupants du SARS-CoV-2 sur la protéine S.	35
Figure 12 : Mutations communes et spécifiques présentes dans le gène de la protéine S des sous-lignages BA.1 et BA.2 du variant omicron.....	37
Figure 13 : Mutations clés dans la RBD intervenant dans la virulence et l'échappement immunitaire des variants préoccupants du SARS-CoV-2.....	37
Figure 14 : Arbre phylogénétique positionnant le variant omicron par rapport aux variants précédents.	38
Figure 15 : Évolution du nombre de patients positifs à la COVID-19 hospitalisés au sein des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg au cours de la pandémie.....	44
Figure 16 : Conséquences potentielles de la formation de syncytia sur la pathogénèse du SARS-CoV-2.....	49
Figure 17 : Voies de signalisation des TLRs et RLRs impliquées dans la réponse immunitaire innée contre le SARS-CoV-2.....	54
Figure 18 : Impact du délai et de la force de la réponse interféron sur l'élimination du SARS-CoV-2 et le développement de l'immunité adaptative.	56
Figure 19 : Signaux d'activation du lymphocytes T par la cellule dendritique mature.....	59
Figure 20 : Polarisation des lymphocytes T CD4.....	61
Figure 21 : Fréquence et spécificité des cellules T dirigée contre les protéines structurales et accessoires du SARS-CoV-2 pendant la phase de guérison suite à une forme légère ou sévère de COVID-19.....	64
Figure 22 : Distribution des épitopes CD4 et CD8 dérivés d'antigènes du SARS-CoV-2.	66
Figure 23 : Régions antigéniques ciblées par l'immunité cellulaire dans la protéine S.....	67
Figure 24 : Dynamique de la maturation des lymphocytes B dépendante des lymphocytes T dans le centre germinatif.	71
Figure 25 : Activation des lymphocytes B naïfs ou mémoires.	72

Figure 26 : Fonctions effectrices principales des anticorps.....	74
Figure 27 : Principe du test antigénique.	79
Figure 28 : Suivi longitudinal de 9 patients atteints de formes légères de COVID-19 par RT-PCR et par culture virale.	80
Figure 29 : Recommandations de traitement de la COVID-19 émises par l’OMS le 22 avril 2022.	89
Figure 30 : Principe du développement d’une réponse immunitaire vaccinale.	91
Figure 31 : Principaux types de vaccins développés contre le SARS-CoV-2.	92
Figure 32 : Mécanisme d’action des vaccins basés sur l’ARN messager.....	93
Figure 33 : Principe des vaccins basés sur une vectorisation par adénovirus.....	96
Figure 34 : Stratégie de prévention de la COVID-19 chez les patients sévèrement immunodéprimés.....	101
Figure 35 : Nombre de personnes vaccinées en France au cours du temps.....	103
Figure 36 : Cumul des premières et secondes injections vaccinales en France.....	103
Figure 37 : Cinétique de la réponse humorale contre le SARS-CoV-2 après primo-vaccination homologue ou hétérologue.....	105
Figure 38 : Neutralisation de pseudo-particules du SARS-CoV-2 de la souche avec mutation D614G et du variant omicron après vaccination par le vaccin mRNA-1273.	106
Figure 39 : Relation entre les titres en anticorps neutralisants et la protection vaccinale....	107
Figure 40 : Efficacité vaccinale après une primo-vaccination par deux doses de vaccin BNT162b2 (Pfizer/BioNTech) suivie d’un rappel avec vaccin à ARNm.	110
Figure 41 : Réponse cellulaire par ELISPOT IFN- γ contre les protéines structurales et accessoires du SARS-CoV-2.....	154
Figure 42 : Corrélation entre les réponses cellulaires dirigées contre les protéines S (fractions N- et C-terminales, S1 et S2), N et M.	155
Figure 43 : Résultats de sérologie quantitative en IgG anti-RBD en fonction de l’âge.....	156
Figure 44 : Corrélation entre les titres en anticorps neutralisants et les concentrations en IgG anti-RBD.....	156
Figure 45 : Corrélation de la réponse cellulaire anti-S1 avec la concentration en IgG anti-RBD et le titre en anticorps neutralisants.	157

Introduction

Il y a maintenant plus de 2 ans, le 31 décembre 2019, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) déclarait l'apparition de plusieurs cas d'une épidémie de « pneumonie virale d'origine inconnue » à Wuhan, dans la province d'Hubei en Chine. Les patients présentaient des symptômes peu spécifiques (fièvre, toux, dyspnée et courbatures) et des lésions pulmonaires visibles à l'imagerie (1). L'agent infectieux responsable a été identifié dès le 9 janvier 2020 comme un nouveau coronavirus, grâce au séquençage réalisé à partir de liquide de lavage broncho-alvéolaire de patients infectés. La séquence complète du génome viral a été partagée deux jours plus tard par les autorités chinoises, alors que le pays enregistrait son premier décès lié à l'infection. Ce nouveau virus a alors été temporairement appelé 2019-nCoV (*2019 novel coronavirus*), avant d'être officiellement nommé « SARS-CoV-2 » (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*) un mois plus tard (2). L'OMS a opté pour une dénomination différenciée de la maladie impliquant ce virus, appelée COVID-19 (*Coronavirus Disease 2019*), principalement pour éviter le risque de confusion avec l'épidémie de SARS (*Severe Acute Respiratory Syndrome*) survenue en Chine en 2003.

Dès le mois de janvier 2020, l'OMS exprimait son inquiétude face à l'émergence de ce nouveau virus, au vu de la rapidité de l'augmentation du nombre de cas et de l'annonce des premiers décès. Le 30 janvier 2020, la Chine signalait déjà 7711 cas et 170 décès, avec une propagation du virus à toutes les provinces chinoises. Très rapidement, des cas ont été identifiés à l'étranger, d'abord dans les pays voisins (Japon, Corée du Sud, Thaïlande), puis sur l'ensemble des autres continents. Ainsi, les premiers cas ont été décrits le 21 janvier aux Etats-Unis, le 24 janvier 2020 en France (premier pays européen touché), le 25 janvier en Australie et le 14 février en Egypte. S'en est suivie une flambée du nombre de cas, conduisant l'OMS à déclarer le stade de pandémie le 11 mars 2020 alors que 121 000 cas avaient déjà été rapportés à travers le monde. En France, un rassemblement religieux réunissant plus de 2000 personnes entre le 17 et le 24 février à proximité de Mulhouse dans le Grand Est a été

à l'origine d'un cluster très important qui a probablement joué un rôle majeur dans l'expansion précoce du virus sur le territoire national. Devant l'explosion des contaminations et la saturation des hôpitaux, un confinement strict a été instauré par le gouvernement français le 17 mars 2020, marquant de façon brutale la bascule vers la première période intense de la pandémie. La suite a été marquée par l'alternance de périodes d'accalmies et de circulation virale active de durée et d'intensité variables, motivant la mise en place et l'adaptation des mesures sanitaires. La pandémie est aujourd'hui toujours en cours, avec près de 500 millions de contaminations et plus de 6 millions de décès rapportés à travers le monde (dont 2 millions en Europe), ces chiffres étant probablement sous-estimés par rapport à la réalité.

Dès la description de ce nouveau virus, l'ensemble du corpus médical et scientifique s'est mobilisé pour contribuer dans l'urgence à la gestion de la crise sanitaire, mais aussi à l'effort de recherche sans précédent entrepris pour améliorer la connaissance de l'infection et la prise en charge des patients infectés. De nombreux projets de recherche ont également été amorcés pour la mise au point d'un vaccin, perçu d'emblée comme un outil majeur pour la sortie de la pandémie. Ces projets ont abouti à la commercialisation de plusieurs vaccins un an seulement après la découverte du SARS-CoV-2, ce qui a marqué un tournant dans la gestion de la pandémie. Néanmoins, l'émergence successive de nouveaux variants viraux plus transmissibles et portant des mutations d'échappement au système immunitaire n'a cessé de reculer la perspective d'une sortie de crise.

Dans ce contexte, la caractérisation de l'immunité dirigée contre le SARS-CoV-2 apparaît comme un enjeu crucial, d'une part sur le plan individuel pour évaluer le niveau de protection de chacun face à une nouvelle infection, et d'autre part sur le plan collectif pour contribuer à l'adaptation des mesures de protection.

Dans une première partie bibliographique, nous présenterons le virus SARS-CoV-2 et ses principaux variants, puis les caractéristiques, la physiopathologie et la prise en charge de la COVID-19, et enfin les stratégies prophylactiques mises en œuvre pour faire face à la pandémie avec en particulier la vaccination. Dans une seconde partie, les résultats des

travaux réalisés au cours de cette thèse portant sur l'étude de l'immunité adaptative post-infectieuse et post-vaccinale seront présentés et discutés au regard des données de la littérature.

Revue Bibliographique

I. Le SARS-CoV-2

A. Taxonomie

Le virus responsable de la pandémie actuelle de COVID-19 est un nouveau coronavirus identifié pour la première fois chez l'Homme en décembre 2019. Ainsi, il a été officiellement nommé « SARS-CoV-2 » (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*) par le Comité International de Taxonomie des Virus (ICTV) le 11 février 2020, du fait de sa proximité génétique (79,6 % d'homologie de séquence) avec le SARS-CoV (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus*) (3). Le SARS-CoV-2 appartient à la grande famille des *Coronaviridae* classée au sein du sous-ordre des *Cornidovirineae* et de l'ordre des *Nidovirales* (4). Cette famille est subdivisée en deux sous-familles, les *Letovirinae* et les *Orthocoronavirinae*, cette dernière comportant quatre genres de coronavirus, à savoir les alphacoronavirus (α -CoV) et les betacoronavirus (β -CoV), qui infectent les mammifères, ainsi que les gammacoronavirus (γ -CoV) et les deltacoronavirus (δ -CoV) infectant essentiellement les oiseaux.

Il existe une grande diversité de coronavirus avec 2 505 virus décrits à ce jour, répartis en 49 espèces dont 19 au sein des α -CoV et 14 au sein des β -CoV, certains infectant l'Homme et d'autres les animaux (porcs, chats, chiens, chevaux, chauves-souris, rongeurs, etc.). Six coronavirus humains (HCoVs) avaient déjà été identifiés avant la pandémie, dont deux α -CoV (HCoV-229E et HCoV-NL63) et 4 β -CoV (HCoV-OC43, HCoV-HKU1, SARS-CoV et MERS-CoV (*Meadle-East Respiratory Syndrome Coronavirus*)). Les quatre coronavirus endémiques saisonniers que sont HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-OC43 et HCoV-HKU1 n'infectent généralement que les voies aériennes supérieures et entraînent des symptômes respiratoires légers. Ces coronavirus banaux sont responsables de 30 % des épisodes de rhume. À l'inverse, le SARS-CoV et le MERS-CoV ciblent le parenchyme pulmonaire et sont hautement pathogènes sur le plan respiratoire. Ainsi, le SARS-CoV apparu en Chine a été à l'origine de

la première pandémie impliquant un coronavirus en 2002-2003 avec plus de 8 000 cas décrits et 10 % de mortalité, et le MERS-CoV apparu dans la péninsule arabique en 2012 circule encore localement entraînant plus de 30 % de mortalité.

Le SARS-CoV-2 a également été classé dans le genre des betacoronavirus et appartient au sous-genre des *Sarbecovirus*, qui regroupe avec lui le SARS-CoV, la majorité des coronavirus de chauves-souris et quelques coronavirus hébergés par les civettes, les pangolins et d'autres animaux. Le SARS-CoV-2 a été catégorisé dans la même espèce taxonomique que le SARS-CoV, appelée *Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus*, sur la base de leur forte homologie de séquence en acides aminés dans les sept domaines conservés de la polyprotéine ORF1a/b (94,4 %) utilisés pour la classification des coronavirus (seuil de 90 % défini par l'ICTV) (3). A l'instar du SARS-CoV, du MERS-CoV, du HCoV-229E et du HCoV-NL63, les analyses phylogénétiques et de séquences comparatives évoquent une émergence du SARS-CoV-2 à partir de chauves-souris, sans que l'hôte intermédiaire ayant permis son franchissement de la barrière d'espèce vers l'Homme n'ait été identifié à ce jour (5).

B. Structure

Le SARS-CoV-2 est un virus sphérique enveloppé de 60 à 140 nm de diamètre. Comme tous les coronavirus, les spicules formés par la protéine à la surface de son enveloppe virale lui confèrent un aspect en couronne en microscopie électronique à l'origine du nom de cette famille (« corona » = couronne en grec). L'enveloppe phospholipidique dans laquelle sont enchâssées les glycoprotéines de surface renferme la protéine de capsid complexée au génome à ARN monocaténaire non segmenté de polarité positive, l'ensemble formant la nucléocapside de symétrie hélicoïdale.

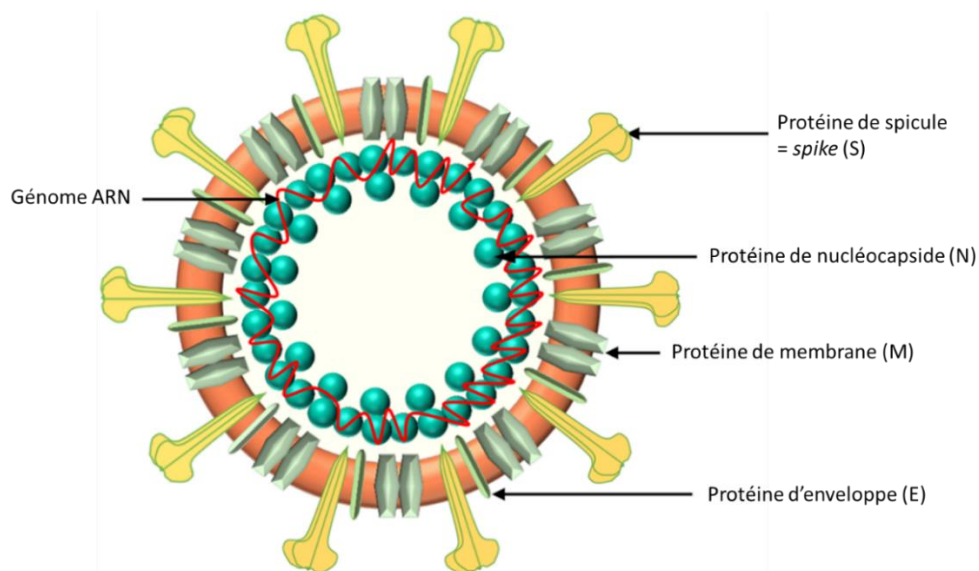


Figure 1 : Structure du SARS-CoV-2.
D'après Zhou et al., *Anim Dis*, 2021 (4).

1. Génome

Le génome des coronavirus de près de 30 000 paires de nucléotides est de taille particulièrement grande comparativement aux autres virus à ARN impliqués en pathologie humaine. Les deux tiers situés en 5' de la séquence du génome du SARS-CoV-2 comportent deux importants cadres ouverts de lecture (*open reading frame, ORF*) appelés ORF1a et ORF1b et traduits en deux polyprotéines, pp1a et pp1ab par décalage de phase de lecture de 1 acide aminé. Ces polyprotéines sont ensuite auto-protéolysées en 16 protéines non

structurales (nsp1-16) formant un vaste complexe de transcription et de réplication (RTC) centré par l'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp). Le tiers restant du génome en 3' est traduit en plusieurs protéines à partir d'ARN subgénomiques synthétisés par le RTC. Ceux-ci codent quatre protéines structurales, à savoir les protéines de spicule (*spike*, S), de membrane (M), de nucléocapside (N) et d'enveloppe (E), ainsi que onze protéines accessoires (3a, 3b, 3c, 3d, 6, 7a, 7b, 8, 9b, 9c, 10) (6).

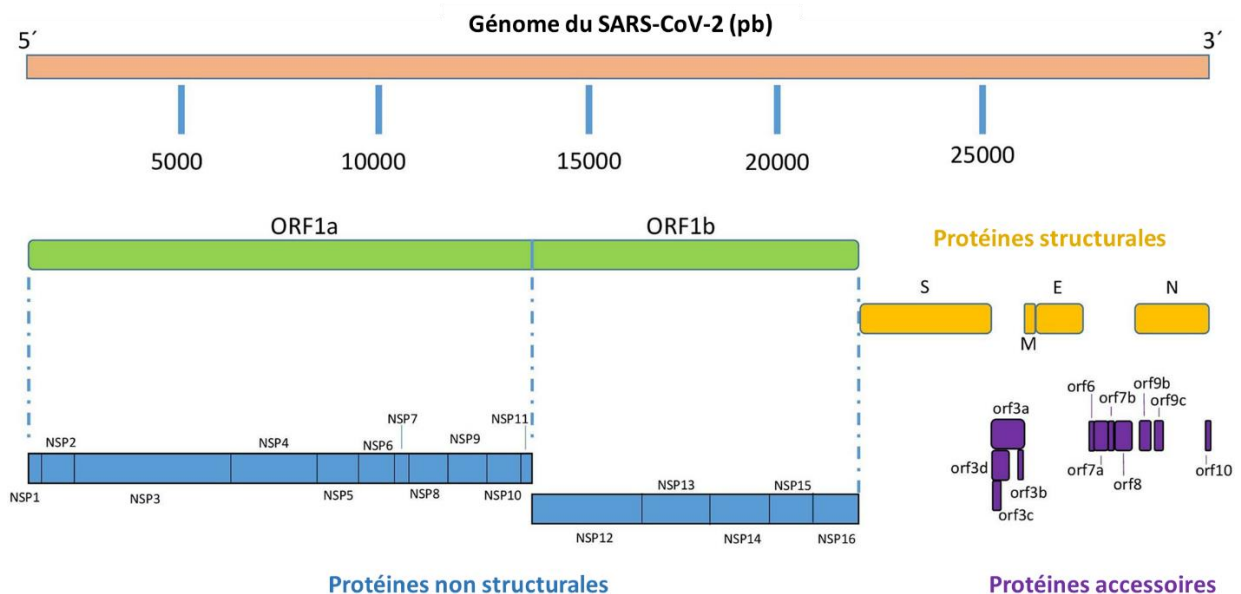


Figure 2 : Protéines exprimées à partir du génome du SARS-CoV-2.
D'après Redondo et al., *Front. Immunol.*, 2021 (6).

2. Protéines structurales et accessoires

La protéine S, d'une taille de 180-200 kDa et très fortement glycosylée, est présente sous forme homotrimerique à la surface des virions et permet l'entrée du virus dans les cellules cibles de l'hôte après attachement aux récepteurs cellulaires, principalement l'enzyme de conversion de l'angiotensine de type 2 (ACE2, *angiotensin-converting enzyme 2*) membranaire. La seconde protéine structurale, la protéine E, est de petite taille (8-12 kDa acides aminés) et représente la moins abondante des protéines enchâssées dans l'enveloppe virale, car l'essentiel de la quantité produite reste intracellulaire au niveau du réticulum endoplasmique (RE) et de l'appareil de Golgi. Cette protéine polyfonctionnelle joue un rôle

important dans l'assemblage, le bourgeonnement et la libération des particules virales, en particulier via une activité de canal ionique (7,8). La protéine M, de 25 à 35 kDa, est quant à elle la plus abondante des protéines associées à l'enveloppe, dans laquelle elle est enchâssée via trois domaines transmembranaires. Elle participe à la morphogénèse des particules virales et à leur assemblage, notamment en favorisant la courbure membranaire, en régulant la localisation cellulaire et la maturation de la protéine S au cours du cycle viral, et en interagissant avec toutes les protéines structurales virales (8,9). Enfin, la protéine N associée à l'ARN génomique est la protéine la plus abondante des coronavirus et sa séquence est bien conservée. Cette phosphoprotéine de 43-50 kDa hautement immunogène est impliquée dans l'encapsidation du génome viral, la modulation des voies de signalisation cellulaire, ainsi que dans la réplication et la transcription du génome en interagissant étroitement avec le NTC et en particulier avec la protéine nsp3 (10–12). Les protéines accessoires ne sont pas indispensables à la réplication du virus en culture cellulaire *in vitro* mais semblent jouer un rôle important dans sa pathogénèse, tel que le suggère la sélection positive de mutations de protéines accessoires dès le début de l'histoire évolutive du SARS-CoV-2 et au sein des séquences de variants préoccupants (VOC, *Variants of Concern*) en circulation (6,13). Bien que leurs rôles ne soient pas encore complètement établis, ces protéines participent à l'échappement du virus au système immunitaire, en particulier en freinant la production et en inhibant les voies de signalisation des interférons (IFN) de type I (ORF3b, ORF6, ORF7a, ORF8 or ORF9b), l'une des premières lignes de défense immunitaire contre les infections virales (6,14). Elles peuvent également perturber des mécanismes cellulaires tels que l'autophagie ou l'apoptose (ORF3a, ORF8), ou encore avoir un effet pro-inflammatoire en favorisant l'activation de l'inflammasome (ORF3a, ORF9b) et la sécrétion de cytokines (ORF3a, ORF7a, ORF8) (6,15).

C. Cycle de réplication

1. Entrée virale

L'entrée du virus regroupe toutes les étapes allant de son contact avec la cellule hôte jusqu'à la libération de son génome à l'intérieur de la cellule. Cette première étape du cycle viral du SARS-CoV-2 est médiée par la protéine S via sa liaison spécifique aux récepteurs cellulaires, principalement l'ACE2, puis via son clivage par des protéases de l'hôte telles que la protéase sérine transmembranaire 2 (TMPRSS2) ou la furine. Du fait de cette fonction centrale et indispensable à l'infection, la protéine S représente une cible privilégiée du système immunitaire et des stratégies prophylactiques et thérapeutiques contre le COVID-19.

1.1. Structure de la protéine S

D'une taille de 180-200 kDa, la protéine S correspond à une glycoprotéine car elle est recouverte de molécules de polysaccharides qui la dissimulent partiellement face au système immunitaire de l'hôte (16). Sous forme de trimère à la surface des particules virales, elle adopte de base une conformation métastable appelée « pré-fusion ». L'interaction avec la cellule hôte entraîne des réarrangements structuraux de la protéine S conduisant à une conformation « post-fusion » permettant la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire. La structure particulière de cette protéine implique plusieurs domaines impliqués dans ce processus.

La protéine S comporte 1273 acides aminés, dont les 13 premiers correspondent à un peptide signal clivé au niveau du RE. Elle est formée de deux sous-unités fonctionnelles :

- La sous-unité S1 (résidus 14 à 685) est responsable de la liaison au récepteur cellulaire. Elle comprend un exodomaine N-terminal (NTD), le domaine de liaison au récepteur (RBD, *receptor binding domain*) (résidus 319-541), et deux domaines C-terminaux (CT1 et CT2).
- La sous-unité S2 (résidus 686 à 1273) est quant à elle nécessaire à la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de la cellule. Elle se compose d'un peptide de

fusion d'environ 20 acides aminés, de deux heptapeptides de séquence répétée (HR1 et HR2), d'un domaine transmembranaire (TM) et d'un endodomaine C-terminal (17).

En termes de structure conformationnelle, la sous-unité S1 constitue la partie externe de la protéine S dont la pointe est formée par le RBD. Elle s'enroule autour de la forme pré-fusion de la sous-unité S2 qui ancre l'ensemble dans l'enveloppe virale. La région RBD oscille entre deux conformations distinctes, ouverte vers le haut (« up ») ou refermée vers le bas (« down »). En position basse, l'interaction du RBD avec l'ACE2 est empêchée par encombrement stérique. Seule la conformation transitoire haute permet l'interaction de la protéine S avec le domaine peptidase N-terminal du récepteur ACE2, via le motif de liaison au récepteur (RBM, *receptor binding motif*) au sein de la RBD (18). L'interface entre ces deux protéines se compose de trois zones de contact (CR1 CR2 et CR3) impliquant principalement des liaisons hydrogènes, des liaisons ioniques et des interactions hydrophobes (19–21), mais faisant également intervenir les glycanes de l'ACE2 et de la protéine S (22–25). Le RBD et le NTD sont les deux principales cibles de la grande majorité des anticorps neutralisants contre le SARS-CoV-2 (26).

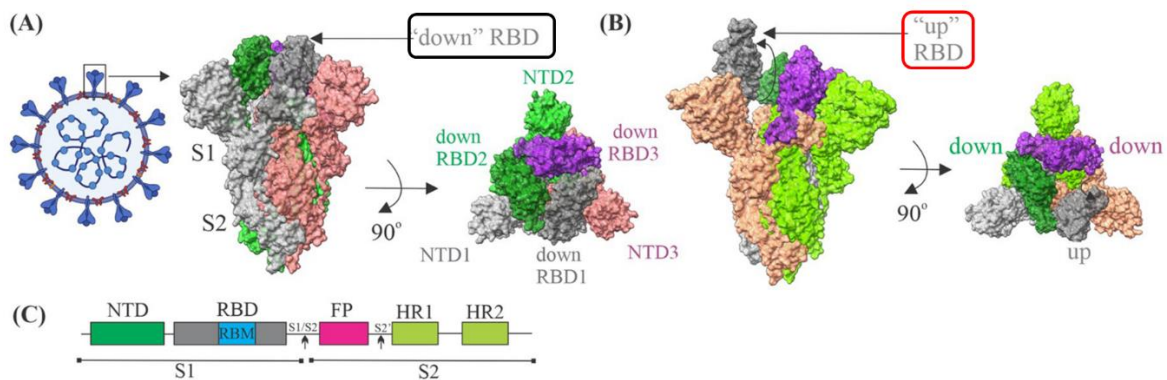


Figure 3 : Structure de la protéine de spicule (S).

(A) : Vue de côté (à gauche) et de haut (à droite) d'un trimère de protéine S avec les trois RBD (en gris, vert foncé et violet) en position basse (« down »). (B) : Vue de côté (à gauche) et de haut (à droite) d'un trimère de protéine S avec un des trois RBD (en gris) en position haute (« up »). (C) : Schéma d'organisation de la protéine S.

D'après Mittal et al., *Plos Pathogens*, 2022 (27).

Suite à l'attachement du SARS-CoV-2 à son récepteur, l'action de protéases cellulaires est nécessaire pour exposer la sous-unité S2 en libérant S1, et modifier sa conformation vers une forme post-fusion. La protéine S comporte deux sites majeurs de clivage par les protéases de l'hôte dont l'action est nécessaire à l'entrée virale (28).

Le premier site se situe à la jonction entre les sous-unités S1 et S2. Ce site polybasique de clivage par la furine est une particularité du SARS-CoV-2, partagée avec d'autres virus pathogènes comme le VIH, les virus H5 et H7 de la grippe aviaire ou encore certains coronavirus humains (HCoV-HKU1, HCoV-OC43, MERS-CoV), mais absente chez le SARS-CoV et les autres coronavirus du genre *Sarbecovirus* (29). Bien que la furine puisse cliver la jonction S1/S2 à la surface de la cellule après attachement du virus à l'ACE2, ce clivage intervient généralement dès la biosynthèse virale dans le réseau transgolgien, ce qui favorise la conformation ouverte du RBD et facilite ainsi la fixation des virions au récepteur ACE2 et l'entrée virale (30,31). Les deux sous-unités S1 et S2 restent cependant liées entre elles sous forme trimérique par des liaisons non covalentes jusqu'à l'attachement à une cellule hôte. Ce clivage précoce induisait néanmoins une instabilité pour la souche originale de Wuhan, avec un risque de perte prématurée de S1 par la particule virale avant sa fixation au récepteur cellulaire. Ceci a été rapidement compensé par la mutation D614G de la souche ancestrale responsable de la première vague en Europe, qui stabilise l'interaction entre les deux sous-unités. L'expression quasi ubiquitaire de protéases furine-like chez l'Homme pourrait expliquer en partie la contagiosité accrue du SARS-CoV-2 par rapport au SARS-CoV (32,33).

Un second site de clivage appelé S2' se situe à l'extrémité N-terminale de la sous-unité S2. Son clivage est nécessaire pour éliminer une courte séquence protéique et exposer le peptide de fusion, permettant ainsi la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de la cellule hôte. Ce site S2' peut être clivé principalement par la protéase serine transmembranaire de type 2 (TMPRSS2) après fixation du virus à son récepteur en cas d'entrée virale par fusion, ou par des cathepsines endosomales en cas d'endocytose virale (28,34).

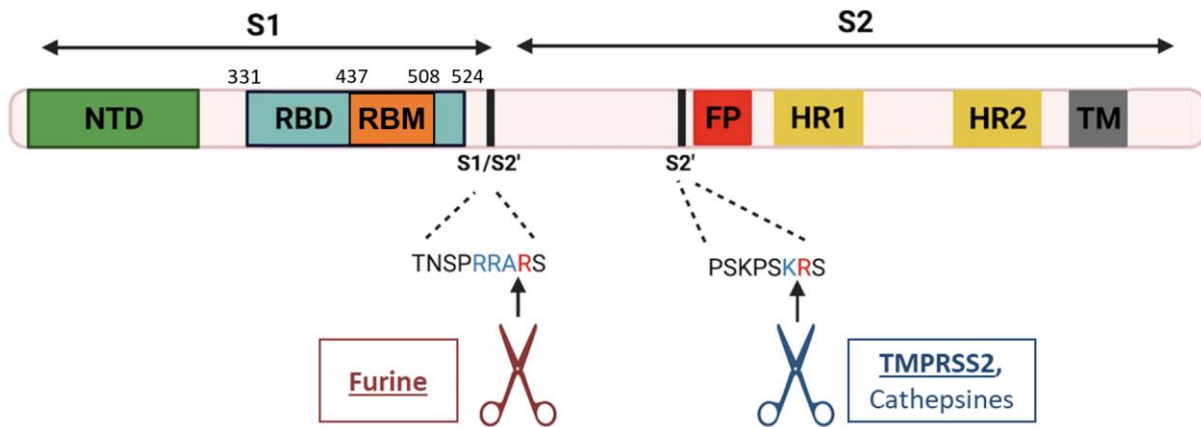


Figure 4 : Sites de clivage protéolytique de la glycoprotéine S.
 D'après Chitsike et al., *Virology Journal*, 2021 (35).

1.2. Récepteurs et tropisme cellulaire

Le SARS-CoV-2 entre dans les cellules hôtes principalement par le récepteur ACE2, avec une affinité 10 à 20 fois plus importante que le SARS-CoV qui utilise également ce récepteur (20,36). Cette métalloenzyme membranaire, dont le rôle est majeur dans la régulation de la pression artérielle et de la fonction cardiaque, est largement exprimée par différentes cellules de l'organisme humain, ce qui détermine le large tropisme cellulaire du SARS-CoV-2. Le site de fixation du SARS-CoV-2 sur l'ACE2 est bien distinct de son site catalytique, les traitements thérapeutiques anti-hypertenseurs ciblant l'ACE2 n'ont donc aucun effet sur l'attachement du virus (37–39). Au début de l'infection, le SARS-CoV-2 pénètre par les voies aériennes supérieures, où le récepteur ACE2 est richement exprimé à la surface des cellules de l'épithélium nasal, comprenant les cellules sécrétrices de mucus (cellules en gobelet) et les cellules nasales ciliées (40,41). Au cours de l'infection, le virus se propage dans le tractus respiratoire vers les bronches et bronchioles en infectant majoritairement les cellules épithéliales bronchiques ciliées et les cellules sécrétoires non ciliées (cellules Club), pour enfin atteindre les poumons (41). Dans les alvéoles pulmonaires, l'ACE2 est principalement exprimée à la surface des pneumocytes de type 2 (42). Ces cellules produisent le surfactant nécessaire au maintien de la structure des alvéoles et possèdent une grande capacité de synthèse protéique avec un RE et un appareil de Golgi très développés. D'autres types

cellulaires expriment également l'ACE2 au sein des alvéoles pulmonaires, à savoir les macrophages alvéolaires et les cellules endothéliales (41,43). L'expression de l'ACE2 décroît graduellement du haut vers le bas du tractus respiratoire, la réplication du SARS-CoV-2 étant donc la plus active au niveau de l'épithélium nasal et notamment de la muqueuse olfactive (44–46).

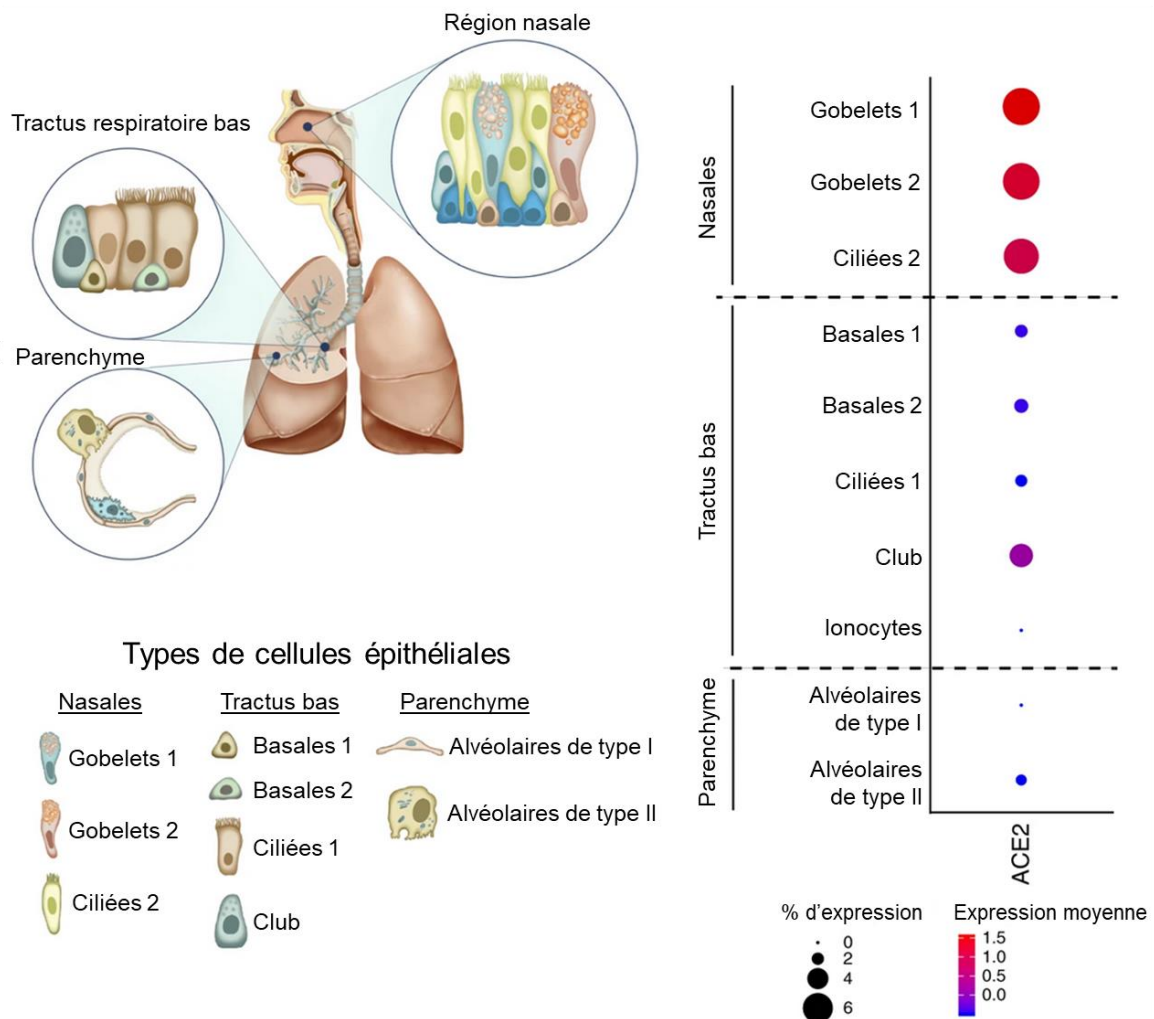


Figure 5 : Expression du récepteur ACE2 au niveau du tractus respiratoire.

Sur la gauche, illustration de la localisation anatomique des différents types de cellules épithéliales dans la région nasale, au niveau du tractus respiratoire bas et du parenchyme pulmonaire. Sur la droite, données d'expression du récepteur ACE2 (analyses réalisées à partir du jeu de données de séquençage d'ARN de Vieira Braga et al., Nat Med, 2019). La taille des points représente le pourcentage de cellules exprimant l'ACE2 et la couleur le niveau d'expression moyen au sein d'un type cellulaire donné.

D'après Sungnak et al., Nat Med, 2020 (40).

Par ailleurs, l'ACE2 est également exprimée dans l'intestin grêle, l'endothélium vasculaire, la cornée, le tissu adipeux, les reins, le cœur, la thyroïde, mais aussi le côlon, le foie, les neurones, les testicules et la vessie (40). L'expression de l'ACE2 à la surface des cellules est accrue chez les patients atteints de COVID-19, probablement du fait que ce gène soit inductible par l'interféron sécrété par les cellules de la réponse immunitaire innée en réponse à l'infection (47). Cependant, une étude récente rapporte que cette expression induite par l'interféron génère des isoformes tronquées d'ACE2 ne permettant plus la liaison du SARS-CoV-2 (48). Par ailleurs, l'hypothèse a été avancée que le risque accru de COVID-19 sévère chez certains patients pourrait s'expliquer par des différences de niveau d'expression d'ACE2. Cependant, la littérature reste ambiguë et parfois contradictoire sur ce sujet, que ce soit au sujet de l'âge (49–53), du sexe masculin (51–53) ou encore des fumeurs (52–56).

En dehors de l'ACE2, d'autres protéines membranaires ont récemment été décrites comme favorisant l'infection en coopération avec l'ACE2 (récepteurs auxiliaires ou cofacteurs) ou comme récepteurs cellulaires alternatifs de la protéine S. Ainsi, l'attachement du SARS-CoV-2 à l'ACE2 est facilité par les héparanes sulfates à la surface cellulaire qui interagissent avec la région RBD de la protéine S et favorisent sa conformation ouverte (18,57). De même, la sous-unité S1 de la protéine S peut se lier aux lipoprotéines de haute densité (HDL). Celles-ci sont ensuite capturées par leurs récepteurs scavenger de classe B type 1 (SRB1), qui facilitent ainsi l'entrée virale dépendante du récepteur ACE2 en augmentant l'attachement cellulaire du SARS-CoV-2 (58). Par ailleurs, le clivage de la protéine S à l'interface entre S1 et S2 par la furine crée sur S1 une séquence peptidique C-terminale à motif polybasique (RRAR) appelé CendR (*C-end rule*), qui permet sa liaison à la neuropiline-1. Ce co-récepteur membranaire est exprimé abondamment dans l'épithélium olfactif et respiratoire et agit comme un médiateur de l'hôte qui potentialise l'infectivité du SARS-CoV-2 en collaboration avec l'ACE2 et TMPRSS2. En effet, la liaison de la séquence RRAR à la neuropiline-1 favorise la suppression de la sous-unité S1 et ainsi l'exposition du site de clivage S2', ce qui facilite l'entrée virale après attachement à la membrane cellulaire (59,60). Enfin, une augmentation de l'entrée virale

a également été décrite via l'attachement du SARS-CoV-2 au CD147, à la protéine GRP78, à certaines lectines de type C (L-SIGN, DC-SIGN) ou encore au récepteur tyrosine kinase AXL, ce dernier se liant au NTD de la protéine S (37,61–63).

1.3. Voies d'internalisation dans la cellule hôte

Après le clivage entre S1 et S2 par la furine et l'attachement du RBD à l'ACE2, la dissociation de S1 démasque la sous-unité S2 et ouvre la voie au second clivage protéasique au niveau de S2'. Celui-ci détermine le mode d'entrée du SARS-CoV-2 dans sa cellule hôte, selon qu'il soit réalisé par TMPRSS2 à la surface de la cellule en cas d'internalisation par fusion, ou par des cathepsines endosomales en cas d'endocytose virale (28,34). Le SARS-CoV-2 pénètre principalement dans ses cellules hôtes par fusion avec la membrane plasmique cellulaire suite à l'action de TMPRSS2, à l'exception du variant omicron qui privilégie la voie d'endocytose. La protéase TMPRSS2 est abondamment exprimée par de nombreux type cellulaires du tractus respiratoire : 28 % des cellules en gobelet (vs. 4 % pour l'ACE2) et 30 % des pneumocytes de type II (vs. 7 % pour l'ACE2), faisant de l'expression du récepteur ACE2 le principal facteur limitant de l'infectivité des cellules hôtes (45). Néanmoins, si la cellule hôte n'exprime pas TMPRSS2 à sa surface ou si le complexe virus-ACE2 ne rentre pas au contact de cette protéase, le SARS-CoV-2 lié à l'ACE2 peut entrer dans la cellule par une voie plus lente, via son internalisation par endocytose dans une vésicule recouverte de clathrines. La fusion entre l'enveloppe virale et la membrane endosomale fait alors intervenir l'activité protéase des cathepsines B et L. Dans les deux cas, le clivage de S2' entraîne une transition fusogène de la sous-unité S2 d'une forme métastable « pré-fusion » vers une structure stable « post-fusion » avec d'importants changements conformationnels. En effet, le clivage de S2' permet l'exposition du peptide de fusion et son insertion dans la membrane de la cellule hôte (cellulaire ou endosomale), projeté via le dépliement de HR1 en longue spirale (hélice trimérique). Le repliement de HR2 qui s'ensuit pour s'associer à cette spirale forme une structure caractéristique de faisceau à six hélices (6-HB) qui rapproche le domaine transmembranaire de S2 ancré dans l'enveloppe virale et le peptide de fusion inséré dans la

membrane cellulaire. Ces deux bicouches lipidiques fusionnent, formant un pore qui permet l'entrée de la nucléocapside virale dans le cytoplasme cellulaire.

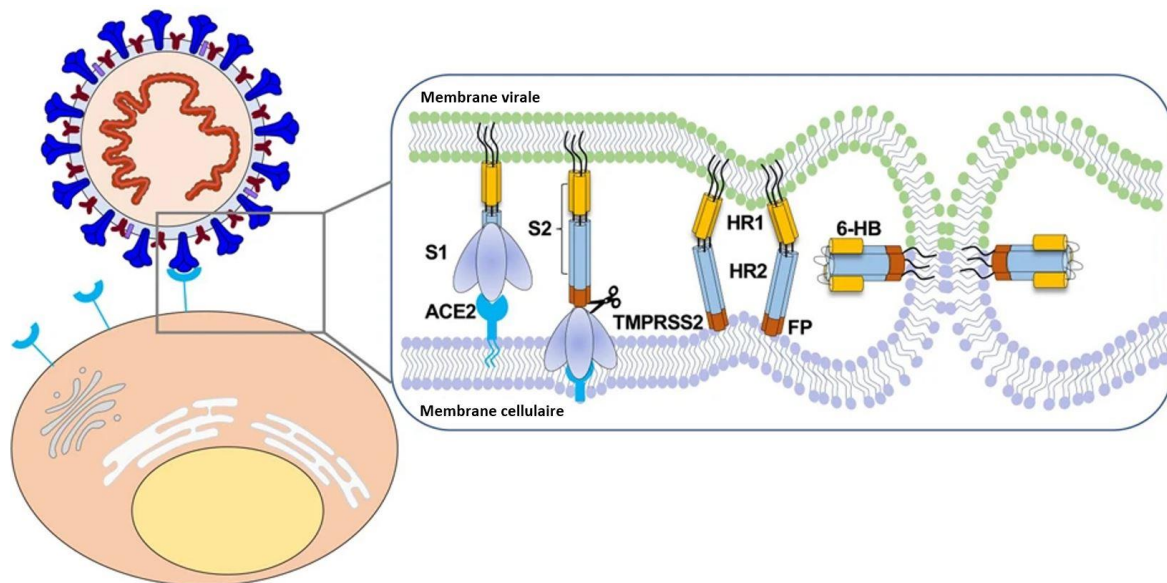


Figure 6 : Étapes de l'internalisation virale dans la cellule hôte par fusion.

La protéine S se lie à l'ACE-2, puis son clivage par la protéase TMPRSS2 permet l'insertion du peptide de fusion de S2 dans la membrane cellulaire. Le rapprochement de HR1 et HR2 au sein de S2 forme un faisceau à six hélices (*six-helix bundle*, 6-HB) rapprochant les membranes et permettant leur fusion.

D'après Zhang et al., Sig Transduct Target Ther, 2021 (18).

2. Réplication et expression des gènes viraux

Suite au relargage de la nucléocapside dans le cytosol, l'ARN génomique viral libéré est directement traduit par les ribosomes cellulaires en deux polyprotéines pp1a et pp1ab à partir de ORF1a et ORF1b (64). Celles-ci sont ensuite clivées par deux cystéine-protéases codées par nsp3 (protéase de type papaïne) et nsp5 (protéase de type chymotrypsine) en 16 protéines non structurales. La libération précoce de nsp1 permet de recruter la machinerie de la cellule hôte pour la traduction des protéines virales, et les protéines nsp2 à nsp16 composent le complexe de réplication et de traduction (RTC). Au sein de ce complexe, la synthèse de l'ARN viral est réalisée par nsp12, une ARN-polymérase ARN-dépendante (RdRp), tandis que la nsp14 possède une activité d'exonucléase 3'-5' conférant une activité de relecture et correction des erreurs de réplication propre aux coronavirus parmi les virus à génome ARN.

Le RTC s'assemble dans des organelles de réplication formées sous l'action des protéines virales nsp3, nsp4 et nsp6 qui détournent et remodelent la membrane du RE cellulaire. Ces structures particulières forment un réseau interconnecté de vésicules à double membrane (DMVs) qui concentrent les éléments viraux et cellulaires nécessaires à la réplication du virus tout en les protégeant des défenses intracellulaires de l'hôte (65).

Au sein de ces DMVs, le RTC permet de synthétiser des ARN complets de polarité négative à partir de l'ARN génomique, servant à leur tour de matrice pour la synthèse de nouveaux ARN génomiques qui seront encapsidés dans les nouvelles particules virales. D'autre part, le RTC synthétise également de petits brins d'ARN anti-sens de tailles différentes appelés ARN sous-génomiques, nécessaires à la production des protéines structurales et accessoires. Cette synthèse est réalisée par un phénomène de transcription discontinue unique, qui consiste en une synthèse d'ARN 5' et 3' co-terminaux « nichés » (d'où le nom de l'ordre des « *Nidovirales* » auquel appartient le SARS-CoV-2) avec la fusion de séquences non contiguës (64,66). Pour cela, durant la synthèse de ces ARN sous-génomiques de polarité négative à partir de l'extrémité 3' de l'ARN génomique, le RTC s'interrompt lorsqu'il rencontre l'une des séquences de régulation de la transcription (TRS) qui se situent en 5' des différents ORFs. Le nouveau transcrit se détache puis s'apparie à sa séquence complémentaire TRS localisée à environ 70 nucléotides de l'extrémité 5' de l'ARN génomique, et la synthèse d'ARN reprend pour copier la séquence terminale « leader » en 5'. Les ARN sous-génomiques formés sont transcrits en ARN messagers de polarité positive. Seul le premier ORF en 5' de chaque ARN messager (absent des ARN sous-génomique de plus petite taille) sera traduit en protéine structurale ou accessoire. Ce mécanisme complexe permet au virus de maximiser son expression protéique via l'amplification d'ARN lors de la synthèse d'ARN sous-génomiques de polarité négative puis positive. De plus, les ARN messagers produits sont protégés de l'activité endonucléasique de nsp1 grâce à la courte séquence « leader » présente dans tous les ARN sous-génomiques, ce qui favorise leur accumulation et donc la production de protéines virales pendant l'infection (67).

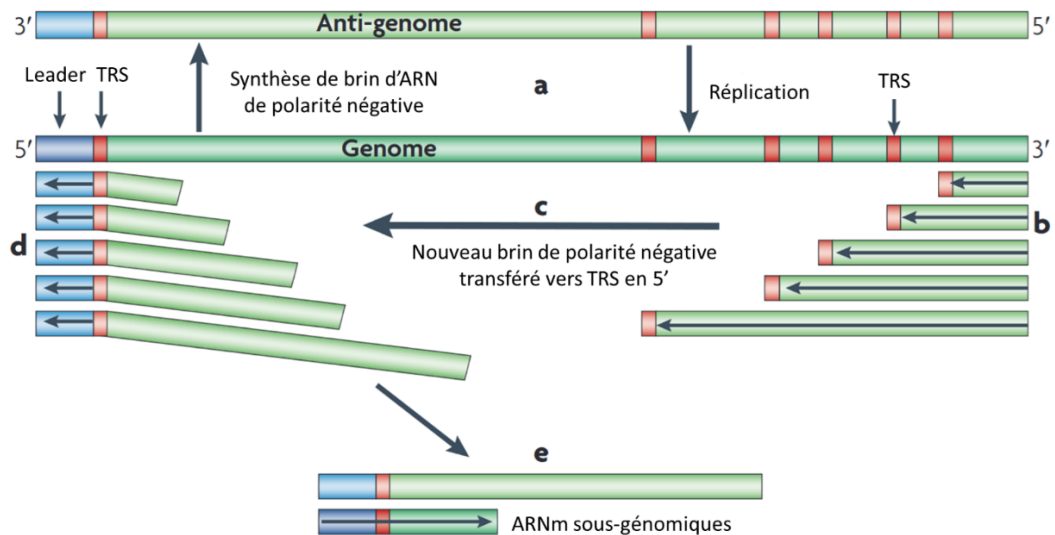


Figure 7 : Mécanisme de répllication et de transcription discontinue des coronavirus.

a. Synthèse d'ARN complet de polarité négative servant de matrice pour la synthèse de nouveaux ARN génomique de polarité positive (réplication). **b.** Début de synthèse des ARN sous-génomiques de polarité négative à partir de l'extrémité 3' et interruption à la rencontre d'une TRS (séquence de régulation de la transcription). **c.** Appariement du nouvel ARN formé à la TRS adjacente à la séquence leader. **d.** Poursuite de la transcription jusqu'à l'extrémité 5'. **e.** Synthèse d'ARN messenger à partir de l'ARN sous-génomique, qui permettra la traduction du premier ORF en 5' en protéine structurale ou accessoire.

D'après Perlman et al., Nature Reviews, 2009 (66).

3. Assemblage et libération des particules virales

Une fois synthétisées, les protéines structurales s'associent à la membrane du RE et transitent vers le compartiment intermédiaire entre RE et appareil de Golgi (ERGIC) en subissant des modifications post-traductionnelles, notamment une importante glycosylation pour la protéine S. À ce niveau, la protéine N se fixe aux ARN génomiques nouvellement formés pour former la nucléocapside. Celle-ci s'assemble avec les autres protéines structurales (M, E et S), avec un rôle central joué par la protéine M via ses interactions avec les autres protéines. Enfin, les nouvelles particules virales formées bourgeonnent et suivent la voie cellulaire de sécrétion au sein de vésicules via le réseau transgolgien. Lors de cette dernière étape, la protéine S peut être clivée entre S1 et S2 par la furine (S1 et S2 restant associées par des liaisons non covalentes), avant la libération des virions dans le milieu extérieur par exocytose (68).

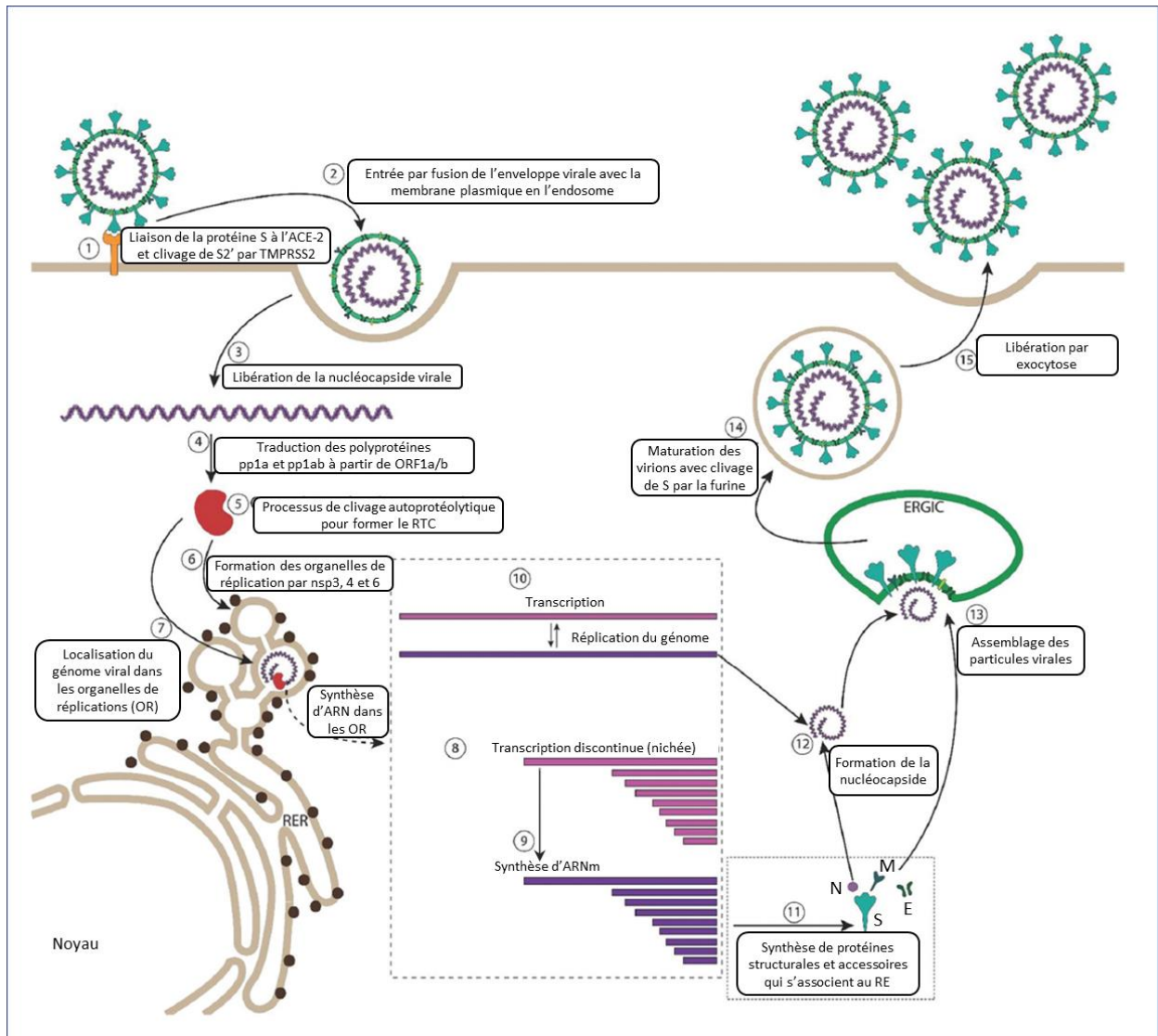


Figure 8 : Cycle viral du SARS-CoV-2.
 D'après Hidalgo et al., *npj Vaccines*, 2021 (65).

D. Variabilité génétique et variants du SARS-CoV-2

1. Mécanismes de variabilité génétique

Comme pour l'ensemble des autres virus, le génome du SARS-CoV-2 est systématiquement soumis à des mutations ponctuelles aléatoires qui sont le fruit d'erreur de la polymérase virale lors de sa réplication. Ces mutations peuvent rester sans conséquence, soit en n'entraînant aucun changement d'acide aminé (mutations silencieuses), soit en induisant la production d'un génome défectueux non productif ou éliminé sous pression sélective. En revanche, d'autres mutations peuvent conférer un avantage sélectif au virus avec un impact sur son infectiosité, sa pathogénèse ou sur les interactions avec le système immunitaire de l'hôte, conduisant à l'émergence de variants du SARS-CoV-2. De manière générale, les mutations surviennent plus fréquemment pour les virus à ARN (10^{-4} à 10^{-6} par nucléotide et par cycle) que les virus à ADN (10^{-6} à 10^{-8} par nucléotide et par cycle), car la RdRp codée par leur génome ne dispose pas d'activité de correction des erreurs (69). Ceci explique que la majorité des virus à ARN aient un génome de moins de 10 000 paires de bases : un génome trop long accumulerait trop de mutations pour permettre l'accomplissement efficace de cycles de réplication répétés.

Néanmoins, les coronavirus dont fait partie le SARS-CoV-2 font exception. Leur génome est de grande taille (environ 30 000 paires de base), mais code une exoribonucléase (nsp14) avec une activité de relecture et de correction des erreurs. Ainsi, le taux de mutation du SARS-CoV-2 est estimé à environ 3×10^{-6} par nucléotide (nt) et par cycle (vs. par exemple 3×10^{-5} pour le virus de la grippe), par analogie avec le virus de l'hépatite murine (MHV), également membre des β -CoV (70). Chez ce dernier, l'inactivation de l'activité exonucléase augmente de 15 fois le taux de mutations, sans données similaires disponibles à ce jour pour le SARS-CoV-2 (71). Cependant, l'impact réel de cette activité exonucléasique sur la diversité génétique du SARS-CoV-2 à l'échelle épidémiologique n'est aujourd'hui pas établi, d'autant plus qu'une personne infectée produit typiquement un total de 3×10^9 à 3×10^{12} particules virales au cours d'une infection (72).

Par ailleurs, d'autres mécanismes interviennent dans l'évolution du génome du SARS-CoV-2. Ainsi, certaines mutations ponctuelles sont le résultat de l'action directe d'enzymes cellulaires induites par l'interféron et qui participent à l'immunité innée antivirale par effet mutagène, telles que les adénosine désaminases (ADAR) et les cytidine désaminases de la famille des APOBEC (73). Ce processus explique la surreprésentation des mutations de cytidine en uracile observées au cours de l'évolution du SARS-CoV-2 (74). Les phénomènes de recombinaison génétique entre souches participent également à la diversité génétique du SARS-CoV-2, lors de co-infections avec des souches de séquences distinctes. Bien que difficiles à détecter, ces événements ont été mis en évidence par analyse de séquences du SARS-CoV-2 (75–79). Plus globalement, les échanges de matériel génétique par recombinaison entre souches sont courants au sein des coronavirus et ont fortement contribué à leur évolution, notamment en favorisant le franchissement de barrière d'espèce (80,81).

Dans le contexte de la pandémie explosive de COVID-19 avec une circulation virale intense, le taux d'évolution du SARS-CoV-2 (variation des séquences consensus au cours du temps) est estimé à environ $1,1 \times 10^{-3}$ mutations/nt et par an, correspondant donc à l'accumulation d'environ 2 nouvelles mutations par mois (82). Ce taux d'évolution prend en compte l'ensemble des modifications de séquences ainsi que l'intensité de la circulation virale et l'effet de la pression sélective exercée sur les nouvelles souches créées. Cette vitesse d'évolution est du même ordre que celles d'autres virus à ARN en circulation tels que le virus de la grippe A ($1,8 \times 10^{-3}$ /nt et par an) ou l'entérovirus 71 ($3,4 \times 10^{-3}$ /nt et par an), mais se situe tout de même dans la tranche basse du fait de l'activité de la nsp14 (83). Cependant, une évolution virale accélérée intra-hôte est possible en cas d'infection persistante chez des patients immunodéprimés, avec des mutations sélectionnées principalement au sein du gène de la protéine S et du RBD sous la pression immunitaire exercée sur le SARS-CoV-2 (84–87). Ce processus a probablement joué un rôle important dans l'émergence des variants impliqués dans la pandémie, au vu de la vitesse importante d'apparition concomitante de leurs mutations et de la localisation préférentielle de ces mutations dans le gène de la protéine S (88,89).

2. Variants du SARS-CoV-2

Depuis le début de la pandémie, l'ensemble de ces processus ont conduit à l'émergence de multiples variants du SARS-CoV-2 en comparaison de la souche ancestrale de référence séquencée à Wuhan en Chine en janvier 2020 (90).

Très tôt, la substitution de l'aspartate par une glycine en position 614 (mutation D614G) de la protéine S est apparue, puis elle s'est rapidement répandue pour finalement totalement supplanter la souche ancestrale (91). Cette mutation était ainsi déjà largement majoritaire en France lors de la première vague épidémique survenue en mars 2020. Située au niveau C-terminal de la sous-unité S1, elle modifie la conformation de la protéine S en favorisant la position ouverte pouvant se lier à l'ACE2, ce qui potentialise donc l'infectivité des souches virales sans impact sur leur antigénicité (92).

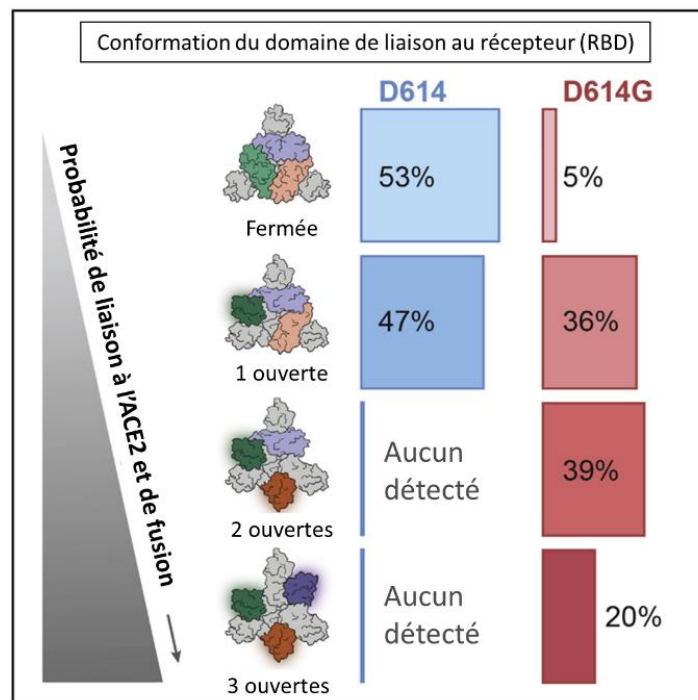


Figure 9 : Impact de la mutation D614G sur la conformation du RBD de la protéine S.
D'après Yurkovetskiy et al., Nature, 2020 (92).

Par la suite, plusieurs mutations adaptatives associées à un avantage sélectif important pour le virus ont émergé, parfois indépendamment au sein de différentes lignées par un phénomène de convergence évolutive. Certaines de ces mutations de la protéine S confèrent une transmissibilité accrue au SARS-CoV-2. Ainsi, les mutations N501Y et L452R situées au niveau du RBD augmentent l'affinité de la protéine S pour le récepteur cellulaire ACE2, par un facteur d'environ 10 pour la première et de 1,4 pour la seconde, facilitant l'infection de l'hôte (93–95). La mutation T478K peut également favoriser la liaison du virus à son récepteur en modifiant les interactions électrostatiques entre le RBD et l'ACE2 (96). Une mutation de type P681H/R située en amont du site de clivage par la furine améliore quant à elle le potentiel fusogène de la protéine S, mais sans conséquences fonctionnelles significatives observées *in vitro* sur l'entrée virale ou la diffusion tissulaire (97,98). Enfin, la délétion 69-70 augmente indirectement l'infectivité du virus, notamment en augmentant l'incorporation de la protéine S à la surface des particules virales (99).

Par ailleurs, certaines mutations au niveau du RBD, dont principalement les mutations E484K/Q, L452R, et K417N/T, favorisent l'échappement partiel du virus au système immunitaire et en particulier aux anticorps neutralisants (100,101). Les mutations E484K et L452R augmentent également l'affinité pour le récepteur ACE2, ce qui souligne que certaines mutations peuvent combiner plusieurs avantages sélectifs. De plus, la délétion Δ 69-70 ainsi que d'autres délétions portant sur le NTD peuvent également entraîner un défaut de neutralisation par les anticorps qui ciblent cette région de la protéine S (102). Enfin, la combinaison de plusieurs mutations peut conduire à un effet de compensation et d'addition de leurs effets sur la transmissibilité et l'échappement viral par un phénomène d'épistasie. La mutation K417N en est un exemple : cette mutation isolée entraîne une perte de capacité de liaison à l'ACE2 de l'ordre de 3 fois en comparaison de la souche sauvage par perte d'une liaison ionique, mais sa combinaison avec les mutations N501Y et E484K permet de voir cette capacité de liaison à l'inverse accrue tout en étant associée à un échappement aux anticorps (95,103).

L'émergence de ces mutations et des variants qui les portent est surveillée de près dans le monde depuis le début de la pandémie, notamment via le dépôt de séquences dans des bases de données en accès public telles que la base internationale GISAID (*Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data*) initialement créée pour collecter les données de séquençage du virus de la grippe. Au niveau national, des enquêtes « Flash » hebdomadaires consistant à séquencer aléatoirement des prélèvements positifs pour le SARS-CoV-2 ont pour objectif de dresser une cartographie des souches de SARS-CoV-2 circulant en France.

Le séquençage régulier des souches virales cliniques a ainsi révélé l'émergence de plusieurs variants à travers le monde, qualifiés « d'intérêt » ou « préoccupants » par l'Organisation Mondiale de la Santé :

- Un variant d'intérêt ou à suivre (VOI pour *Variant of Interest*) est « associé à des mutations modifiant l'épidémiologie, l'antigénicité ou la virulence, ou entraînant des effets négatifs sur les diagnostics, les vaccins, les traitements ou les mesures de santé publique »
- Un variant préoccupant (VOC pour *Variant of Concern*) correspond à un variant d'intérêt qui remplit des critères supplémentaires : il est également « associé à un ou plusieurs changements augmentant la transmissibilité ou modifiant de manière préjudiciable l'épidémiologie de la COVID-19, ou augmentant la virulence ou modifiant la présentation clinique de la maladie, ou encore diminuant l'efficacité des mesures de santé publique et sociales ou des outils de diagnostic, des vaccins et des traitements disponibles »

Plusieurs systèmes de dénomination de ces variants co-existent, basés sur les systèmes de nomenclature établis par GISAID, Nextstrain (classification avec l'année et une lettre) et Pango (identification du lignage). Néanmoins, ces systèmes sont relativement complexes et évoluent avec le temps. Pour faciliter les échanges et les débats publics avec un système accessible sans risque de confusion, une dénomination internationale basée sur l'alphabet grec a été définie par l'OMS.

Depuis le début de la pandémie, cinq variants ont été catégorisés comme préoccupants :

- **Variant Alpha** (B.1.1.7, ou 20I/501Y.V1)

Ce variant s'est rapidement propagé en France après son émergence fin 2020 au Royaume-Uni et est devenu majoritaire en France en mars 2021. Il porte 23 mutations au total, dont 8 nouvelles mutations au niveau du gène codant la protéine S outre la D614G (104). Les modifications génétiques caractéristiques de ce variant sont la délétion Δ 69-70 dans le NTD et les mutations N501Y dans le RBD et P681H au niveau du site de clivage par la furine. Celles-ci lui confèrent d'une part une affinité pour le récepteur ACE2 multipliée par 7 à 10 avec un pouvoir de transmission accru de 1,4 à 1,9 fois (105–107), et d'autre part un potentiel fusogène accru à l'origine d'une sévérité plus importante avec 1,7 fois plus d'hospitalisations (108,109). Le pouvoir neutralisant des anticorps développés après infection ou vaccination est quant à lui conservé face à ce variant (110,111). Cependant, au cours de la pandémie, certaines souches de cette lignée ont acquis la mutation supplémentaire d'échappement E484K (20I/484K) ou moins fréquemment E484Q (20I/484Q), mais leur circulation est restée très limitée en France en comparaison du variant alpha classique et du variant beta jusqu'à l'émergence du variant delta en juin 2021.

- **Variant Beta** (B.1.351, ou 20H/501Y.V2)

Détecté pour la première fois en Afrique du Sud en mai 2020, ce variant y est devenu majoritaire fin 2020 et s'est répandu sur l'ensemble des continents, mais restant largement minoritaire derrière le variant alpha en Europe. Outre la mutation D614G, il porte neuf mutations au niveau du gène codant la protéine S, dont trois sont localisées dans des sites clés du RBD pour la liaison à l'ACE2 : les mutations N501Y, E484K et K417N (112). Sa transmissibilité est augmentée d'environ 50 % du fait d'une affinité pour le récepteur ACE2 accrue (x2,7) (112), et il entraîne davantage d'hospitalisations (x3,6) et de cas sévères par rapport à la souche sauvage (108). De plus, l'avantage sélectif majeur de ce variant concerne

sa capacité d'échapper en partie aux anticorps neutralisants produits après infection ou vaccination, principalement via l'effet conjoint des mutations E484K et K417N (110,113).

- **Variant Gamma** (P.1, ou 20J/501Y.V3)

Le variant gamma a initialement été mis en évidence en novembre 2020 au Brésil. Il porte 12 mutations de la protéine S, dont la D614G et les mutations clés K417T, E484K et N501Y, les deux dernières étant communes avec le variant beta. Ce variant a principalement circulé en Amérique du Sud où il est rapidement devenu majoritaire jusqu'à la fin de l'été 2021, tandis qu'il ne représentait que moins de 0,5 % des souches séquencées en France sur cette même période. Sa transmissibilité est multipliée par 1,4 à 2,6 en comparaison de la souche sauvage selon les études (114,115), et il entraîne une perte partielle du pouvoir neutralisant des anticorps de façon comparable au variant beta (116–118). Enfin, les études menées sur les manifestations cliniques, les hospitalisations et les décès associés à ce variant sont limitées. Une étude européenne rapporte un risque d'hospitalisation multiplié par 2,6 (108). De même, selon les données brésiliennes, le risque de décès aurait augmenté de 1,1 à 1,8 fois suite à l'émergence du variant gamma, sans pouvoir distinguer la part imputable à la pression exercée par la COVID-19 sur le système de soins (114).

- **Variant Delta** (B.1.617.2 et sous-lignages AY.*, ou 21A/I/J)

Le lignage B.1.617 englobe trois sous-lignages : B.1.617.1 (kappa), B.1.617.2 (delta) et B.1.617.3 qui diffèrent par quelques mutations ponctuelles. Le variant B.1.617.2 a émergé en Inde en octobre 2020 et s'est rapidement répandu à travers le monde, avant d'être classé comme variant préoccupant en mai 2021 et de rapidement remplacer l'ensemble des précédents variants. Devenu majoritaire en France en juillet 2021, il représentait plus de 99 % des variants circulants à partir du mois d'août 2021. Le variant delta comporte 11 mutations la protéine S, dont les caractéristiques outre la D614G sont la L452R, T478K et la P681R, toutes trois absentes des variants préoccupants précédents. À l'inverse, il s'agit du seul variant préoccupant sans la mutation N501Y. Au cours de son évolution, la diversification génétique

du variant delta a conduit à la définition de sous-lignées (AY*) et à la subdivision du clade initial 21A en trois clades (21A, 21I et 21J), sans différences phénotypiques majeures décrites. Au Royaume-Uni, la transmissibilité du variant delta a été estimée supérieure d'environ 60 % à celle du variant alpha (97,119). De plus, ce variant est associé à un délai d'incubation plus court et une charge virale 1000 fois plus importante que les souches ancestrales (120), ainsi qu'une sévérité sensiblement plus importante (hospitalisation x1,5 à 1,8) que les variants alpha et beta (121–123). Sa sensibilité aux anticorps de patients convalescents ou vaccinés est altérée, mais dans une moindre mesure que les variants beta ou gamma (124–126).

- **Variant Omicron (B.1.1.529, BA.* , ou 21K/L/M)**

Le variant Omicron est le dernier VOC décrit à ce jour. Détecté pour la première fois au Botswana puis en Afrique du Sud à la mi-novembre 2021, il a totalement remplacé le variant delta suite à une diffusion extrêmement rapide sur l'ensemble du globe. Ainsi, le variant omicron représentait 9,4 % des séquences lors de l'enquête Flash en France le 13/12/2021, tandis que cette proportion atteignait déjà plus de 90 % un mois plus tard (93,9 % le 10/01/2021) et plus de 99 % des séquences à partir du 31/01/2021 (Santé Publique France).

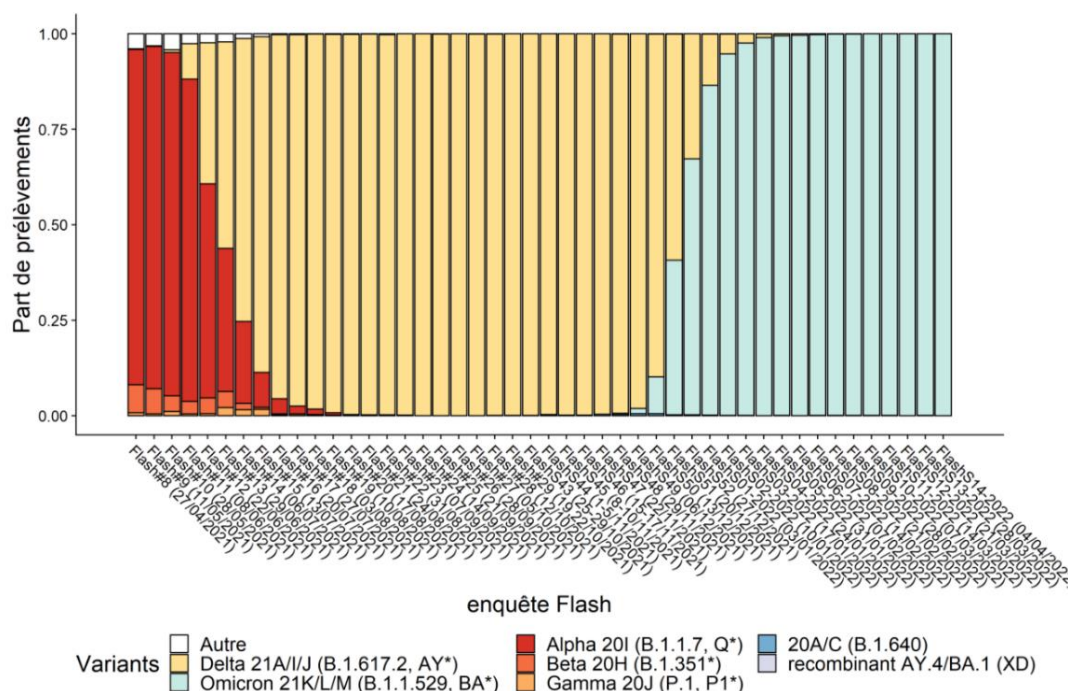


Figure 10 : Evolution des proportions de variants du SARS-CoV-2 en France. Enquêtes hebdomadaires de séquençage aléatoire (données EMERGEN) (127).

Le variant omicron initialement décrit possède plus de 60 mutations dans son génome en comparaison de la souche ancestrale de Wuhan, dont plus de 30 substitutions nucléotidiques de la protéine S, ainsi que 3 délétions et une insertion dans le NTD de cette protéine (128). Au total, 15 mutations sont situées au niveau du RBD dont 11 sont localisées au sein du RBM et 7 portent sur des acides aminés directement au contact de l'ACE2 (107,129).

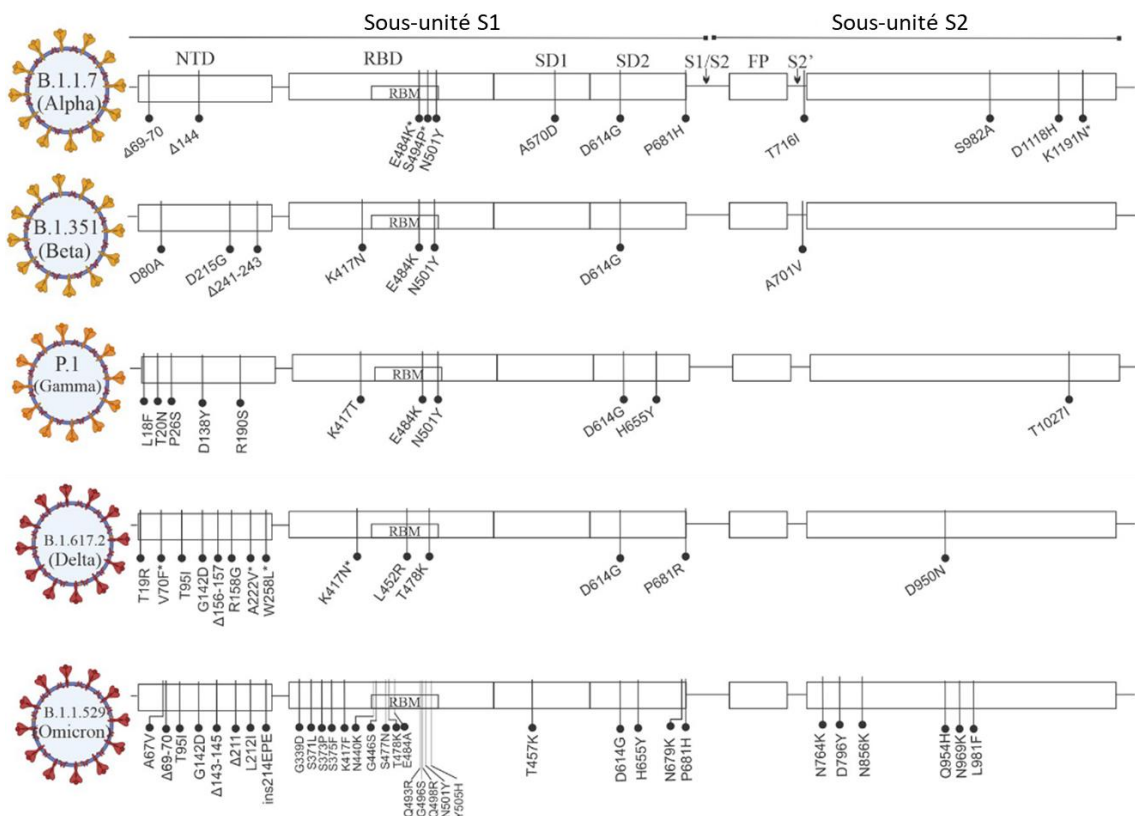


Figure 11 : Mutations des variants préoccupants du SARS-CoV-2 sur la protéine S. Les mutations qui ne sont pas caractéristiques du lignage (mises en évidence uniquement pour certaines souches) sont signalées par une astérisque. D'après Mittal et al., *Plos Pathogens*, 2022 (27).

Suite à sa diversification génétique, le lignage B.1.1.529 parent (clade 21M) regroupant les souches du variant omicron a été divisé en plusieurs sous-lignages :

- BA.1 (clade 21K), initialement majoritaire. Un sous-lignage de BA.1 a également été défini, appelé BA.1.1 et caractérisé par mutation R346K.
- BA.2 (clade 21L) qui a progressivement pris le pas sur BA.1. Ce sous-lignage représentait moins de 1 % des variants omicron séquencés en France début janvier 2022 et plus de 10 % à partir du 07 février. Un remplacement progressif entre les deux sous-lignages a été observé dans toute l'Europe, révélant un avantage de BA.2 en terme de transmission estimé à 30 % (130).
- BA.3, sous-lignage créé mi-décembre 2021 suite à sa détection principalement au Royaume-Uni et en Afrique du Sud mais restant largement minoritaire.
- Enfin, les sous-lignages BA.4 (clade 22A) et BA.5 (clade 22B), détectés majoritairement en Afrique du Sud, ont été très récemment été catégorisés comme variants d'intérêt (VOI) par l'ECDC, bien qu'ils ne soient pour le moment pas associés à une situation épidémiologique ou clinique préoccupante dans ce pays (131).

Il existe une forte variabilité génétique entre ces sous-lignages : les sous-lignages BA.1 et BA.2 partagent 21 mutations de la protéine S en commun, mais hébergent 13 et 8 mutations spécifiques supplémentaires, respectivement (132,133). La différence majeure entre les deux sous-lignages concerne la délétion $\Delta 69-70$, présente chez BA.1 et absente chez BA.2.

Les sous-lignages BA.4 et BA.5 ressemblent au BA.2, mais possèdent la délétion $\Delta 69-70$ et des mutations caractéristiques supplémentaires (L452R, F486V et R493Q) dans la protéine S à l'origine de leur surveillance particulière.

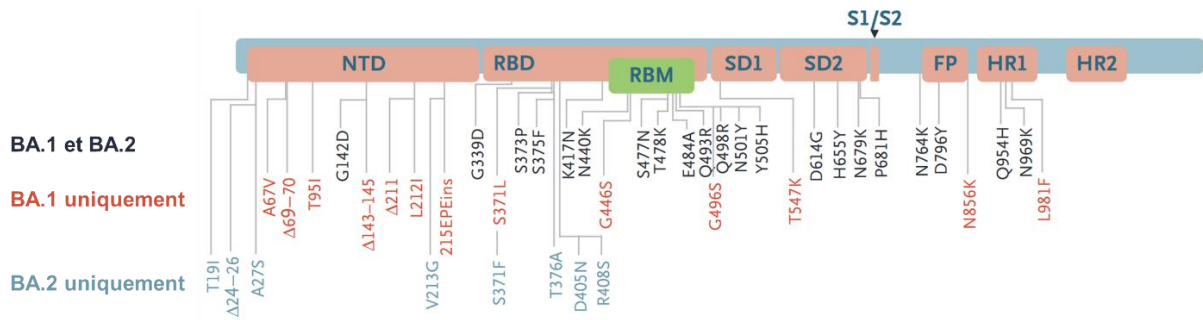


Figure 12 : Mutations communes et spécifiques présentes dans le gène de la protéine S des sous-lignages BA.1 et BA.2 du variant omicron.

Les mutations communes de la protéine S sont indiquées en noir, et celles spécifiques des sous-lignages BA.1 et BA.2 sont indiquées en orange et bleu respectivement.

D'après Yu et al., NEJM, 2022 (133).

La délétion Δ69-70, ainsi que plusieurs mutations de la protéine S communes à l'ensemble des souches du variant omicron (dont notamment K417N, T478K, N501Y, D614G, et P681H), sont partagées avec les variants préoccupants précédemment décrits (132).

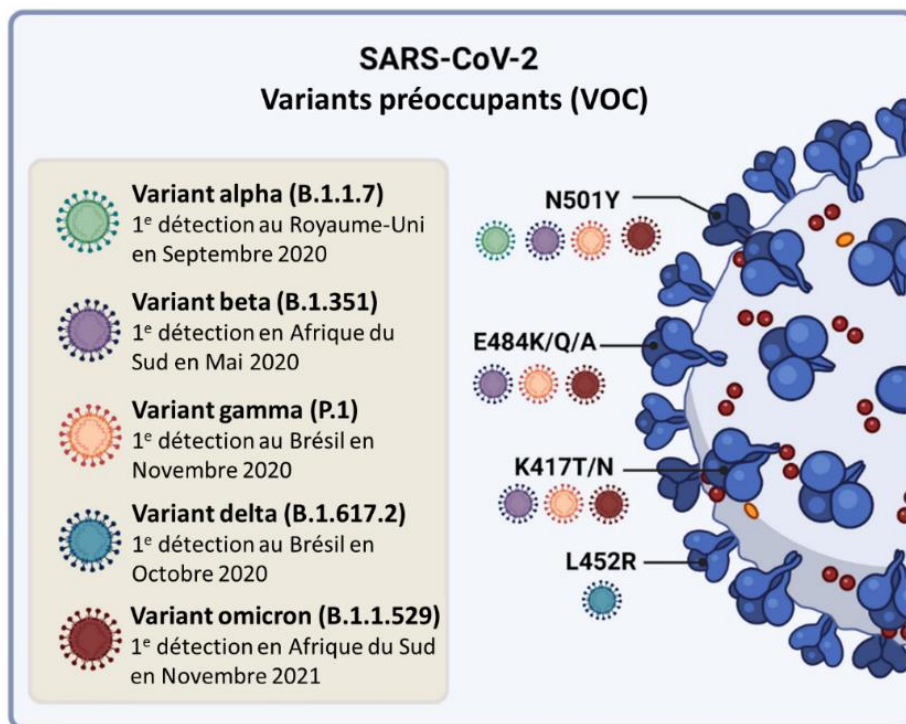


Figure 13 : Mutations clés dans la RBD intervenant dans la virulence et l'échappement immunitaire des variants préoccupants du SARS-CoV-2.

D'après Mistry et al., Front. Immunol., 2022 (134).

Malgré cette proximité génétique apparente, le variant omicron n'est pas issu de l'évolution d'un de ces variants préoccupants, mais d'un décrochage évolutif survenu après une divergence des autres souches tôt en 2020 suivi d'une évolution parallèle dans l'ombre (135).

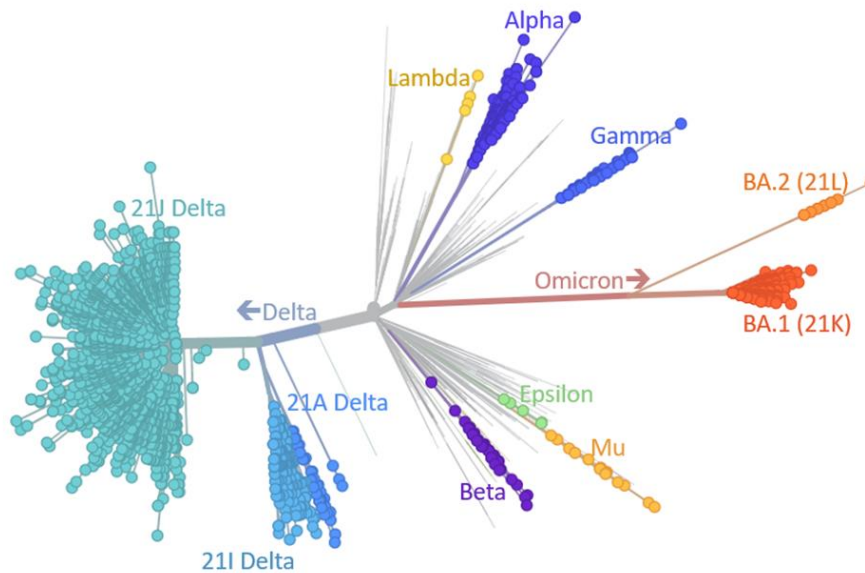


Figure 14 : Arbre phylogénétique positionnant le variant omicron par rapport aux variants précédents.

Variants préoccupants (VOC) : alpha, beta, delta, gamma ; variants d'intérêt (VOI) : epsilon, lambda, mu.

Source : Site nexstrain.org (27 janvier 2022), arbre annoté par Dr Emma Hodcroft (Bern).

Enfin, un recombinant entre les sous-lignages AY.4 (delta) et BA.1 (omicron) nommé XD fait actuellement l'objet d'une surveillance clinique renforcée en France suite à sa mise en évidence à partir de plusieurs échantillons cliniques au mois de février (127). De même, plusieurs recombinants entre BA.1 et BA.2 ont récemment été mis en évidence dans plusieurs pays européens, vraisemblablement sans différences de propriétés virales (127).

Le nombre et la nature des mutations du variant omicron a très tôt suscité une inquiétude sur son potentiel de transmissibilité et d'échappement à la réponse immunitaire (136). La vitesse de remplacement du variant delta par le variant omicron est effectivement en faveur d'une transmissibilité nettement accrue pour ce dernier. Ainsi, une étude danoise rapporte un nombre d'infections secondaires au sein de foyers multiplié par 3,2 avec le variant omicron par rapport au variant delta sous des conditions épidémiologiques similaires (137), en concordance avec les conclusions d'une autre étude menée en Afrique du Sud (138). De plus, une étude de septembre 2021 prédisait déjà qu'un variant portant la combinaison des mutations N501Y, Q498R, S477N, et E484K (toutes présentes chez omicron) aurait une affinité augmentée de 1000 fois pour le récepteur ACE2 : les trois premières mutations créent de nouvelles liaisons aux extrémités de l'interface entre le RBD et l'ACE2 et stabilisent le complexe, tandis que la mutation E484K renforce encore cette interaction (139). Le variant omicron porte également d'autres mutations connues pour augmenter la transmissibilité du virus, dont notamment la D614G présente chez tous les autres variants préoccupants, et les trois mutations H655Y, N679K, and P681H que l'on suppose faciliter le clivage entre S1 et S2 par la furine (140). Cependant, ce variant porte également d'autres mutations qui tendent quant à elles à réduire l'affinité pour l'ACE2 (dont les mutations K417N, G446S, E484A, Q493R, G496S, et Y505H) mais contribuent à son échappement à l'immunité humorale (140). Une étude rapporte que l'affinité du variant omicron n'est *in fine* augmentée que de 2,4 fois par rapport à la souche sauvage, ce qui est légèrement supérieur au variant delta mais bien inférieur au variant alpha (x7-10) (141).

D'autres facteurs expliquent la nette supériorité du variant omicron sur le variant delta observée du point de vue épidémiologique. Tout d'abord, ce variant infecte préférentiellement les cellules des voies aériennes supérieures et les cellules bronchiques par rapport aux cellules pulmonaires, contrairement au variant delta (142,143). Ce changement de tropisme n'est pas associé à une charge virale plus élevée en comparaison du variant delta (144), mais peut expliquer son délai d'incubation plus court, ce qui réduit l'intervalle sériel (temps entre

deux contaminations) (145). De plus, le variant omicron privilégie l'entrée dans ses cellules cibles par la voie endosomale plutôt que par la voie dépendante de TMPRSS2. Il présente donc une perte de capacité fusogène et entraîne moins de formation de syncytia cellulaires (146,147). Ceci se traduit par une pathogénicité réduite entraînant une réduction du risque d'hospitalisation estimée de 40 à 73 % selon les études (148–155) sans différence notable entre BA.1 et BA.2, et une proportion accrue de cas asymptomatiques qui peuvent diffuser le virus en restant non diagnostiqués (148,156). Enfin, le variant omicron a émergé dans un contexte où une part importante de la population avait déjà développé une immunité adaptative contre le SARS-CoV-2 suite à une infection ou après vaccination. Le variant omicron porte de nombreuses mutations d'échappement, en particulier au niveau du RBD mais aussi du NTD, ce qui lui a permis d'avoir un avantage sélectif certain sur le variant delta en pouvant plus facilement infecter à la fois les individus guéris et les individus entièrement vaccinés. En effet, il échappe aux anticorps post-infection ou post-vaccination avec une efficacité jusqu'à 44 fois plus importante que le variant delta, avec toutefois une amélioration du pouvoir neutralisant des anticorps observée après l'administration d'une dose de rappel vaccinal (129,157–162).

L'ensemble de ces facteurs a conduit à l'expansion fulgurante du variant omicron dans la population associée à un bond des cas de réinfections (163,164), avec un risque estimé de réinfection (suite à une infection préalable par un autre variant) multiplié par 5,4 en comparaison du variant delta (165) et même la possibilité d'infections par une souche BA.2 peu de temps après une infection par BA.1 ou inversement bien qu'elles restent rares (127,166,167).

II. Caractéristiques de l'infection par le SARS-CoV-2 : la COVID-19

A. Épidémiologie de la COVID-19

1. Voies de transmission du SARS-CoV-2

La voie privilégiée de transmission interhumaine du SARS-CoV-2 est la voie respiratoire, via l'inhalation de gouttelettes émises par des personnes infectées lors de leur prise de parole, leur toux ou éternuements mais aussi simplement via leur respiration. Les plus grosses gouttelettes sont les plus contaminantes et peuvent se transmettre facilement entre deux personnes proches de moins de un à deux mètres d'où les règles de distanciation sociale mises en place depuis le début de la pandémie. D'autres gouttelettes très fines de moins de 5 µm de diamètre peuvent rester plusieurs heures en suspension dans l'air en milieu clos pour former un aérosol, ce qui conduit potentiellement à des contaminations plus à distance (168–170). Ce mode de contamination justifie l'importance d'aérer les espaces intérieurs et de privilégier les espaces extérieurs. Des particules virales infectieuses peuvent aussi être présentes dans la salive des personnes infectées, du fait du passage de sécrétions respiratoires par la cavité buccale, mais aussi de l'infection des muqueuses et glandes salivaires. Une transmission serait donc possible lors d'échanges salivaires tels que lors d'un baiser ou un échange de brosse à dents (171). Par ailleurs, la transmission indirecte du SARS-CoV-2 via le contact avec des surfaces contaminées puis le portage des mains à la bouche ou au nez est possible, des particules virales pouvant rester viables plusieurs heures sur certains matériaux. Cependant, ce mode de contamination est difficile à prouver en pratique, et ne joue vraisemblablement qu'un rôle mineur dans cette pandémie (172).

Outre la voie respiratoire, le SARS-CoV-2 peut se répliquer dans le tissu intestinal (173). Ainsi, le génome viral est détectable dans les selles de près de la moitié des patients contaminés lors de l'infection, avec une excrétion d'ARN prolongée par rapport aux prélèvements nasopharyngés (174,175). Cependant, seuls quelques cas d'excrétion de particules virales

infectieuses ont été rapportés (176–179), sans niveau de preuve suffisant pour le moment en faveur d'une transmission féco-orale (180). Seuls deux cas de mise en évidence de virus infectieux dans les urines ont été rapportés dans la littérature à ce jour (177,181). De même, il n'existe aucune preuve de transmission de virus infectieux par voie sanguine, par les sécrétions vaginales ou le sperme, par le lait maternel ou encore via les larmes, bien que du génome viral ait été détecté dans ces différents compartiments. Enfin, la possibilité d'une transmission verticale par voie intra-utérine est encore débattue, mais le risque reste en tout état de cause très faible (182).

L'excrétion respiratoire qui est donc la voie de transmission privilégiée du SARS-CoV-2 est maximale dès le début des symptômes et même dans les heures qui les précèdent. Le taux de reproduction de base du virus circulant (hors mesures sanitaires), appelé R_0 , était initialement estimé à 2,8 en médiane au début de la pandémie, signifiant qu'une personne infectée contaminait en moyenne entre deux et trois autres personnes (183). Une revue de la littérature indique que le R_0 de base du variant omicron serait quant à lui estimé à 8,2 (184). La proportion des contaminations en phase présymptomatique ou par des personnes asymptomatiques a été estimée à 59 % sur la base d'un modèle établi à partir de données de 2020 (185), mais ce pourcentage est actuellement probablement plus élevé : le contexte est aujourd'hui bien différent avec la vaccination d'une grande part de la population, l'allègement des règles sanitaires et notamment de port du masque, et enfin l'émergence du variant omicron qui entraîne davantage de formes asymptomatiques.

2. Périodes de circulation virale au cours de la pandémie

Suite à la dissémination du virus sur l'ensemble du globe au début de l'année 2020, le nombre de cas de COVID-19 a littéralement explosé en mars 2020, en l'absence de gestes barrières. Le statut de pandémie a été déclaré par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) le 11 mars 2020, l'Europe étant alors le continent le plus touché. Un confinement strict était imposé dès le 17 mars en France, pour faire face à ce que l'on appellera par la suite « la première vague ». L'évolution de la pandémie a ensuite été marquée par une alternance de périodes de

circulation virale plus faible puis de reprises de la hausse des contaminations, du fait des modifications des mesures sanitaires, de la circulation virale plus importante en hiver et de l'émergence de nouveaux variants. Ainsi, plusieurs vagues se sont succédées en France :

- 1^e vague : de mars à mai 2020, impliquant la souche ancestrale mutée D614G. La majorité des cas n'ont pas été confirmés par biologie moléculaire lors de cette vague, seuls les cas sévères ou touchant des patients fragiles faisant alors l'objet d'une exploration étiologique au vu de l'explosion du nombre de cas. De fortes disparités interrégionales de circulation virale ont été observées du fait du confinement strict imposé avant la dissémination massive du virus sur l'ensemble du territoire de la métropole. Les régions Grand Est et Île de France ont été les plus précocement et les plus intensément touchées.
- 2^e vague : d'octobre à décembre 2020, survenue notamment du fait de la baisse des températures et de la rentrée scolaire. La souche ancestrale avec la mutation isolée D614G restait cependant majoritaire. La circulation virale avait diminué en décembre mais restait relativement élevée, en plateau, avec un rebond observé en janvier 2021 suite aux festivités de fin d'année.
- 3^e vague : de mars à avril 2021, impliquant essentiellement le variant préoccupant alpha, et dans une moindre mesure les variants préoccupants beta et gamma.
- 4^e vague : de juillet à août 2021, survenue principalement du fait de l'apparition du variant delta qui a rapidement supplanté les autres variants. Cette vague est cependant restée de faible ampleur, probablement en partie du fait de la période estivale et de la couverture vaccinale déjà importante à cette période en France.
- 5^e vague : de novembre 2021 à la fin février 2022, suite à l'émergence du variant omicron dans un contexte hivernal. Une incidence très élevée des cas de COVID-19 a été observée au cours de cette période. Ainsi, le pic de contaminations atteint le 24 janvier (3810 cas/100 000 habitants) était 7,5 fois plus élevé que lors de la seconde

vague au niveau national, mais associé à un nombre d'hospitalisations similaire et moins d'admissions en services de réanimation (données Santé Publique France).

- 6^e vague : Une reprise de la circulation a été observée en mars 2022, parallèlement à la levée des principales mesures sanitaires et au remplacement progressif du sous-lignage BA.1 par BA.2.

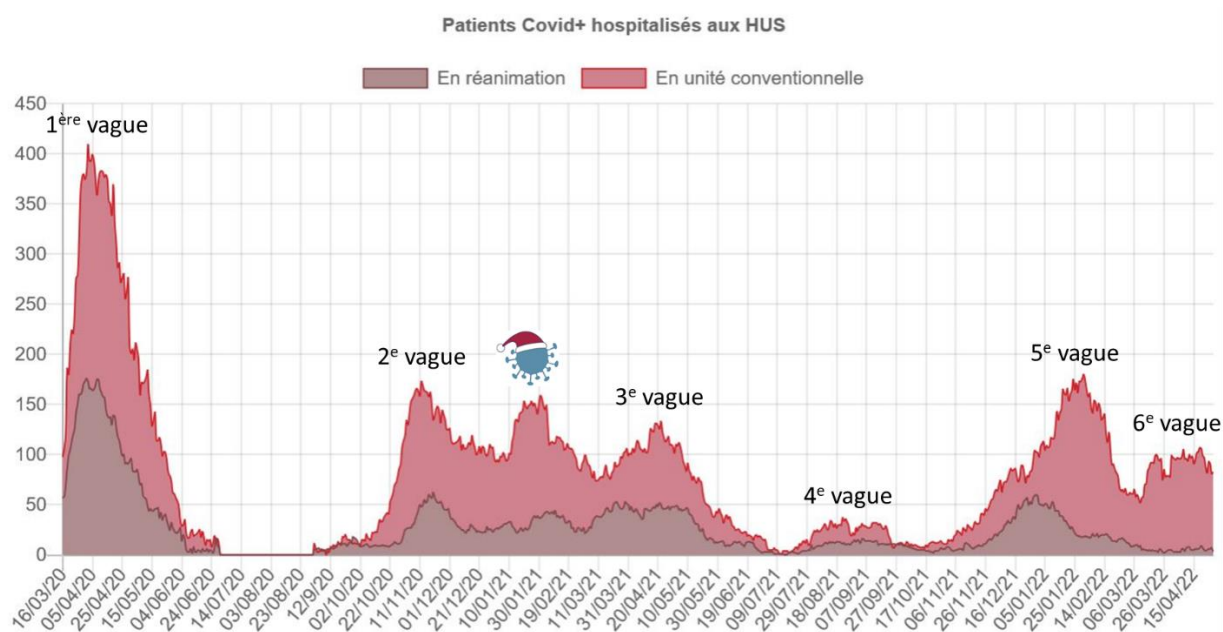


Figure 15 : Évolution du nombre de patients positifs à la COVID-19 hospitalisés au sein des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg au cours de la pandémie.
 Source : Site internet local de l'hôpital (Intrahus) consulté le 28 avril 2022.

3. Taux de mortalité et facteurs de risques de sévérité

Le taux de mortalité imputable au virus diffère quant à lui selon les pays, du fait de différences de répartition des âges dans la population, d'accès aux soins, de stratégies diagnostiques, de prise en charge des patients, et d'exhaustivité de déclaration des cas confirmés. Néanmoins, la mortalité était estimée entre 0,5 et 1 % lors de la première vague (186). Le taux de mortalité a cependant drastiquement chuté à 0,06 % en Europe avec le variant omicron, du fait d'une pathogénicité moindre et de la vaccination d'une part importante de la population (187).

Plusieurs facteurs d'hôte ont été décrits comme exposant davantage à un risque de forme sévère de COVID-19. L'âge est de loin le premier de ces facteurs, avec un risque d'hospitalisation augmenté de 3,4 % et un risque de décès augmenté de 7,4 % pour chaque année supplémentaire (188). Ainsi, le taux de mortalité n'était que de 0,001 % chez les patients de moins de 20 ans tandis qu'il atteignait 8,3 % chez les patients âgés de plus de 80 ans au cours de la première vague (189,190). Le sexe masculin est un autre facteur de risque important, avec un risque d'admission en soins intensifs multiplié par 2,8 et de décès par 1,4, cette différence étant d'autant plus marquée avec l'âge (191). En effet, en considérant les patients âgés de plus de 80 ans, la mortalité était initialement de 5,8 % chez les femmes et de 10,8 % chez les hommes (189). Outre ces facteurs démographiques, certaines comorbidités prédisposent aux formes sévères de COVID-19. Ces facteurs de risque comprennent notamment l'obésité, le diabète, l'hypertension artérielle, les pathologies cardio-vasculaires, les pathologies respiratoires chroniques, l'insuffisance rénale chronique, la cirrhose, le cancer, ou encore l'immunodépression congénitale ou acquise, en particulier suite à une transplantation d'organe solide ou à une greffe de cellules souches hématopoïétiques (192,193).

B. Période d'incubation et contagiosité

La période d'incubation du virus, correspondant au délai entre la contamination et l'apparition des premiers signes cliniques, s'étendait généralement de 2 à 12 jours avec la souche ancestrale du SARS-CoV-2, avec une médiane de 5,2 jours (194,195). Ce délai s'est raccourci avec l'émergence des variants, estimé à 4,4 jours avec le variant delta et à 3 jours avec le variant omicron (145,196,197). Les personnes contaminées sont contagieuses en moyenne à partir de 2 jours avant l'apparition des symptômes et jusqu'à 7 à 10 jours après le début des symptômes (195,198), une excrétion prolongée de virus infectieux étant cependant possible en particulier en cas de forme sévère de COVID-19 et chez les patients immunodéprimés (199–201).

C. Manifestations cliniques

L'infection par le SARS-CoV-2 peut rester asymptomatique ou paucisymptomatique, avec le risque de passer inaperçue et de favoriser la dissémination du virus. La réplication virale est alors rapidement contrôlée au niveau du tractus respiratoire supérieur grâce à un faible inoculum viral ou une réponse immunitaire locale adaptée (202). Une méta-analyse récente portant sur les cas diagnostiqués jusqu'en février 2021 rapporte que la proportion des cas asymptomatiques serait en moyenne de 40 %, en concordance avec les premières estimations (203,204). Cependant, de fortes variations existent selon les études et les cohortes de patients, notamment en fonction de l'âge : cette méta-analyse conclue que les formes asymptomatiques concernent 60 % des infections chez les patients de moins de 20 ans et 34 % au-dessus de 60 ans (203).

En cas de forme symptomatique, les premiers signes cliniques sont peu spécifiques, les plus courants observés dans plus de 40 % des cas étant la fièvre, la toux sèche et la fatigue. Les autres symptômes habituellement décrits comprennent les douleurs musculaires, les céphalées, la rhinorrhée, les maux de gorge, l'anosmie, la dysgueusie, les troubles digestifs (nausées, vomissement, diarrhées) (192,205–207). L'anosmie et la dysgueusie sont rapportées dans environ la moitié des cas de COVID-19 du fait de l'atteinte du bulbe olfactif, cette fréquence étant bien plus élevée qu'avec les autres étiologies de syndrome pseudo-grippaux (208). Cependant, les autres signes cliniques sont peu spécifiques, expliquant probablement en partie la propagation rapide du SARS-CoV-2 au début de la pandémie. Le variant omicron est quant à lui associé à une fréquence moindre d'anosmie et de dysgueusie (proche de 20 %), ce qui accroît encore le risque d'infection non diagnostiquée (209).

Une aggravation des symptômes est possible lors d'une seconde phase de l'infection chez une partie de patients, en particulier chez les patients avec des facteurs de risque de sévérité. Celle-ci survient environ une semaine après le début des symptômes, avec des signes

d'atteinte respiratoire basse pouvant aller de la dyspnée jusqu'à un syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) (202).

Selon l'évolution clinique de l'infection et la sévérité des symptômes, le *National Institute of Health* (NIH) a défini cinq catégories de formes cliniques de COVID-19 (210):

- Forme asymptomatique ou présymptomatique : cas confirmé sans symptômes compatibles avec une COVID-19 ;
- Forme mineure : symptômes variés de COVID-19 mais sans dyspnée, sans essoufflement, et sans anomalie à l'imagerie thoracique ;
- Forme modérée : signes d'atteinte basse du tractus respiratoire à l'examen clinique ou à l'imagerie, et saturation pulsée en oxygène (SpO_2) ≥ 94 % en air ambiant ;
- Forme sévère : $SpO_2 < 94$ % en air ambiant, rapport de la pression partielle artérielle en oxygène et de la fraction inspirée en oxygène (PaO_2/FiO_2) < 300 mm Hg, fréquence respiratoire > 30 cycles/minute, et/ou infiltrat pulmonaire > 50 % ;
- Forme critique : SDRA, choc septique, et/ou défaillance multiviscérale.

Au début de la pandémie, la majorité des infections symptomatiques (80 %) restaient au stade de formes mineures ou modérées avant guérison, et ne nécessitaient généralement pas d'hospitalisation. L'évolution était cependant plus défavorable dans les autres cas, avec une aggravation des symptômes vers une forme sévère dans 14 % des cas et vers une forme critique dans 6 % des cas, nécessitant alors une admission en service de réanimation (211,212). Cette répartition est cependant aujourd'hui bien différente avec la pathogénicité plus faible du variant omicron. Parmi les cas recensés avec ce variant jusqu'à la mi-janvier 2022, seuls 1,1 % des patients ont été hospitalisés et 0,16 % ont nécessité une ventilation mécanique ou une admission en réanimation (213).

Bien que moins fréquentes, d'autres types d'atteintes extra-pulmonaires ont également été identifiés suite à une infection par le SARS-CoV-2 (214). Des lésions cutanées de différents types ont été décrites, telles que des exanthèmes maculo-papuleux, des urticaires, des

éruptions vésiculeuses ou encore des lésions cutanées vaso-occlusives (215). Par ailleurs, des complications thrombotiques peuvent survenir, le plus souvent à type d'embolie pulmonaire ou de thrombose veineuse profonde, mais aussi d'accident vasculaire cérébral, d'infarctus du myocarde, ou encore de coagulation intravasculaire disséminée (216). De même, des complications neurologiques telles qu'un syndrome de Guillain-Barré ou des convulsions sont possibles (217), ainsi que la survenue d'une insuffisance rénale aiguë (218).

Enfin, plusieurs signes cliniques ont été décrits comme pouvant persister plusieurs mois après l'élimination du virus, dans le cadre d'un syndrome post-COVID souvent appelé « COVID long ». Les symptômes diffèrent beaucoup d'un patient à l'autre et il est souvent difficile de les attribuer avec certitude à l'infection. La fatigue est le plus fréquent de ces symptômes, ainsi que l'essoufflement sans effort important ou la toux persistante. Ce syndrome peut également englober d'autres manifestations très polymorphes, telles que des douleurs articulaires, des troubles digestifs, une anosmie ou une dysgueusie persistante, des difficultés de concentrations ou encore des troubles du sommeil, cette liste n'étant pas exhaustive (219).

La COVID-19 est donc une maladie complexe avec une importante diversité de présentations cliniques possibles et un degré de sévérité très variable. Plusieurs phénomènes pathologiques sont mis en jeu, certains directement en lien avec l'infection des cellules cibles par le virus et d'autres consécutifs à la réaction de l'organisme face à l'infection.

III. Physiopathologie de la COVID-19

A. Dommages cellulaires induits par le SARS-CoV-2

Après l'entrée dans l'organisme via le tractus respiratoire, le SARS-CoV-2 pénètre dans ses cellules cibles par fixation au récepteur ACE2. Au niveau pulmonaire, il peut induire des dommages cellulaires par des mécanismes directs, principalement via son activité fusogène. Celle-ci est possible car certaines protéines S produites par la cellule infectée ne sont pas intégrées aux nouvelles particules virales produites mais vont s'enchrâsser dans la membrane plasmique. L'interaction de ces protéines S avec les récepteurs ACE2 des cellules voisines entraîne la fusion des membranes plasmiques et la formation de syncytia cellulaires géants, contenant souvent de nombreux noyaux (220). Ce mécanisme pathogène permet au virus d'infecter les cellules adjacentes sans exposition au milieu extérieur.

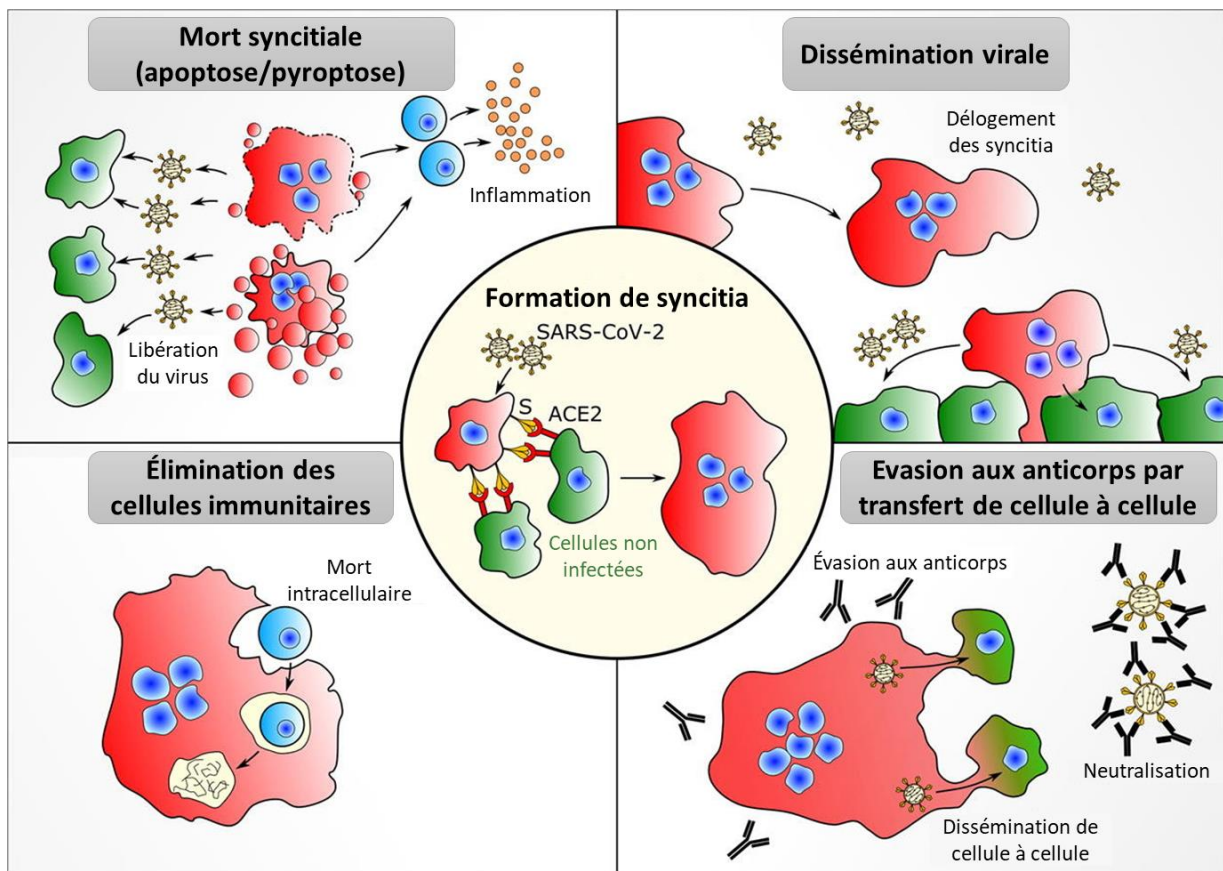


Figure 16 : Conséquences potentielles de la formation de syncytia sur la pathogénèse du SARS-CoV-2.

D'après Rajah et al., J Mol Biol, 2022 (221).

Par ailleurs, l'infection des cellules épithéliales ciliées du tractus respiratoire par le SARS-CoV-2 peut mener à une dédifférenciation de ces cellules avec une altération et une perte de leurs cils. Cette atteinte limite la clairance muco-ciliaire qui aide à l'élimination du virus et participe à sa pathogénèse (222). D'autre part, le SARS-CoV-2 peut également induire des dommages dans l'endothélium pulmonaire, et ainsi altérer ses fonctions barrière et régulatrices de l'inflammation et de la coagulation (223). Cette atteinte peut être induite directement par l'infection des cellules endothéliales mais aussi par l'intermédiaire des réactions immunitaires que l'infection déclenche, notamment via l'activation du complément et la sécrétion de cytokines (214).

B. Réponse immunitaire développée au cours de l'infection par le SARS-CoV-2

La pathogénèse induite par le SARS-CoV-2 s'explique en grande partie par une dérégulation du système immunitaire. En effet, les stratégies d'échappement du virus peuvent rendre la réponse immunitaire inadaptée, excessive et délétère pour l'organisme en induisant une inflammation systémique.

1. Réponse immunitaire innée et inflammatoire

La réponse immunitaire innée représente la première ligne de défense de l'hôte contre les pathogènes, dont le SARS-CoV-2. Cette première réponse vise à limiter l'entrée virale et toutes les étapes du cycle de réplication, à éliminer les cellules infectées pour limiter la contagion et à coordonner le déclenchement de l'immunité adaptative plus ciblée contre le virus. Elle est initiée par la détection du virus comme agent étranger par les cellules de l'immunité innée, dont les macrophages alvéolaires, les cellules dendritiques, les cellules *Natural Killer* (NK) et les polynucléaires neutrophiles (224). Cette détection fait intervenir la reconnaissance de motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs, *Pathogen Associated Molecular Patterns*) par des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRRs, *Pattern Recognition Receptors*). Les PAMPs correspondent à des motifs moléculaires

caractéristiques des micro-organismes très conservés au cours de l'évolution, tandis que les PRRs constituent une grande famille de récepteurs qui peuvent être :

- transmembranaires : TLR (Toll-Like Receptors) à la surface des cellules (TLR1, 2, 4, 6) ou dans les endosomes (TLR3, 7, 8, 9)
- ou cytosoliques : NLR (*NOD-Like Receptors*) et RLR (hélicases du groupe des *RIG-I-Like Receptors*).

La fixation des PAMPs sur ces récepteurs conduit d'une part à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires qui entraînent une hyperperméabilité capillaire et une attraction de cellules inflammatoires, et d'autre part à la production d'interférons de type I qui sont centraux dans la réponse antivirale. La signalisation des PRRs peut aussi être initiée par la liaison de DAMPs (*Damage-Associated Molecular Patterns*), signaux endogènes libérés par les cellules endommagées ou stressées, ce qui amplifie la réaction inflammatoire locale une fois celle-ci initiée.

Plusieurs PRRs entrent en jeu dans l'activation de l'immunité innée suite à l'infection par le SARS-CoV-2.

Parmi eux, le TLR4 semble jouer un rôle important dans la physiopathologie de la réponse immunitaire innée à cette infection (225). Ce récepteur transmembranaire est exprimé à la surface des cellules de l'immunité innée mais aussi à plus faible niveau à la surface de cellules résidentes du tissu pulmonaire, dont les pneumocytes alvéolaires de type I et II et les cellules bronchiques ciliées (225). Connu pour se lier au lipopolysaccharides (LPS) bactériens, ce récepteur peut aussi se lier à la glycoprotéine S du SARS-CoV-2 avec une forte affinité (estimée supérieure à celle pour l'ACE2 dans une étude) (226). De plus, la signalisation de TLR4 est également possible suite à la fixation de DAMPs tels que la protéine HMGB1 ou les phospholipides oxydés libérés dans le poumons suite au stress oxydatif secondaire à l'infection, ce qui amplifie l'inflammation locale (227).

La liaison de ligands aux TLR4 entraîne leur dimérisation suivie du recrutement de protéines adaptatrices et l'activation de deux voies de signalisation complémentaires dans le contrôle de l'infection (228) :

- **La voie canonique dépendante de MyD88**

La première voie de signalisation du TLR4 implique le recrutement de MyD88 (*myeloid differentiation primary response 88*) via la protéine adaptatrice Mal (*MyD88 adaptor-like*). Cette voie conduit à l'activation de la molécule TRAF6 (*TNFR-associated factor 6*) qui elle-même entraîne l'activation du facteur de transcription NFκB (*nuclear factor kappa B*) et dans une moindre mesure AP-1 (*Activator protein-1*). Ceci déclenche la production et la sécrétion de plusieurs cytokines pro-inflammatoires dont le TNF-α (*tumor necrosis factor alpha*), l'interleukine (IL)-1 et l'IL-6. Cette voie est essentielle car ces cytokines permettront un recrutement de cellules immunitaires (monocytes-macrophages, cellules NK, polynucléaires neutrophiles, cellules dendritiques) sur le site de l'infection, qui contribueront à l'élimination des cellules infectées et au déclenchement de l'immunité adaptative.

- **La voie alternative dépendante de TRIF**

Cette voie alternative implique une internalisation du TLR-4 associé à son ligand par voie endosomale. Elle est initiée par le recrutement de la protéine TRIF (*TIR domain-containing adaptor inducing interferon-beta*) via la protéine adaptatrice TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*), et aboutit à l'activation du facteur de transcription IRF3 (*interferon regulatory factor 3*). Après translocation dans le noyau, celui-ci déclenche la production d'interférons de type I (IFN-1), dont l'IFN-α et l'IFN-β, d'interférons de type III et d'autres cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 ou encore l'antagoniste du récepteur de l'IL-1 (IL-1Ra). Les IFN-1 sont considérées comme les premières lignes de défense contre les infections virales. En effet, une fois sécrétés, ces interférons pourront se lier aux récepteurs IFNARs (*interferon alpha-beta receptors*) exprimés de façon ubiquitaire à la surface des cellules, activer la voie de signalisation JAK/STAT (*Janus-kinase/Signal-transducer and activator of transcription*) et

ainsi promouvoir l'expression d'une grande famille de gènes cibles appelés ISG (*interferon-stimulated genes*) en se fixant sur les éléments de réponse IRE (*IRF Response Element*). Les différentes protéines produites contribuent au blocage de la réplication virale à chaque étape du cycle et à la protection des cellules voisines non-infectées, ce qui fait de la réponse interféron un élément primordial pour une lutte antivirale précoce efficace. Il est cependant intéressant de noter que le gène de l'ACE2 fait lui aussi partie des ISG, la réponse interféron induisant donc paradoxalement une expression accrue du récepteur du SARS-CoV-2 par les cellules épithéliales du tractus respiratoire.

Outre via le TLR4, le SARS-CoV-2 est reconnu comme étranger par l'intermédiaire d'autres interactions entre PAMPs et PRRs. Ainsi, plusieurs études suggèrent que les TLR1, TLR2 et TLR6 au niveau de la membrane plasmique interviendraient dans la reconnaissance du virus, avec un effet pro-inflammatoire via la voie dépendante de MyD88 (226,229).

D'autres PRRs situés quant à eux au niveau intracellulaire reconnaissent l'ARN viral dans les cellules infectées :

- Au niveau endosomal, l'ARN viral simple brin est reconnu par les TLR7 (fortement exprimé par les cellules dendritiques plasmacytoïdes) et TLR8 (principalement exprimé par les cellules myéloïdes), entraînant une signalisation par MyD88 qui conduit à l'activation des facteurs de transcription IRF7 (avec un effet similaire à IRF3 induisant une réponse IFN) et NFκB (pro-inflammatoire). L'activation de ces TLR a globalement un effet protecteur, la réponse antivirale interféron étant prédominante.
- De même, le TLR3 également localisé au niveau de l'endosome reconnaît l'ARN viral double brin (ou les boucles formées par l'ARN simple brin dans le cas du SARS-CoV-2). Cette liaison entraîne un recrutement de TRIF puis l'activation des facteurs de transcription NFκB (pro-inflammatoire) et IRF3 (réponse interféron) (230).

- Enfin, les molécules RIG-1 (*retinoic acid-inducible gene 1*) et MDA5 (*melanoma differentiation-associated protein 5*) font partie de la famille des RLR cytosolubles et reconnaissent également l'ARN viral, ce qui là aussi provoque l'activation d'IRF3, contribuant ainsi à la réponse interféron antivirale.

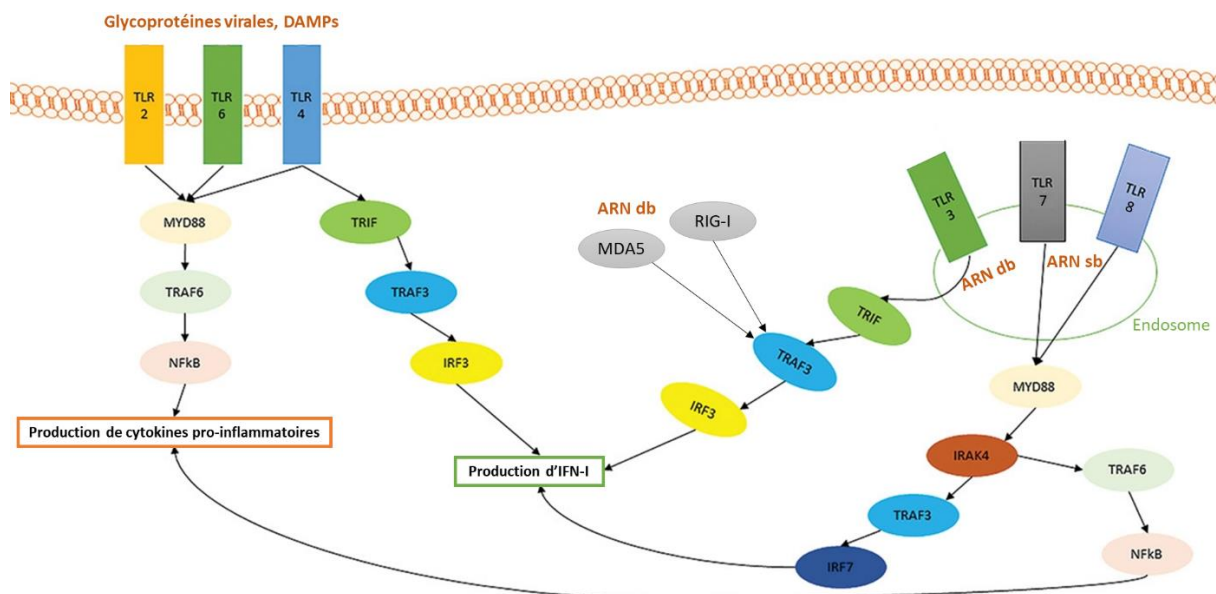


Figure 17 : Voies de signalisation des TLRs et RLRs impliquées dans la réponse immunitaire innée contre le SARS-CoV-2.
D'après Khanmohammadi et al., 2021 (231).

Enfin, la réponse inflammatoire à l'infection implique la protéine NLRP3 (*NLR family pyrin domain-containing 3*) qui est activée en réponse à la liaison de DAMPs mais aussi de plusieurs PAMPs du SARS-CoV-2, dont la protéine N, la protéine ORF3a ou encore l'ARN viral (232–234). La protéine NLRP3 s'assemble ensuite avec la caspase-1 en inflammasome, conduisant à la maturation et la libération de cytokines inflammatoires telles que l'IL-1 β et l'IL-18 et favorisant la mort cellulaire par pyroptose (233).

En cas de contrôle efficace de la réplication virale par une réponse interféron précoce associée à une réponse inflammatoire adaptée, l'infection n'entraîne que peu voire pas de symptômes. Cependant, certains patients développent une réponse interféron retardée ou insuffisante à l'origine d'un déséquilibre en faveur de l'inflammation, celle-ci étant corrélée à la sévérité de

la maladie (235,236). En effet, les cas sévères de COVID-19 sont associés à une chute des cellules dendritiques plasmacytoïdes circulantes, ce type cellulaire étant le principal producteur d'IFN-I (237). Ce défaut de réponse interféron peut aussi s'expliquer par des mécanismes d'échappement du virus, notamment via l'action inhibitrice de nombreuses protéines virales sur l'activation des facteurs de transcription IRF, sur la production d'IFN-I ou sur la signalisation consécutive à sa liaison aux récepteurs IFNAR (238–241). À l'inverse, certaines protéines structurales (N, M) et accessoires (ORF3a et ORF7a) du virus sont des activateurs de la voie inflammatoire NFκB (242). La liaison de la protéine S à l'ACE2 pourrait également induire l'activation de l'enzyme TACE (TNF-α converting enzyme) par la partie intracytoplasmique de l'ACE2 et ainsi favoriser la production de TNF-α, par analogie avec le SARS-CoV (243).

Outre ces mécanismes intrinsèques à l'infection par le SARS-CoV-2, une prédisposition génétique peut être mise en cause dans certains cas de défaut de réponse interféron. Certains patients atteints de formes sévères de COVID-19 sont notamment porteurs de mutations dans des gènes intervenant dans la production ou la signalisation de l'IFN-I (3,5 % des cas sévères dans une étude portant sur 659 patients) (244). De plus, une autre cause possible de réponse interféron insuffisante est la production constitutive d'auto-anticorps dirigés contre les IFN-I qui bloquent ces cytokines avant qu'elle exercent leur action antivirale (245). Une étude de Bastard et al. a estimé que ces auto-anticorps étaient présents dans environ 10 % des cas sévères (2,6 % des femmes et 12,5 % des hommes), tandis qu'aucun cas n'avait été mis en évidence parmi les 663 formes modérées ou asymptomatiques incluses (246). De plus, une étude plus récente de la même équipe révèle que la production de ces auto-anticorps anti-IFN-I est plus fréquente avec l'âge, avec une prévalence de plus de 4% parmi les personnes de plus de 80 ans en l'absence de toute infection et une mise en évidence de ces auto-anticorps dans plus de 20 % des cas sévères de COVID-19 dans cette classe d'âge (247). Enfin, le risque de réponse interféron retardée augmente avec l'âge et lors de l'exposition à une forte dose infectante de virus (235). L'augmentation de la voie TLR/MyD88/NFκB

pro-inflammatoire au détriment de la réponse interféron est également une hypothèse qui pourrait en partie expliquer le risque accru de forme sévère de COVID-19 en cas d'obésité (248).

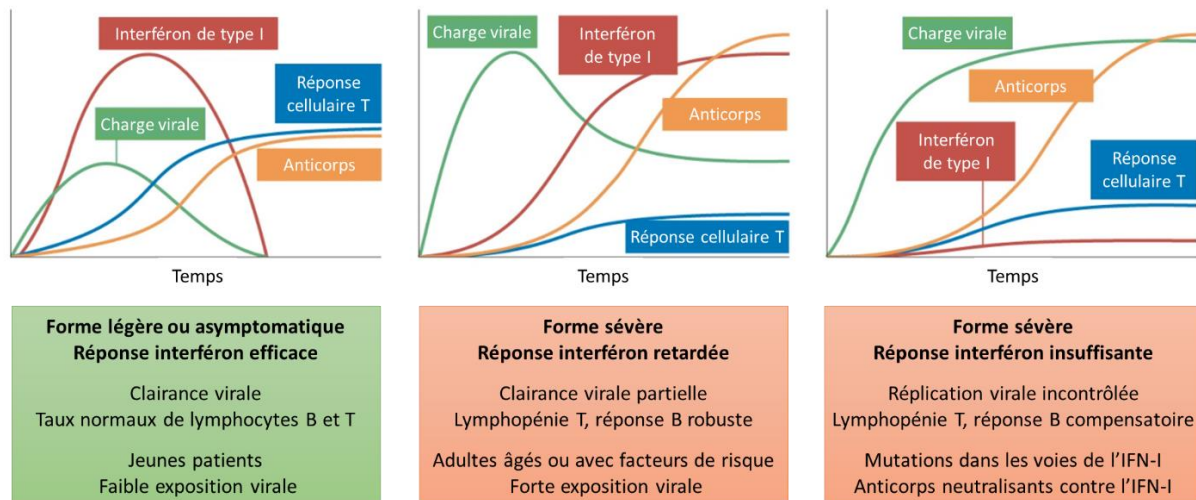


Figure 18 : Impact du délai et de la force de la réponse interféron sur l'élimination du SARS-CoV-2 et le développement de l'immunité adaptative.

D'après Carvalho et al., Nature, 2021 (235).

L'inefficacité de la réponse interféron précoce observée chez certains patients a pour effet un défaut de contrôle de la réplication virale et un déséquilibre de la réponse immunitaire innée en faveur de l'inflammation, celle-ci pouvant être responsable d'une aggravation clinique. Elle est associée à un afflux de macrophages et de neutrophiles qui entretiennent les réactions immunitaires délétères (249,250), tandis que la clairance des cellules infectées est limitée par un épuisement fonctionnel des cellules NK (251,252).

Dans les cas sévères, un processus de PANoptose peut être mis en cause, regroupant les phénomènes d'apoptose, de nécroptose et de pyroptose (228). Ce processus de mort cellulaire programmée est induit par une production excessive de cytokines pro-inflammatoires, en particulier le TNF- α et l'IFN- γ , et accroît encore la production des cytokines pro-inflammatoires par un effet de boucle d'auto-amplification. Ceci peut aller jusqu'au choc

cytokinique responsable de dommages tissulaires importants et conduisant potentiellement à un SDRA voire à un choc de défaillance multi-viscérale (253).

Ainsi, le SDRA est le résultat de plusieurs processus immunitaires délétères consécutifs à l'infection virale (214,254,255):

- L'inflammation augmente la perméabilité capillaire au niveau des alvéoles pulmonaires, ce qui favorise l'attraction de cellules immunitaires innées et notamment de macrophages et de polynucléaires neutrophiles qui exacerbent la réaction inflammatoire. La perméabilité capillaire accrue entraîne également un afflux de liquide riche en protéines dans les alvéoles, responsable d'un œdème dans le tissu pulmonaire interstitiel et de dépôts de fibrine sur les parois alvéolaires sous forme de membranes hyalines.
- L'excès d'inflammation induit une lyse importante des pneumocytes de type II, ce qui entraîne un défaut de production de surfactant et limite ainsi la compliance pulmonaire.
- Lors d'une seconde phase du SDRA, l'inflammation active des processus de réparation tissulaire avec une prolifération excessive des fibroblastes, qui se traduit par une fibrose pulmonaire.

L'ensemble de ces processus mènent à une hypoxie, qui elle-même contribue à l'inflammation pulmonaire en augmentant le recrutement de cellules immunitaires et la signalisation des voies pro-inflammatoires (240,256).

L'atteinte de l'endothélium est par ailleurs un facteur clé dans le développement des complications extra-pulmonaires de la COVID-19. D'une part, l'altération de la barrière alvéolo-capillaire au niveau pulmonaire favorise la dissémination du virus vers d'autres organes tels que le cœur, les reins, les intestins ou le cerveau, avec notamment une atteinte de la microcirculation locale (257). D'autre part, l'environnement inflammatoire et les lésions de l'endothélium peuvent provoquer des phénomènes de thromboses artérielles ou veineuses, au niveau pulmonaire (embolie) ou à distance, associant une hyperactivation de la coagulation

et un défaut de fibrinolyse (43,249). La nature du récepteur du SARS-CoV-2 intervient probablement aussi dans la pathogénèse de l'infection : la liaison du virus à l'ACE2 pourrait limiter les propriétés vasodilatatrices et anti-fibrosante de cette enzyme et augmenter encore la perméabilité vasculaire en freinant la régulation du système rénine-angiotensine-aldostérone (258). Enfin, la dérégulation du système immunitaire et l'excès global d'inflammation lors du choc cytokinique peuvent avoir un retentissement sur l'ensemble des organes et favoriser les complications thrombotiques (257).

2. Réponse immunitaire adaptative

Quelques jours après le début de l'infection, l'immunité adaptative ciblant spécifiquement le SARS-CoV-2 se met en place. Indispensable à l'élimination du virus, l'immunité adaptative s'appuie sur deux bras, tous deux nécessaires et complémentaires :

- La réponse cellulaire, médiée par les lymphocytes T (LT), vise à coordonner la réponse immunitaire via les LT CD4+, à tuer les cellules infectées via les LT CD8+, et enfin à réguler l'intensité et la durée de la réponse immunitaire.
- La réponse humorale, médiée par les lymphocytes B (LB), est à l'origine de la production d'anticorps dirigés contre le SARS-CoV-2.

La réponse adaptative permet également au système immunitaire de garder l'infection en mémoire et de générer une immunité protectrice pour lutter plus efficacement lors d'une éventuelle prochaine rencontre. Pour cela, elle génère des lymphocytes mémoires T et B capables de s'activer rapidement et efficacement lors d'une nouvelle infection.

2.1. Immunité cellulaire

a. Physiologie du développement de la réponse immunitaire cellulaire

Les LT circulent en permanence entre les vaisseaux sanguins, les vaisseaux lymphatiques et les organes lymphoïdes secondaires (ganglions, rate). L'initiation de l'immunité adaptative nécessite l'activation des LT naïfs spécifiques d'un peptide antigénique au niveau de ces organes lymphoïdes. Cette première étape est médiée par la présentation de peptides antigéniques par les cellules présentatrices d'antigène, essentiellement les cellules dendritiques immatures. Celles-ci capturent l'antigène au niveau du site de l'infection, l'appêtent sur les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) à la surface cellulaire et migrent vers les organes lymphoïdes secondaires tout en devenant matures, pour enfin présenter cet antigène aux lymphocytes. Les LT interagissent avec les cellules dendritiques matures via leur TCR (*T-cell receptor*) qui se lie au peptide antigénique présenté par le CMH des cellules dendritiques (CMH-II pour les LT CD4+ et CMH-I pour les LT CD8+), et via plusieurs signaux de co-stimulation indispensables à une activation lymphocytaire totale (principalement CD28-CD80/86, CD40-CD40 ligand) (259).

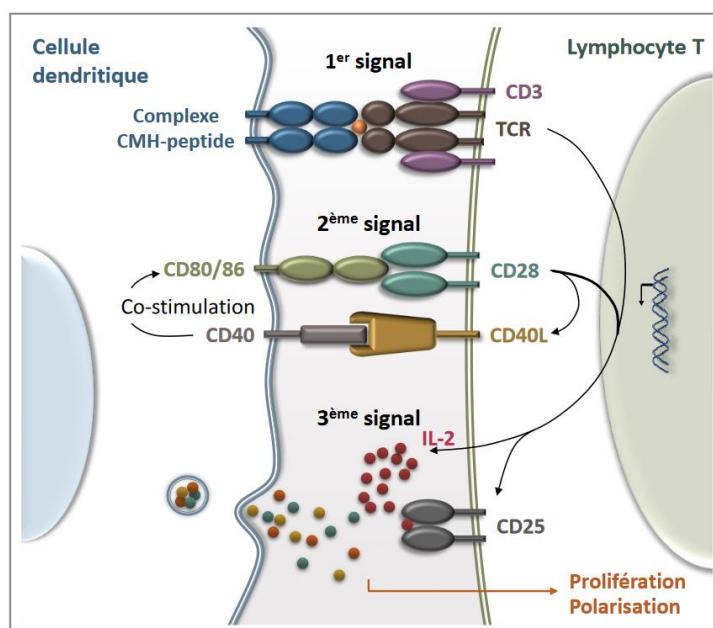


Figure 19 : Signaux d'activation du lymphocytes T par la cellule dendritique mature.
D'après la thèse de Ciudad M, Université de Bourgogne Franche-Comté, 2018 (260).

Les LT activés entament alors une phase de prolifération sous l'action de l'IL-2 puis de différenciation, conduisant au développement de différents types de populations lymphocytaires T :

- les LT effecteurs intervenant dans le contrôle de l'infection en cours ;
- les LT mémoires capables d'induire une réponse immunitaire plus rapide, plus efficace et plus spécifique en cas de nouvelle rencontre avec l'antigène.

D'un point de vue fonctionnel, les LT CD4+ effecteurs aussi appelés « auxiliaires » (*T helper*, Th) comprennent plusieurs sous-populations différenciées par leur profil de sécrétion cytokinique, leur expression de récepteurs membranaires et de facteurs de transcription (261):

- Les LT CD4+ de type **Th1** sécrètent principalement les cytokines IL-2, IFN- γ et TNF- α et sont essentiellement impliqués dans le développement et le maintien des réponses contre les agents pathogènes intracellulaires. Ces lymphocytes interviennent dans des fonctions à médiation cellulaire telles que l'induction de la différenciation des LT CD8+ naïfs en LT CD8+ effecteurs, l'augmentation de la phagocytose par les macrophages et de l'expression du CMH à leur surface, ou encore l'activation des cellules NK.
- Les LT CD4+ de type **LTh2** sécrètent les interleukines IL-4, IL-5 et IL-13, et participent principalement à la réponse humorale en orientant la commutation de classe des LB vers la production d'immunoglobulines E (IgE) et en entraînant le recrutement de polynucléaires éosinophiles et de mastocytes. Les deux sous-populations lymphocytaires Th1 et Th2 tendent à s'inhiber mutuellement : l'IL-4 limite la différenciation et la prolifération des LTh1, tandis que l'IFN- γ exerce l'action inverse.
- Les LT CD4+ de type **LTh17**, caractérisée par la production d'IL-17 et d'IL-22, ont des fonctions diverses notamment orientées vers la défense contre les bactéries extracellulaires et les champignons. Ils favorisent notamment le recrutement des polynucléaires neutrophiles, des macrophages et des LTh1.

- Les LT régulateurs (**LTreg**) sécrètent des cytokines anti-inflammatoires dont principalement l'IL-10 et le TGF- β . Ils sont impliqués dans le contrôle des réponses immunitaires et le maintien de la tolérance immune.
- Les LT auxiliaires folliculaires (*follicular helper*, **LTfh**) localisés dans les organes lymphoïdes secondaires interagissent à l'interface des zones T et B avec les LB naïfs spécifiques de l'antigène, favorisant ainsi leur prolifération, leur maturation d'affinité pour l'antigène et leur différenciation soit en LB mémoires soit en plasmocytes de longue durée de vie (262).
- L'existence de LT auxiliaires périphériques (*peripheral helper*, **LTph**) a récemment été décrite. Il s'agit d'une population de lymphocytes analogues aux LTfh qui stimulent les LB mémoires dans les tissus périphériques et sont impliqués dans certaines maladies auto-immunes (263).

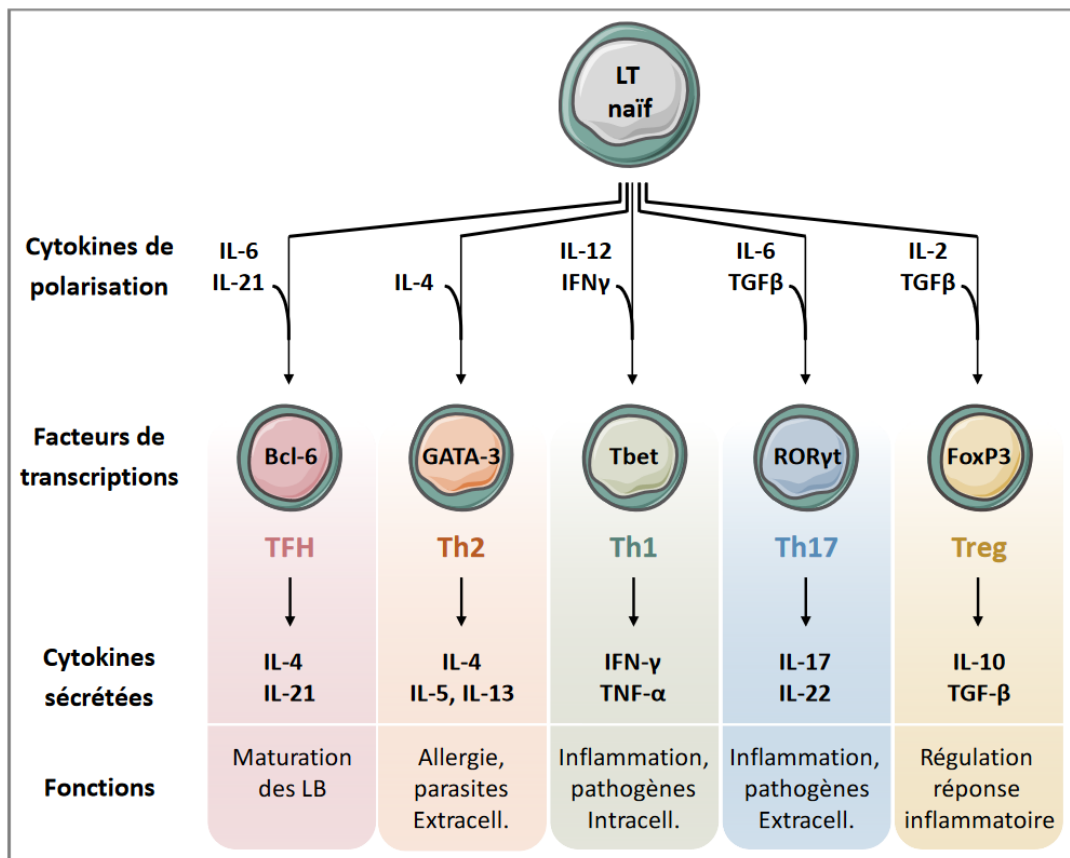


Figure 20 : Polarisation des lymphocytes T CD4.

D'après la thèse de Ciudad M, Université de Bourgogne Franche-Comté, 2018 (260).

L'activation des LT CD8 est elle aussi principalement médiée par les cellules dendritiques. Leur TCR est stimulé par l'antigène associé au CMH de type I à la surface de cellules dendritiques infectées ou non infectées par phénomène de présentation croisée. Cette activation est facilitée par la coopération des LTh1 qui augmentent notamment l'expression des molécules de costimulation par les cellules dendritiques. Outre l'activité de sécrétion de cytokines, les LT CD8 effecteurs ont une activité cytotoxique visant à induire la mort des cellules infectées :

- Ces lymphocytes libèrent des granules intracellulaires cytotoxiques contenant des protéines lytiques, à savoir la perforine formant des pores dans la membrane cellulaire et les granzymes induisant l'apoptose via l'activation des caspases.
- Les LT cytotoxiques peuvent également se lier aux récepteurs de mort cellulaire Fas à la surface des cellules cibles via le ligand (FasL), induisant ainsi leur apoptose.

Enfin, qu'il s'agisse des LT ou LB, une partie des cellules se différencient non pas en cellules effectrices mais en cellules mémoires suite à leur activation. Ces lymphocytes mémoires diffèrent entre eux par leur territoire de circulation (sang, organes lymphoïdes secondaires ou associés aux muqueuses), leurs capacités de prolifération et leur stade de différenciation dont dépendent leurs capacités effectrices. Ainsi, les LT centraux mémoires (T_{CM}) sont peu différenciés, circulent essentiellement entre le sang et les organes lymphoïdes mais ont une longue durée de vie et une capacité d'auto-renouvellement, tandis que les lymphocytes effecteurs mémoires (T_{EM}) ou effecteur terminaux (T_{EMRA}) circulent davantage en périphérie à des stades de différenciation plus avancés. Ceci permet à l'organisme de garder une mémoire immunologique sur le long terme mais aussi de pouvoir réagir rapidement et plus intensément en cas de nouvelle infection.

b. Réponse cellulaire dirigée contre le SARS-CoV-2

La réponse cellulaire spécifique du SARS-CoV-2 est un élément essentiel de l'immunité pour le contrôle de l'infection virale. Dans la majorité des cas, une réponse cellulaire se développe précocement dans les sept premiers jours suivant les symptômes avec un pic observé à 14 jours, ce qui favorise une clairance virale efficace et une résolution rapide de l'infection (264,265). Ainsi, une réponse CD4 mémoire est mise en évidence dans plus de 90 % des cas chez les patients guéris un mois après les premiers symptômes, avec une fréquence moindre observée pour la réponse CD8 d'environ 70 % (266–270). Néanmoins, certains patients développent une immunité adaptative inadaptée qui concourt à l'évolution vers une forme sévère. Cette dérégulation est probablement en partie due à l'excès d'inflammation consécutif à la réponse interféron insuffisante lors de la première phase de l'infection. Plusieurs profils immunitaires ont ainsi été décrits comme associés aux cas sévères de l'infection, impliquant notamment une altération quantitative ou fonctionnelle ou encore une hyperactivation de la réponse cellulaire (271).

L'une des caractéristiques de la COVID-19 est la survenue d'une lymphopénie, corrélée avec la sévérité de la maladie. La lymphopénie est fréquemment observée dans les infections virales respiratoires, comme dans les infections à virus respiratoire syncytial (VRS), au virus de la grippe ou encore à rhinovirus, mais elle survient généralement de 2 à 4 jours autour du début des symptômes et n'est que de très courte durée (272). À l'inverse, la lymphopénie est potentiellement plus profonde et prolongée dans la COVID-19, bien qu'elle se résolve avec la guérison (273). Cette lymphopénie affecte préférentiellement les LT CD8+ (237,274,275), ce qui entraîne un profil paradoxal de suppression et d'activation concomitantes de ces lymphocytes : une perte allant jusqu'à 80 % des LT CD8+ circulants intervient en même temps que la prolifération des 20 % restants en réponse à l'infection (237). La lymphopénie pourrait s'expliquer par un recrutement des lymphocytes de la circulation sanguine vers le tractus respiratoire ou leur adhésion aux cellules endothéliales des zones infectées. Cependant, l'analyse post-mortem de liquides broncho-alvéolaires n'a pas mis en évidence d'infiltration

lymphocytaire excessive (276,277). Une autre hypothèse serait un effet de l'environnement inflammatoire via les cytokines sécrétées en réponse à l'infection, entraînant une hyperactivation ou un excès d'apoptose des lymphocytes T (264). En ligne avec l'occurrence de la lymphopénie, une augmentation du ratio de la concentration de polynucléaires neutrophiles par rapport à celle des lymphocytes (indicateur d'inflammation) a été proposée comme marqueur prédictif d'évolution vers une forme sévère de la maladie (278,279).

Outre l'impact de l'infection sur le nombre des lymphocytes T, la fonctionnalité de ces derniers peut être altérée. La réponse cellulaire CD4 est généralement plus forte que la réponse CD8, mais les formes légères de COVID-19 sont associées à une proportion de réponse CD8 plus importante que les cas sévères (269,270,280). Cette observation suggère un rôle protecteur d'une réponse CD8 précoce notamment via l'action cytotoxique sur les cellules infectées, ou à l'inverse un rôle délétère d'une réponse CD4 excessive.

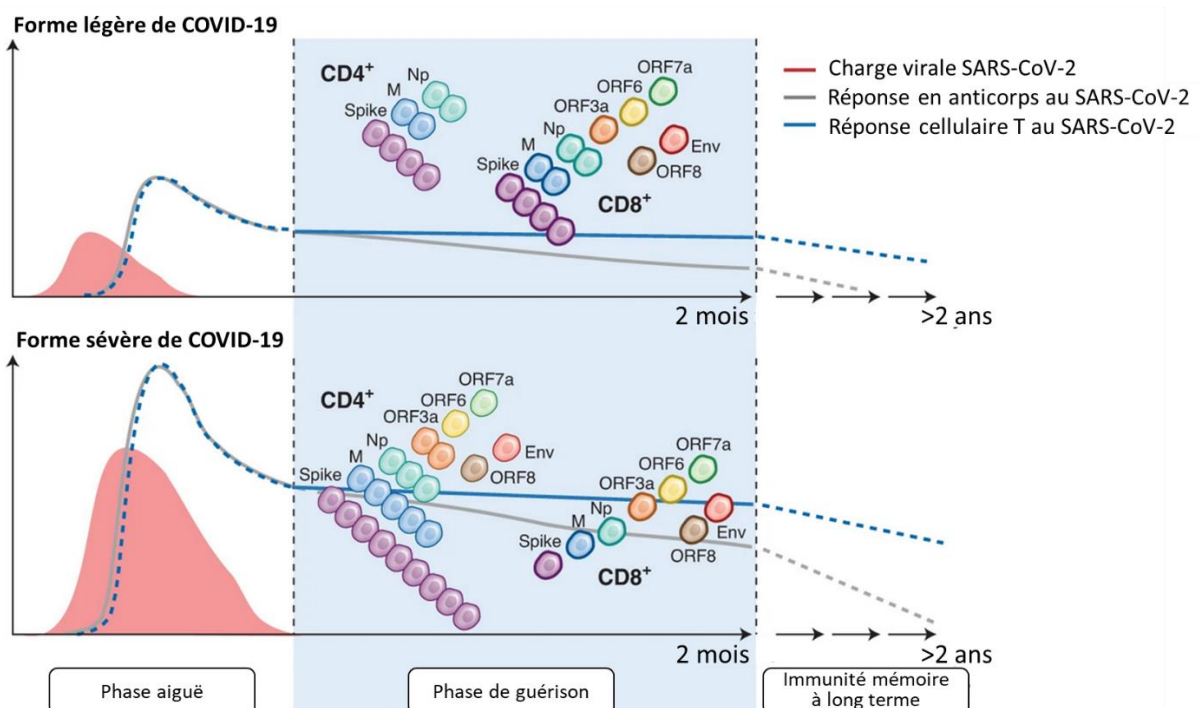


Figure 21 : Fréquence et spécificité des cellules T dirigée contre les protéines structurales et accessoires du SARS-CoV-2 pendant la phase de guérison suite à une forme légère ou sévère de COVID-19.

La réponse cellulaire est globalement plus forte et de plus large spectre en cas de forme sévère. Cependant, la réponse cellulaire T CD8 est proportionnellement plus importante en cas de forme légère. D'après Swadling et Maini, *Nat Immunol*, 2020 (281).

Concernant la polarisation de la réponse lymphocytaire CD4, la réponse protectrice est principalement orientée vers une polarisation Th1 et Tfh (269,270,282). En revanche, plusieurs études rapportent qu'un défaut de réponse Th1 et une déviation vers des réponses de types Th2 ou Th17 seraient de mauvais pronostic (264,273,283,284). Par ailleurs, bien qu'une réponse cellulaire forte associant une multifonctionnalité et une expression importante des marqueurs de LT CD8+ effecteurs soit de bon pronostic, une hyperactivation lymphocytaire T peut à l'inverse s'avérer délétère (274,285). En effet, certains patients atteints de formes sévères de COVID-19 présentent une augmentation des lymphocytes CD4, CD8 et NK avec des marqueurs d'activation (CD38, HLA-DR, Ki-67) et d'épuisement lymphocytaire (PD-1, TIM-3, NKG2A) et un profil de LT CD8+ de différenciation terminale ou sénescences (236,275,286,287). Le rôle potentiel de cette réponse dans l'aggravation clinique reste à définir (269,270,288). De même, les études de phénotypage lymphocytaire étant habituellement conduites sur des échantillons sanguins, il est possible que leurs résultats ne reflètent pas fidèlement l'immunité cellulaire *in situ* du fait d'un effet de compartimentalisation et de l'activité de cellules immunitaires résidentes dans les tissus.

La réponse cellulaire développée au cours de l'infection est dirigée contre l'ensemble des protéines du virus (289,290). Plus de 1400 épitopes ont été identifiés au total, dont plus de 1000 épitopes CD8 présentés par le CMH I et près de 400 épitopes CD4 associés au CMH II (290). La réponse cellulaire d'un individu donné cible en moyenne 17 épitopes de classe I et 19 épitopes de classe II en considérant l'ensemble des protéines du SARS-CoV-2 et la restriction du CMH pour la présentation de l'antigène (291). La majorité de ces épitopes ciblent les protéines structurales S (protéine la plus exposée de la particule virale), N et M, toutes trois fortement exprimées par les cellules infectées (290). Une étude a défini six peptides immunodominants ciblés par l'immunité cellulaire T chez 18 à 47 % des patients après une infection symptomatique, dont trois situés dans la protéine S, deux dans la protéine M et un dans la protéine N (270). Une autre étude rapporte que les protéines S, N et M sont chacune la cible de 11 à 27 % des LT CD4+ et de 12 à 26 % des LT CD8+ composant la réponse

cellulaire après l'infection (266). D'autres protéines accessoires sont également particulièrement immunogènes, dont principalement les protéines accessoires ORF3a et ORF8, ainsi que les protéines non structurales nsp3 et nsp4, nsp6, nsp12 et nsp13 exprimées à partir de l'ORF1a/b (289,290). L'ensemble de ces protéines (avec les protéine S, N et M) représentent plus de 80 % de la réponse CD4 et CD8 dirigée contre le SARS-CoV-2 (291). De plus, outre son intensité accrue, la réponse cellulaire des patients avec une forme sévère couvre davantage d'épitopes, en particulier contre les protéines S, M, ORF3a et ORF8 (270).

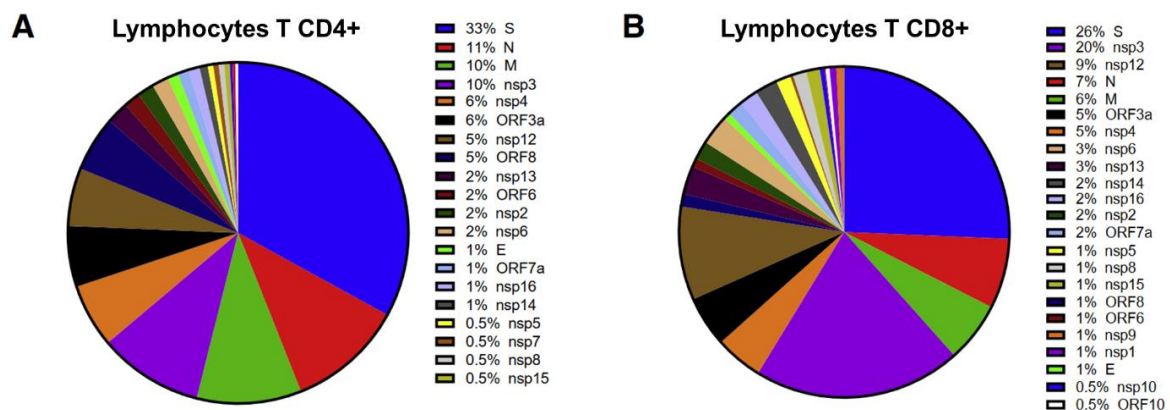


Figure 22 : Distribution des épitopes CD4 et CD8 dérivés d'antigènes du SARS-CoV-2.
D'après Grifoni et al., *Cell Host Microbe*, 2021 (290).

Au sein de la protéine S, la réactivité cellulaire CD8 couvre l'ensemble des régions de façon relativement homogène, tandis que certains épitopes immunodominants sont préférentiellement ciblés par la réponse CD4, ceux-ci étant essentiellement situés en dehors du RBD (290). Etant donné que la réactivité cellulaire cible au total majoritairement des protéines non-S et des zones conservées de la protéine spike, l'impact des mutations de variants du SARS-CoV-2 a un effet négligeable sur la fréquence et l'intensité de la réponse cellulaire (289,292,293). En effet, une étude menée en 2021 avant l'émergence du variant omicron concluait que 93 % des épitopes CD4 et 97 % des épitopes CD8 étaient entièrement conservés entre les variants préoccupants (293).

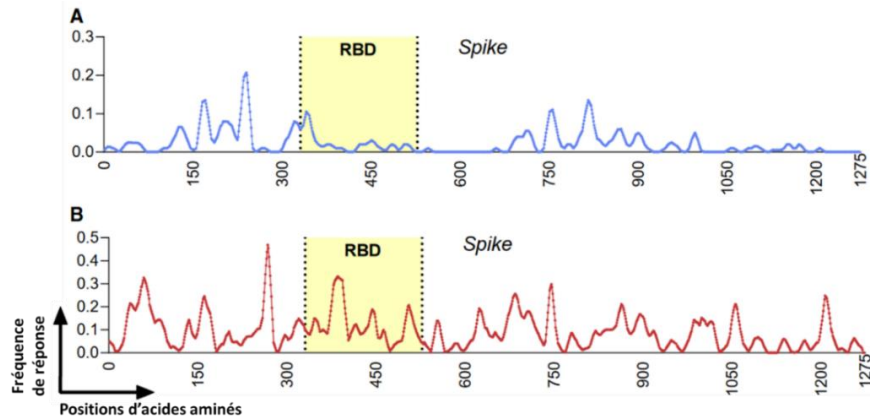


Figure 23 : Régions antigéniques ciblées par l'immunité cellulaire dans la protéine S. Cibles de la réponse CD4(A) en bleu, et de la réponse CD8 (B) en rouge. D'après Grifoni et al., *Cell Host Microbe*, 2021 (290).

Certains de ces épitopes sont partagés avec d'autres coronavirus, dont le SARS-CoV appartenant aussi au sous-genre des *Sarbecovirus*, mais aussi les anciens coronavirus saisonniers (HCoV OC43, HKU1, 229E et NL63) (294,295). Ceci explique que certains donneurs sains présentent une réactivité cellulaire détectable contre le SARS-CoV-2 avant toute infection par ce virus, ceci concernant 20 à 81 % des sujets selon les études (266,269,282,294–298). Cette réactivité cellulaire croisée contre les coronavirus saisonniers concerne davantage la réponse CD4 que la réponse CD8, et cible préférentiellement certaines protéines du SARS-CoV-2 (294). La région RBD ne comprend que 11 % des épitopes ciblés par la réactivité croisée totale, tandis que 44 % des épitopes ciblés sont situés dans les régions non-RBD conservées de la protéine S, principalement dans la sous-unité S2 (294). Cette réactivité croisée peut par ailleurs aussi cibler la protéine N et certaines protéines non structurales ou accessoires, en épargnant cependant la protéine M (266,292,294,296). Le rôle protecteur de cette immunité croisée pré-existante contre les formes graves de COVID-19 est encore débattu : certaines études décrivent une protection contre les infections graves en cas d'immunité cellulaire croisée pré-existante ou d'infection récente par un HCoV saisonnier (297,299,300), tandis que d'autres études suggèrent que ces lymphocytes T à réactivité croisée auraient une faible affinité pour le SARS-CoV-2 et pourraient freiner l'établissement d'une réponse *de novo* efficace (301,302).

L'immunité T mémoire développée suite à l'infection comporte majoritairement des LT CD4+ sécrétant de l'IL-2, du TNF- α et de l'IFN- γ (270,303,304), et des lymphocytes LT CD8+ mémoires. L'ensemble de ces lymphocytes spécifiques représentent typiquement environ 0,5 % du répertoire CD4 et 0,2 % du répertoire CD8 après infection, et leur demi-vie a été estimée à environ 200 jours (305). Cependant, il existe une forte hétérogénéité interindividuelle de la réponse cellulaire mémoire, une étude concluant par exemple à une immunité plus forte après une infection symptomatique en comparaison des cas asymptomatiques (303).

La question de la part de protection conférée par la réponse cellulaire post-infectieuse spécifique du SARS-CoV-2 contre une réinfection n'est pas complètement élucidée, bien que le rôle de la réponse humorale soit prépondérant. Les données de la littérature sont en faveur d'un rôle de l'immunité cellulaire post-infectieuse dans la protection contre une réinfection et surtout contre sa dissémination et son évolution vers une forme sévère. Le développement de lymphocytes T résidents mémoires dans les tissus et notamment au niveau pulmonaire joue très probablement un rôle important dans cet effet protecteur (306). Une étude rapporte un résultat encourageant avec la détection de ces lymphocytes au moins 10 mois suivant une première infection (307). Une seconde étude rapporte que la déplétion lymphocytaire T CD8 chez des macaques rhésus infectés par le SARS-CoV-2 sept semaines auparavant a partiellement réduit leur protection contre la réinfection après réexposition au virus au niveau du tractus respiratoire supérieur (308). La réponse humorale était cependant relativement faible au même moment, avec des titres neutralisants de $1,9 \log_{10}$ IC50 en médiane. Ces résultats suggèrent que l'immunité cellulaire post-infectieuse participe en partie à la protection contre la réinfection, en particulier dans un contexte de titres d'anticorps suboptimaux.

2.2. Immunité humorale

a. *Physiologie du développement de la réponse immunitaire humorale*

L'immunité humorale constitue l'autre versant de la réponse immunitaire adaptative. Elle est responsable de la production d'anticorps spécifiquement dirigés contre l'agent pathogène et joue ainsi un rôle crucial dans le contrôle de l'infection.

La mise en place de l'immunité humorale nécessite l'activation, la prolifération et la différenciation des LB naïfs matures. Ceux-ci expriment chacun à leur surface une immunoglobuline de type IgM ou IgD spécifique de leur antigène, enchâssée dans la membrane plasmique et correspondant au BCR (*B-cell receptor*). Les lymphocytes naïfs circulent en permanence à travers les organes lymphoïdes secondaires où ils sont susceptibles de rencontrer leur antigène, que ce dernier soit soluble ou inséré à la surface d'une membrane cellulaire ou virale. L'interaction avec l'antigène est requise pour l'activation des LB, avec ou plus rarement sans la nécessité de l'aide des LTfh (309).

Minoritaire, la **réponse T-indépendante** ne nécessite pas l'intervention des LT. Elle peut impliquer la reconnaissance d'agents mitogènes B à l'origine d'une stimulation polyclonale des LB sans passer par le BCR. L'activation T-indépendante des LB peut aussi être monoclonale et médiée par l'interaction du BCR avec des polymères constitués de déterminants antigéniques répétitifs. Cependant, les anticorps générés sont alors de faible affinité pour l'antigène et majoritairement représentés par les IgM. Plusieurs études rapportent que des LB mémoires peuvent être générés par cette voie T-indépendante, mais avec un phénotype proche des LB naïfs quant à leur sensibilité à la stimulation antigénique (310,311).

La **réponse T-dépendante** est la principale voie impliquée dans la stimulation des lymphocytes B à l'origine de la production d'anticorps. Les LB ayant fixé l'antigène par le BCR internalisent le complexe par endocytose, le dégradent et présentent le peptide correspondant à leur surface associé au CMH de type II. Les LT spécifiques du même antigène et préalablement différenciés en lymphocytes effecteurs Tfh reconnaissent le peptide présenté

par le CMH II et envoient les signaux de co-stimulation nécessaires à l'activation du LB et sa prolifération. En cas d'interaction de faible durée avec les LTfh, les LB activés se différencient préférentiellement en plasmocytes à faible durée de vie qui sécrètent des anticorps (IgM ou IgD) de faible affinité et en LB mémoires indépendants du centre germinatif. A l'inverse, un contact prolongé favorise l'engagement des LB vers une maturation T-dépendante dans le centre germinatif des follicules lymphoïdes. C'est dans ces centres germinatifs qu'auront lieu les étapes préalables à la production d'anticorps de haute affinité, toujours en collaboration avec les LTfh (309):

- L'expansion clonale des LB (appelés centroblastes à ce stade) ;
- La maturation d'affinité des Ig par hypermutation somatique pour diversifier leur BCR ;
- La commutation isotypique permettant de modifier la classe des immunoglobulines produites (IgG, IgA ou IgE)
- La sélection des LB (centrocytes) les plus affins pour l'antigène via une nouvelle interaction avec les cellules dendritiques folliculaires et les LTfh. Les centrocytes de faible affinité meurent par apoptose et sont phagocytés par les macrophages.

Ce processus de maturation se déroule au cours de plusieurs cycles jusqu'à l'obtention d'un BCR avec une affinité suffisante pour l'antigène (312). Les cellules sélectionnées se différencient enfin d'une part en LB mémoires et d'autre part en plasmocytes de longue durée de vie, qui constituent le dernier stade de différenciation de la lignée cellulaire B. Plusieurs études révèlent que les plasmocytes à longue durée de vie sont générés plus tardivement et expriment un BCR de plus forte affinité que les LB mémoires à la sortie du centre germinatif (313,314).

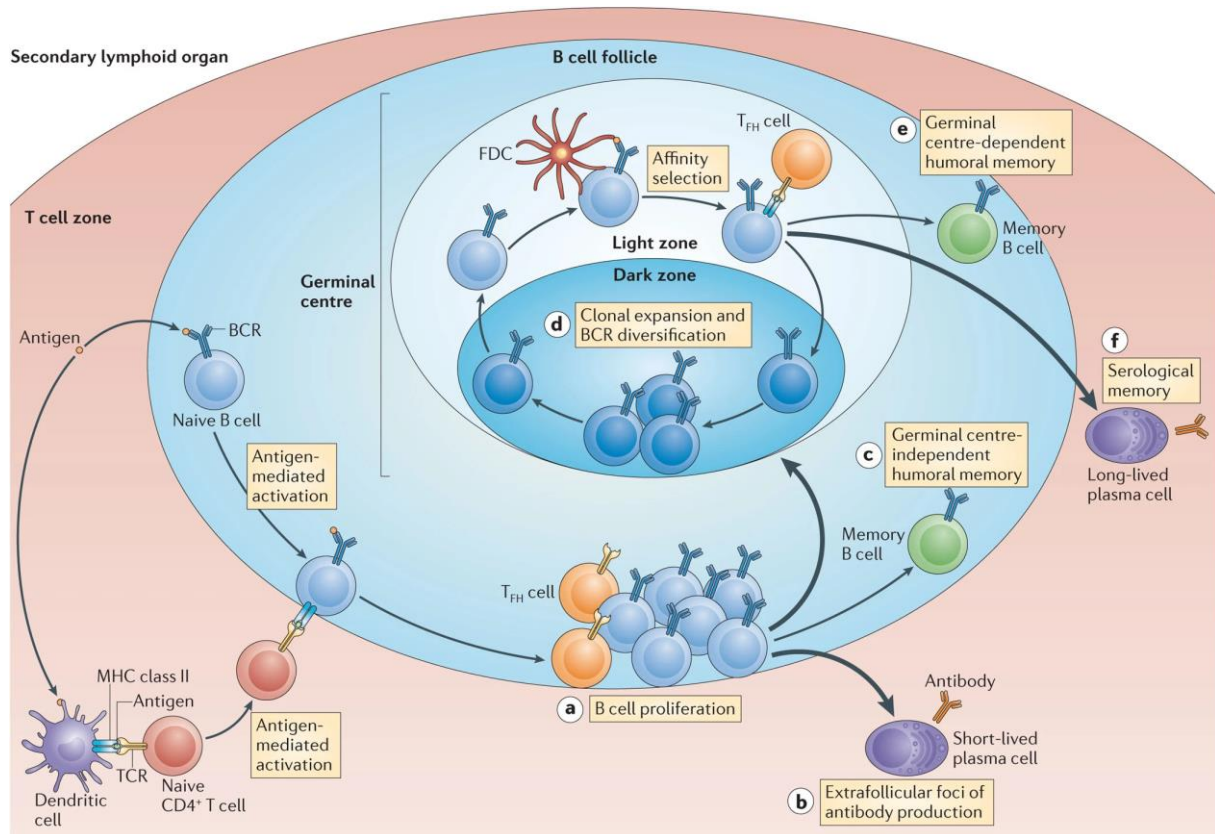


Figure 24 : Dynamique de la maturation des lymphocytes B dépendante des lymphocytes T dans le centre germinatif.

D'après Kurosaki et al., Nature Reviews Immunology, 2015 (309).

Les plasmocytes produits migrent enfin vers la moelle osseuse d'où ils produisent leurs anticorps en continu (immunité humorale constitutive). Les LB mémoires restent quant à eux dans les organes lymphoïdes secondaires où ils attendent une éventuelle réactivation par l'antigène lors d'une prochaine infection (immunité humorale réactionnelle). Lors d'une nouvelle infection, si les anticorps produits constitutivement par les plasmocytes ne sont pas en concentration suffisante sur le site de l'infection pour éliminer rapidement l'agent pathogène (en collaboration avec l'immunité innée), les LB mémoires se réactivent avec l'aide de LT_H mémoires restés dans les organes lymphoïdes secondaires et auxquels les LB mémoires présentent l'antigène capturé sur leur BCR (315).

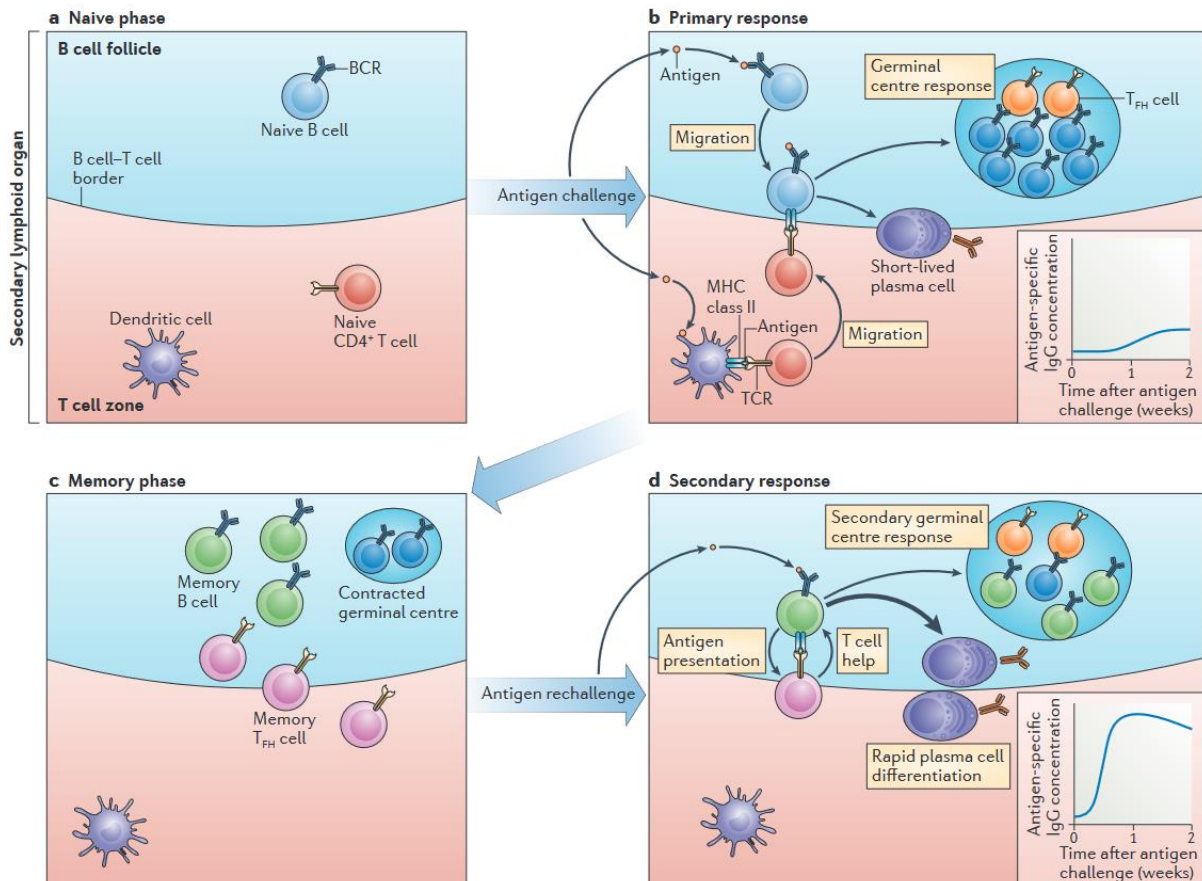


Figure 25 : Activation des lymphocytes B naïfs ou mémoires.
D'après Kurosaki et al., *Nature Reviews Immunology*, 2015 (309).

Les LB mémoires IgM+ réactivés reforment alors majoritairement des centres germinatifs dans lesquels ils subissent à nouveau des cycles de maturation d'affinité avant de devenir des plasmocytes. Les LB mémoires d'isotypes modifiés (switchés) peuvent quant à eux se différencier plus rapidement en plasmocytes sans reformation apparente de nouveaux centres germinatifs (316). L'ensemble conduit à une réponse plus intense et plus rapide que lors de la primo-infection.

Une étude sur modèle murin suggère que la mémoire immunitaire B reposerait dans un premier temps principalement sur les LB mémoires switchés, mais que les LB mémoires IgM+ constitueraient un réservoir plus durable (317). De plus, le processus de maturation d'affinité de ces derniers ultérieur à la réactivation peut également être bénéfique en cas de rencontre avec un nouveau variant de l'agent pathogène.

Les anticorps produits par les plasmocytes sont des éléments effecteurs importants de la réponse immunitaire, car ils participent pleinement à la réponse inflammatoire et contribuent à l'élimination de l'infection. Dans le contexte des infections virales, plusieurs fonctions effectrices entrent en jeu (318,319):

- La **neutralisation** directe de l'entrée virale est une fonction majeure des anticorps. La liaison de ces anticorps dits « neutralisants » à la surface du virus empêche ce dernier de se lier à son récepteur et d'entrer dans ses cellules cibles.
- Les anticorps de type IgM ou IgG fixés à leur antigène peuvent également médier l'activation de la voie classique du complément via le recrutement de la protéine C1q. Cette voie déclenche des réactions protéolytiques en cascade qui aboutissent à la formation d'un complexe d'attaque membranaire. Celui-ci induit une **cytotoxicité complément-dépendante** avec la formation de pores membranaires responsables d'une lyse osmotique des agents pathogènes et des cellules cibles infectées.
- Au cours de cette réaction en chaîne, l'activation du complément entraîne par ailleurs le clivage de la protéine C3 en C3a, une anaphylatoxine qui contribue à l'**inflammation** en recrutant des cellules myéloïdes, et en C3b, protéine opsonisante. Cette dernière peut s'associer à la surface du virus par un processus d'**opsonisation**, favorisant ainsi sa capture et sa dégradation par les cellules phagocytaires exprimant les récepteurs au C3b. Cette voie facilite également la **présentation de l'antigène viral aux lymphocytes T** après internalisation du complexe immun par les cellules dendritiques.
- Les anticorps ont eux-mêmes des propriétés opsonisantes et médient la **cytotoxicité cellulaire et la phagocytose dépendantes des anticorps**. Ces processus impliquent la reconnaissance du fragment constant (Fc) des anticorps fixés à leur antigène par les récepteurs (RFc) à la surface des cellules NK et des cellules phagocytaires, qui peuvent alors tuer les cellules infectées.

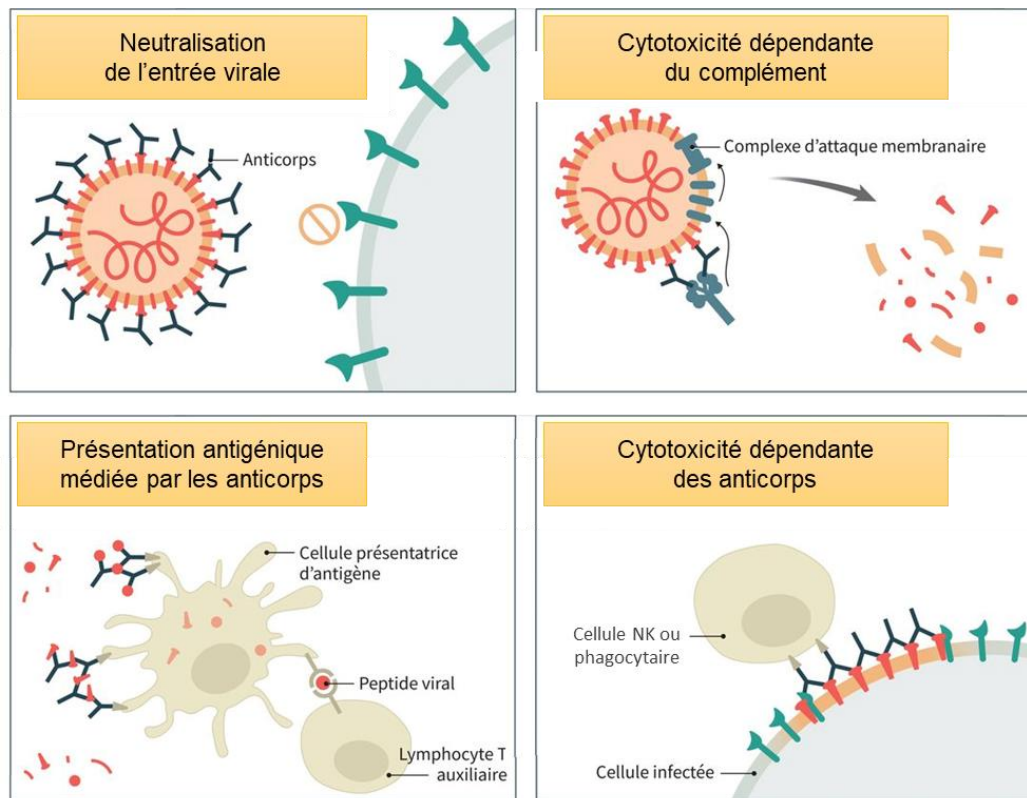


Figure 26 : Fonctions effectrices principales des anticorps.

D'après Devasenapathy et al., CMAJ, 2020 (320).

Les anticorps peuvent cependant aussi dans certains cas avoir un effet délétère en favorisant l'infection des cellules cibles et la réaction inflammatoire. Ce mécanisme est appelé facilitation de l'infection par les anticorps (*antibody-dependant enhancement, ADE*). Il implique l'internalisation de la particule virale opsonisée, que ce soit par le C3b ou par les anticorps, par les cellules phagocytaires portant le récepteur à l'opsonine qui joue le rôle indirect de récepteur d'entrée virale. Ce mécanisme, bien connu par exemple dans l'infection par le virus de la dengue, est favorisé par de faibles titres d'anticorps majoritairement constitués d'anticorps non ou peu neutralisants (321).

b. Réponse humorale dirigée contre le SARS-CoV-2

L'immunité humorale intervient dans le contrôle de l'infection et constitue l'élément majeur de protection contre les réinfections. Des anticorps spécifiques du SARS-CoV-2 se développent chez la grande majorité des patients suite à l'infection, en particulier contre les protéines S et

N, avec 91 à 99 % de séroconversions contre la protéine S selon les études (322–324). Les IgM et les IgA sériques anti-SARS-CoV-2 apparaissent le plus tôt, généralement vers le 7^e jour après le début des symptômes, puis augmentent rapidement avant de décliner à partir de la quatrième semaine (322,325). La cinétique de ces anticorps a été moins étudiée que celle des IgG, mais certaines études rapportent une persistance possible des IgM et IgA sériques jusqu'à plus de sept mois suivant le diagnostic, avec des variations selon les cibles des anticorps étudiés, les kits sérologiques utilisés et les cohortes de patients (326). Les IgG deviennent quant à elles détectables à partir du 12^e jour suivant les symptômes en médiane, atteignent leur pic après la troisième semaine, et persistent longtemps après l'infection du fait de leur sécrétion par les plasmocytes de longue durée de vie (324,325,327,328).

Les patients atteints de formes sévères développent une immunité humorale plus forte, avec des titres d'anticorps anti-S et anti-N plus élevés et un meilleur pouvoir neutralisant de leurs anticorps, probablement du fait de leur exposition intense et prolongée au virus (329). Il en est de même pour les personnes âgées et les patients de sexe masculin, pour lesquels les autres versants de l'immunité sont peut-être moins efficaces dans le contrôle de l'infection (330–332). En revanche, la rapidité du développement d'anticorps neutralisants au cours de l'infection, qui dépend notamment du recrutement des LT_{fh} par les lymphocytes B, a une valeur pronostique importante sur l'évolution de l'infection, un retard de réponse étant associé un risque accru de décès (333,334).

Bien que les titres d'anticorps neutralisants décroissent au cours des mois suivant une primo-infection, le pouvoir neutralisant intrinsèque de ces anticorps s'améliore au cours du temps et devient moins sensible aux mutations de nouveaux variants, par un phénomène de maturation d'affinité (335,336). Enfin, la caractérisation des anticorps circulants ne représente qu'un volet de l'immunité humorale post-infectieuse. En effet, les lymphocytes B mémoires et les anticorps des muqueuses (en particulier les IgA sécrétoires) participent également à la réponse humorale en cas de nouvelle stimulation antigénique.

La défense contre l'infection par le SARS-CoV-2 médiée par la réponse immunitaire humorale repose en grande partie sur l'action des anticorps neutralisants. Ceux-ci sont essentiellement dirigés contre la protéine S, avec 90 % de l'activité neutralisante portée par les anticorps ciblant les épitopes au sein du RBD (329). Cette région RBD est aussi la principale cible des anticorps anti-S totaux mesurés par test de liaison, une étude estimant la fraction de ces anticorps à 65-77 % (337). L'immunogénicité prédominante du RBD au sein de la protéine S s'explique par sa grande accessibilité à la surface de la particule virale (d'autant plus importante que la protéine S est en conformation ouverte), mais probablement aussi par sa faible glycosylation en comparaison des autres régions de la protéine S. Les autres anticorps neutralisants reconnaissent principalement le NTD, ainsi que des structures quaternaires formées par les trimères de protéine S, ou encore la sous-unité S2 (329,338).

Les autres fonctions effectrices des anticorps développés au cours de l'infection semblent cependant aussi jouer un rôle dans le contrôle de l'infection par le SARS-CoV-2. En effet, l'activité phagocytaire et l'activité du complément dépendantes des anticorps anti-S est augmentée lors de l'hospitalisation chez des patients qui évolueront vers une guérison en comparaison des patients qui décéderont de l'infection (339). Enfin, le phénomène délétère d'ADE a été mis en évidence *in vitro* à partir d'échantillons de sérum de patients atteints de COVID-19 (340–342). L'infectivité du SARS-CoV-2 observée n'était cependant que faiblement augmentée, de l'ordre de 10 fois (contre 100 à 1000 fois pour le virus de la dengue) (343). Cette augmentation implique d'une part la fixation du fragment Fc des anticorps par les cellules phagocytaires, et d'autre part le blocage du RBD en conformation ouverte suite à la fixation d'anticorps au NTD (340,342). Les données cliniques relatives aux symptômes après réinfection et à l'efficacité vaccinale sont rassurantes et plaident pour un impact très mineur de ce phénomène. Enfin, une réactivité croisée des anticorps ciblant les coronavirus saisonniers HCoVs est possible, plus fréquemment observée chez les enfants, mais généralement avec une très faible activité neutralisante contre le SARS-CoV-2 (344–347).

IV. Diagnostic et prise en charge de la COVID-19

A. Diagnostic

Le diagnostic des infections à SARS-CoV-2 est d'une grande importance dans le contexte de pandémie, d'une part pour une bonne prise en charge des patients, en particulier dans le cas des personnes fragiles ou présentant une forme sévère, et d'autre part à visée épidémiologique, pour suivre l'incidence de la COVID-19 et limiter le risque de contaminations secondaires par l'isolement des personnes infectées et le dépistage des cas contact. Les outils diagnostiques ont été mis au point à une vitesse record dès l'émergence du SARS-CoV-2, puis se sont perfectionnés et adaptés aux nouvelles problématiques apparues avec l'évolution de la pandémie.

1. Signes paracliniques d'orientation

Plusieurs anomalies biologiques peuvent être mises en évidence au cours de la COVID-19, d'autant plus importantes que l'infection est sévère. Outre la lymphopénie souvent observée, le syndrome inflammatoire d'intensité variable est associé à une hausse des cytokines pro-inflammatoires circulantes, de la ferritine, et de la protéine C-réactive (CRP). Les paramètres de la coagulation sont également à surveiller du fait d'un risque accru d'évènements thrombo-emboliques (214).

De plus, l'imagerie thoracique est un élément déterminant dans l'orientation diagnostique vers une COVID-19. En effet, le scanner thoracique sans injection fait partie des examens de première intention recommandés en cas de signes de mauvaise tolérance respiratoire, pour évaluer l'ampleur de l'atteinte pulmonaire et conforter ou non la suspicion si le cas n'est pas encore confirmé (348). Des images très évocatrices peuvent être observées, correspondant à des opacités en verre dépoli, multifocales, bilatérales et asymétriques, de localisation sous pleurale à prédominance basale et postérieure. L'absence de ces anomalies a une bonne valeur prédictive négative de près de 90 %, mais à l'inverse leur présence n'est que peu spécifique de la COVID-19 (349,350).

2. Diagnostic virologique

Le diagnostic de certitude de l'infection à SARS-CoV-2 repose sur deux stratégies. La première correspond au diagnostic direct avec la mise en évidence de composants protéiques ou génomiques du virus, tandis que le diagnostic virologique indirect consiste à rechercher les anticorps spécifiques développés en réponse à l'infection.

2.1. Diagnostic direct

Le diagnostic virologique direct réalisé à partir de prélèvements respiratoires est privilégié en phase aiguë de l'infection. La méthode diagnostique de référence correspond à une recherche de gènes cibles du génome viral par RT-PCR (*Reverse transcription polymerase chain reaction*) à partir d'un frottis nasopharyngé. À défaut, l'analyse peut être effectuée sur prélèvement salivaire, avec une sensibilité satisfaisante (351,352). Alternativement, une recherche des protéines virales par test antigénique peut être effectuée sur frottis nasopharyngé réalisé par un professionnel de santé ou sur auto-prélèvement nasal. Les tests antigéniques salivaires ne sont quant à eux pas autorisés en France, du fait de performances analytiques jugées insuffisantes (353). Enfin, en cas d'atteinte respiratoire basse, le diagnostic peut aussi être réalisé par RT-PCR sur prélèvements respiratoires plus profonds, tels qu'une aspiration trachéale ou un liquide broncho-alvéolaire, notamment en cas de suspicion forte et de résultat négatif sur frottis naso-pharyngé.

L'ensemble des tests antigéniques commercialisés en France sont des tests immunochromatographiques sous forme de cassettes qui détectent la présence de la protéine virale N. Après dépôt de l'échantillon à l'extrémité d'une membrane de nitrocellulose, l'antigène viral s'il est présent se fixe à un anticorps spécifique compris dans le kit et couplé à des particules d'or colloïdal, puis les immunocomplexes formés migrent sous l'effet du tampon de migration. Un second anticorps ciblant aussi l'antigène viral et présent dans la zone de test capture ces complexes, ce qui entraîne l'apparition d'une bande colorée. Une bande contrôle qui capture la fraction Fc des anticorps couplés à l'or colloïdal permet de vérifier la bonne migration de l'échantillon. Ces dispositifs immunochromatographiques présentent de

nombreux avantages pratiques qui ont motivé leur intégration dans les stratégies de dépistage au cours de la pandémie. Ils sont faciles d'utilisation, fournissent un résultat rapidement (généralement en 15 à 20 minutes, selon la notice du fabricant), et ne nécessitent généralement pas d'appareillage pour la lecture. Cependant, le résultat obtenu n'est que qualitatif et les performances analytiques de ces tests ne sont pas optimales, avec en particulier une sensibilité plus faible que le diagnostic par RT-PCR. En accord avec la proposition de l'OMS, la Haute Autorité de Santé (HAS) impose une sensibilité clinique minimale de 80 % et une spécificité clinique minimale de 99 % pour les tests autorisés en France (354). Malgré cette bonne spécificité, une confirmation du résultat positif par RT-PCR est recommandée en particulier pour participer au suivi épidémiologique et au suivi de l'émergence de variants du SARS-CoV-2.

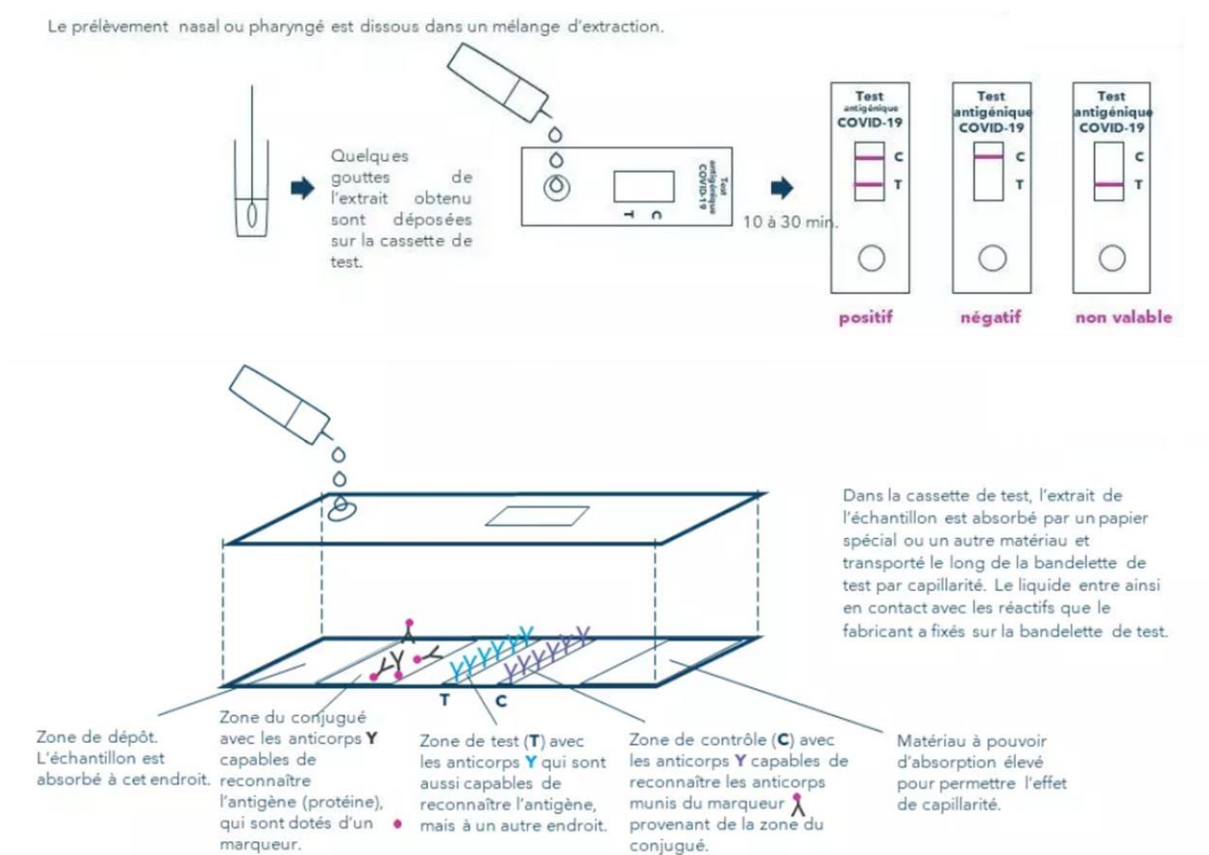


Figure 27 : Principe du test antigénique.
D'après une illustration du site Science.lu (355).

Le diagnostic par RT-PCR fait donc office de référence. Après extraction de l'ARN viral à partir du prélèvement respiratoire, la transcription inverse avec génération d'ADN complémentaire suivie de plusieurs cycles d'amplification (dénaturation – hybridation des amorces – élongation) permet la détection des régions cibles du génome viral. Cette technique a une sensibilité globale estimée entre 95 et 97 % à partir d'un frottis nasopharyngé (vs. 85-88 % sur salive) et une excellente spécificité de proche de 100 % (356–358). La sensibilité de détection est maximale au cours de la première semaine suivant le début des symptômes, voire déjà quelques jours auparavant (198). Le génome viral reste toutefois habituellement détectable jusqu'à 2 à 3 semaines (17 jours en moyenne), sans que cela témoigne de l'excrétion de virus infectieux qui ne dure généralement qu'environ une semaine après le début des symptômes (198,359–361). Néanmoins, une durée prolongée d'excrétion de virus infectieux peut être observée dans les formes modérées à sévères. En effet, une étude menée sur une cohorte de patients hospitalisés et pour la majorité en réanimation a mis en évidence une culture virale positive jusqu'à trois semaines après le début des symptômes, avec une médiane à 8 jours (199).

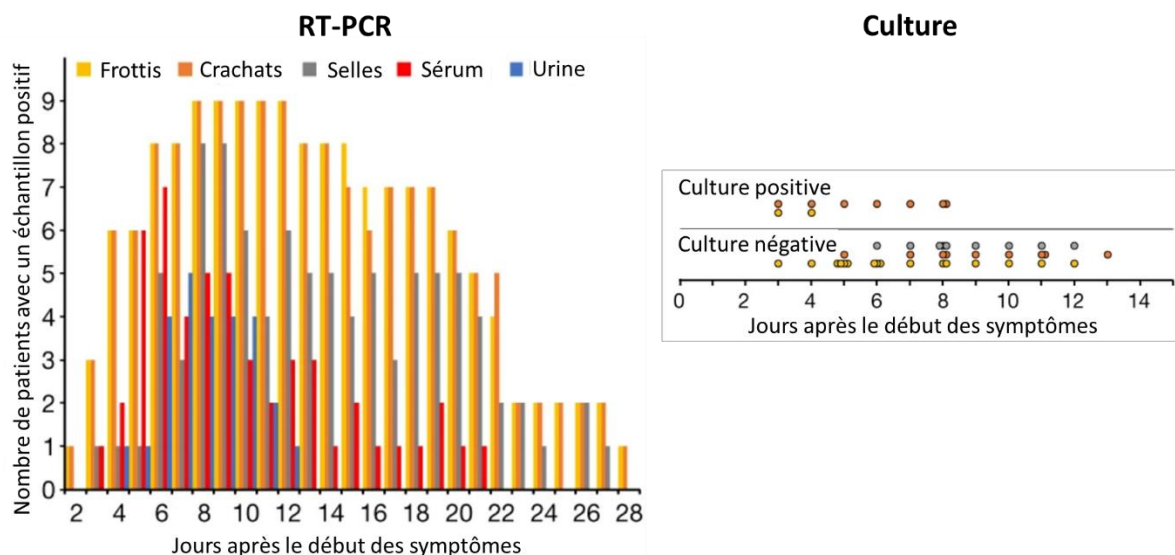


Figure 28 : Suivi longitudinal de 9 patients atteints de formes légères de COVID-19 par RT-PCR et par culture virale.

La culture s'est négativée après un peu plus d'une semaine tandis que des résultats positifs en RT-PCR ont été obtenus sur frottis nasopharyngés pendant 3 semaines chez plus de la moitié des patients. *D'après Wölfel et al., Nature, 2020 (361).*

L'Institut Pasteur a très tôt mis au point une RT-PCR ciblant deux régions de la RdRP, nommées IP2 et IP4, avec une sensibilité de détection de 10 copies par réaction (362,363). De nombreux réactifs commerciaux sont ensuite apparus sur le marché, les techniques de RT-PCR les plus couramment employées ciblant les régions ORF1ab/RdRp, E, N et S. La HAS recommande de cibler deux régions distinctes du génome, afin de limiter le risque de défaut de détection de variants portant des mutations sur les séquences d'hybridation des amorces ou de la sonde (364). La RT-PCR peut être soit uniquement qualitative, soit quantitative (RT-qPCR) permettant une estimation de la charge virale dans l'échantillon et ainsi un suivi de la clairance virale. Cette quantification est basée sur le Ct (*Cycle threshold*), correspondant au nombre de cycles d'amplification à partir duquel la cible devient détectable. En considérant la technique de référence développée par l'Institut Pasteur, un Ct inférieur à 23 témoigne d'une excrétion virale forte tandis qu'un Ct supérieur à 33 est associé à une excrétion modérée voire très faible (365).

2.2. Diagnostic sérologique

Le diagnostic sérologique consiste à détecter des anticorps spécifiques du SARS-CoV-2 développés en réponse à l'infection ou la vaccination. Dès l'été 2020, de nombreux tests sérologiques spécifiques du SARS-CoV-2 ont été commercialisés, utilisés pour mettre en évidence rétrospectivement une infection passée à partir de prélèvements sanguins. Ces tests ont notamment été employés à visée épidémiologique afin d'évaluer la part de la population immunisée contre le virus. En effet, une contamination peut passer inaperçue du fait d'une forme asymptomatique de l'infection, et de nombreux cas même symptomatiques n'ont pas été confirmés par biologie moléculaire, en particulier au début de la pandémie. La sérologie a par la suite eu un regain d'intérêt en 2021 après la mise en place de la vaccination, afin de caractériser la réponse humorale au vaccin.

Les tests sérologiques disponibles détectent alternativement les IgM, IgA et/ou IgG dirigées contre les protéines S ou N, ou encore contre la région RBD de la protéine S. Les anticorps anti-RBD ou anti-S se développent après infection ou vaccination, tandis que les anticorps

anti-N sont spécifiques d'un antécédent d'infection (hors cas de vaccination par virus entier à l'étranger). Plusieurs types de tests sont commercialisés, reposant sur des technologies différentes et avec des performances analytiques variables.

Les tests immunochromatographiques sous forme de cassettes suivent un principe similaire à celui des tests antigéniques utilisés pour le diagnostic direct : les anticorps du patient se fixent à un antigène viral couplé à des particules d'or colloïdal, puis les complexes immuns formés migrent sur la bande de nitrocellulose avant d'être capturés par des anticorps anti-Ig humaine (spécifiques d'isotype), cette capture se traduisant par l'apparition d'une bande colorée. Une bande contrôle permet de vérifier la bonne migration de l'échantillon. Ces tests faciles d'utilisation et offrant un délai rapide d'obtention de résultat (environ 15 minutes) ne permettent cependant qu'une détection qualitative ou semi-quantitative (selon l'intensité de la bande test) des anticorps. De plus, ils ne sont généralement pas automatisés et impliquent une lecture visuelle du résultat, avec une part de subjectivité.

D'autres tests sérologiques sont quant à eux automatisés et partagent le même principe : les anticorps anti-SARS-CoV-2 présents dans l'échantillon testé se fixent à l'antigène viral mis en présence, puis des anticorps secondaires couplés à une enzyme se fixent aux anticorps ayant reconnu leur antigène. L'activité enzymatique responsable du signal de détection distingue plusieurs catégories de tests sérologiques : les tests ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) avec détection d'un produit de réaction coloré et les tests CLIA (*Chemiluminescent ImmunoAssay*) avec détection d'un signal lumineux, ces derniers ayant des variantes sur microparticules (CMIA, *Chemiluminescent Microparticle ImmunoAssay*) ou mettant en jeu une réaction électrochimique (ECLIA, *ElectroChemiluminescent ImmunoAssay*).

À l'instar des exigences de performances pour les tests de diagnostic direct, la HAS impose que les tests sérologiques commercialisés en France aient une sensibilité clinique minimale de 90 à 95 % (selon l'usage) et une spécificité clinique minimale de 98 %. Les performances analytiques varient cependant entre les kits, mais aussi en fonction des isotypes

d'immunoglobulines recherchés, de la cible antigénique et du délai écoulé depuis la stimulation de la réponse immunitaire par l'infection ou la vaccination (366).

Enfin, certains tests automatisés permettent une quantification absolue des anticorps sur la base de l'intensité du signal produit. L'utilisation massive de ces tests quantitatifs et la coexistence de plusieurs kits produits par des fabricants différents a conduit l'OMS à mettre en place un standard international titré à 1000 BAU (*Binding Antibody Unit*)/mL, afin d'homogénéiser les résultats de dosage des anticorps anti-SARS-CoV-2 entre laboratoires (367). Ainsi, ce standard international a été testé avec chaque kit quantitatif sur le marché, et un facteur de conversion a été établi pour chacun d'entre eux afin de transformer le résultat du fabricant en un résultat exprimé en BAU/mL (368).

B. Prise en charge thérapeutique

Au début de la pandémie, les options thérapeutiques de prise en charge de la COVID-19 étaient très limitées. Un effort mondial de recherche et une communication soutenue des médecins au sujet de leur expérience clinique ont conduit à une meilleure compréhension de la physiopathologie de l'infection, une amélioration de la prise en charge des patients, et l'évaluation de nouvelles stratégies thérapeutiques à un rythme inédit. Outre la prise en charge symptomatique, ces stratégies reposent sur l'utilisation de traitements anti-inflammatoires, antiviraux ou encore à base d'anticorps anti-SARS-CoV-2. Les recommandations de prise en charge sont régulièrement mises à jour par l'OMS sur la base des nouvelles données de la littérature (369). Ces recommandations diffèrent entre les formes sévères de COVID-19 d'après les critères de l'OMS (SpO₂ en air ambiant <90 %, signes de pneumonie ou de détresse respiratoire) et les cas non sévères (si aucun de ces critères n'est rempli).

1. Traitements symptomatiques

Tout d'abord, la prise en charge symptomatique est primordiale, en particulier via l'oxygénothérapie lorsqu'elle est nécessaire en cas d'atteinte respiratoire basse avec une $SpO_2 < 92 \%$. Au début de la pandémie, les patients étaient intubés et ventilés mécaniquement précocement, parfois avant même l'apparition de signes évidents de détresse respiratoire. À l'inverse, l'oxygénothérapie nasale à haut débit est aujourd'hui privilégiée afin de favoriser une meilleure récupération à la convalescence, tandis que la ventilation mécanique non invasive est plutôt utilisée en seconde intention et l'intubation réservée aux cas les plus sévères, généralement en service de réanimation (370). Par ailleurs, un traitement anti-coagulant à base d'héparine est mis en place chez les patients hospitalisés pour limiter le risque de complications thrombotiques (371).

2. Traitements anti-inflammatoires

Le traitement anti-inflammatoire est un autre pilier du traitement de la COVID-19, en particulier lors de la phase d'aggravation de la maladie secondaire à l'excès d'inflammation. La corticothérapie à base de dexaméthasone s'est en effet rapidement intégrée à la prise en charge des patients hospitalisés avec une COVID-19. Elle permet de réduire la réponse inflammatoire responsable des principaux effets pathogènes de l'infection et de réduire significativement sa mortalité, mais uniquement chez les patients oxygéo-requérants (372). Ainsi, son usage en France est actuellement recommandé uniquement chez les patients hospitalisés présentant des symptômes évoluant depuis au moins une semaine (369,373). D'autres traitements anti-inflammatoires ciblant spécifiquement l'action de certaines cytokines ont également une place dans le traitement de l'infection. Les anticorps monoclonaux anti-récepteurs de l'IL-6 (tocilizumab et sarilumab) sont en effet recommandés par l'OMS dans les formes sévères par voie intraveineuse en association avec les corticoïdes, afin de bloquer l'activité pro-inflammatoire de l'IL-6 (374,375). Le baricitinib représente une alternative à ces anticorps, avec les mêmes indications mais disponible par voie orale (369,376). Il s'agit d'un inhibiteur de JAK1 et JAK2 qui inhibe l'endocytose du virus SARS-CoV-2 *in vitro* et bloque la

signalisation des cytokines pro-inflammatoires (notamment l'IL-6) par la voie JAK/STAT après fixation à leur récepteur (377). Le ruxolitinib et le tofacitinib, d'autres inhibiteurs de JAK, n'ont pour l'heure pas fait preuve d'un intérêt clinique avec un niveau de preuve suffisant.

3. Traitements antiviraux

D'autres molécules ont été évaluées dans le traitement de la COVID-19 du fait de leur action inhibitrice potentielle sur la réplication virale, avec donc un effet optimal en début d'infection. Les options de traitements antiviraux actuellement recommandés comprennent le remdesivir, le molnupiravir et l'association nirmatrelvir-ritonavir (Paxlovid®).

- Le remdesivir, molécule initialement développée contre le virus de l'hépatite C, est une prodrogue d'analogue nucléosidique de l'adénosine qui conduit à une terminaison retardée de l'élongation de la chaîne d'ARN lors de son incorporation au cours de la réplication virale. Malgré des premiers résultats décevants, une nouvelle évaluation de l'intérêt de cette molécule par l'OMS a très récemment conduit à la considérer comme un traitement possible dans les cas non sévères de COVID-19 associés à un risque très élevé d'hospitalisation (patients âgés, immunodéprimés, ou avec une pathologie chronique à risque, en particulier en l'absence de vaccination) (369). Il présente néanmoins la contrainte d'une administration par voie intraveineuse, préférentiellement au cours des sept premiers jours de symptômes (369). Une extension d'indication pour cette molécule avait déjà été obtenue en France en décembre 2021 pour le traitement précoce des patients non oxygéo-requérants à risque élevé de forme grave (373).
- Le molnupiravir est une autre option thérapeutique figurant dans les recommandations internationales de traitement par l'OMS (369). Ce traitement est aussi réservé aux cas non sévères à haut risque d'hospitalisation, et à administrer par voie orale si possible dans les 5 premiers jours après le début des symptômes (369,378). Il s'agit d'une prodrogue de base nucléosidique de type β -D-N4-hydroxycytidine qui s'incorpore aléatoirement dans les ARN génomiques et sous-génomiques synthétisés au cours de la réplication, aboutissant à une mutagénèse létale. Néanmoins, cette molécule n'est

pas disponible en France suite à un avis défavorable de la HAS délivré en décembre 2021, du fait d'une efficacité jugée insuffisante en comparaison des alternatives thérapeutiques.

- Le traitement par Paxlovid® a très récemment fait l'objet d'une forte recommandation de l'OMS pour les cas non sévères de COVID-19 associés à un risque très élevé d'hospitalisation, après des résultats très encourageants annoncés par son fabricant en cas d'administration précoce (89 % de réduction du risque d'hospitalisation si administré au cours des trois premiers jours) confirmés par plusieurs essais cliniques (369,379). Cette formulation associe le nirmatrelvir, un inhibiteur de la protéase, au ritonavir qui prolonge sa biodisponibilité par voie orale. La HAS a d'ores et déjà autorisé son accès précoce en janvier 2022 pour les adultes ne nécessitant pas d'oxygénothérapie et à risque élevé d'évolution vers une forme grave de la maladie, le traitement étant à débiter au cours des cinq premiers jours après l'apparition des symptômes (380). Néanmoins, l'administration de ce traitement est contrainte par les interactions médicamenteuses associées au ritonavir, puissant inhibiteur du cytochrome P450 3A4, qui restreignent son usage notamment chez les patients immunodéprimés avec un risque de déséquilibre du traitement immunosuppresseur.

L'ivermectine, l'association lopinavir-ritonavir ainsi que la chloroquine et l'hydroxychloroquine ont également fait l'objet d'essais cliniques dans le traitement de la COVID-19, sans bénéfice démontré à ce jour (369).

4. Traitements à base d'anticorps anti-SARS-CoV-2

Enfin, plusieurs stratégies thérapeutiques à base d'anticorps anti-SARS-CoV-2 ont été développées au cours de la pandémie. Le premier traitement testé consistait à l'administration de plasmas de patients convalescents de la COVID-19 qui contiennent des anticorps neutralisants spécifiques du virus. Cependant, ce traitement n'a pas montré de bénéfice clinique suffisant et n'est donc actuellement pas recommandé (369). Plus récemment, plusieurs anticorps monoclonaux ciblant le SARS-CoV-2 ont été développés, utilisés seuls ou

en bithérapies selon les formulations, dans le traitement précoce des formes non sévères chez les patients avec un risque élevé de forme grave. L'efficacité de certains de ces anticorps a été impactée par l'émergence successive de nouveaux variants.

- L'association casirivimab-imdevimab (Ronapreve[®]) est disponible en autorisation temporaire d'utilisation (ATU) en France depuis le mois de mars 2021. Son administration était alors recommandée dans les cas non sévères survenus depuis moins de 5 jours chez les patients présentant un risque élevé d'hospitalisation, ainsi que dans les cas sévères chez les patients séronégatifs pour le SARS-CoV-2. Cette bithérapie reste efficace contre le variant delta, mais présente une perte totale d'activité neutralisante contre le variant omicron, ce qui rend son usage aujourd'hui obsolète (369,373).
- L'association bamlanivimab-etesevimab apparue en même temps sur le marché français était elle aussi indiquée dans le traitement précoce des formes non sévères associées à un risque élevé de forme grave. Toutefois, cette bithérapie avait déjà une activité non optimale sur le variant delta et s'est avéré totalement inactive sur le variant omicron. Son autorisation temporaire d'utilisation a été suspendue le 31 décembre 2021 en France (373).
- L'association tixagevimab-cilgavimab (Evusheld[®]), essentiellement administrée à visée prophylactique, peut exceptionnellement être utilisée en traitement curatif en accès compassionnel chez les patients hospitalisés non-répondeurs ou faiblement répondeurs après un schéma vaccinal complet (IgG anti-S <264 BAU/mL), ou non vaccinés contre la COVID-19. Cette bithérapie reste efficace sur le variant delta mais son activité neutralisante est partiellement réduite contre le variant omicron (373).
- Le sotrovimab (Xevudy[®]) a été autorisé en France via une autorisation d'accès précoce délivrée par la HAS en janvier 2022. Il est indiqué en traitement curatif dans les cas ne nécessitant pas de supplémentation en oxygène et risquant d'évoluer vers une COVID-19 sévère, avec une administration dans les 5 premiers jours suivant le début des

symptômes. Ce traitement conserve une activité neutralisante contre le variant omicron, bien que réduite contre le sous-lignage BA.2 (369,381,382). La liaison à un site hautement conservé du RBD semble conférer cet anticorps monoclonal une barrière génétique de résistance élevée.

- Enfin, l'utilisation du bebtélovimab actif sur omicron (y compris BA.2) a été approuvée en février 2022 par la FDA (Food and Drug Administration) mais ce traitement n'est pas encore disponible en Europe.

Les options thérapeutiques contre la COVID-19 sont donc multiples, mais les recommandations sont en constante évolution avec l'arrivée de nouvelles molécules sur le marché et en parallèle l'émergence de variants avec un potentiel d'échappement à certains traitements.

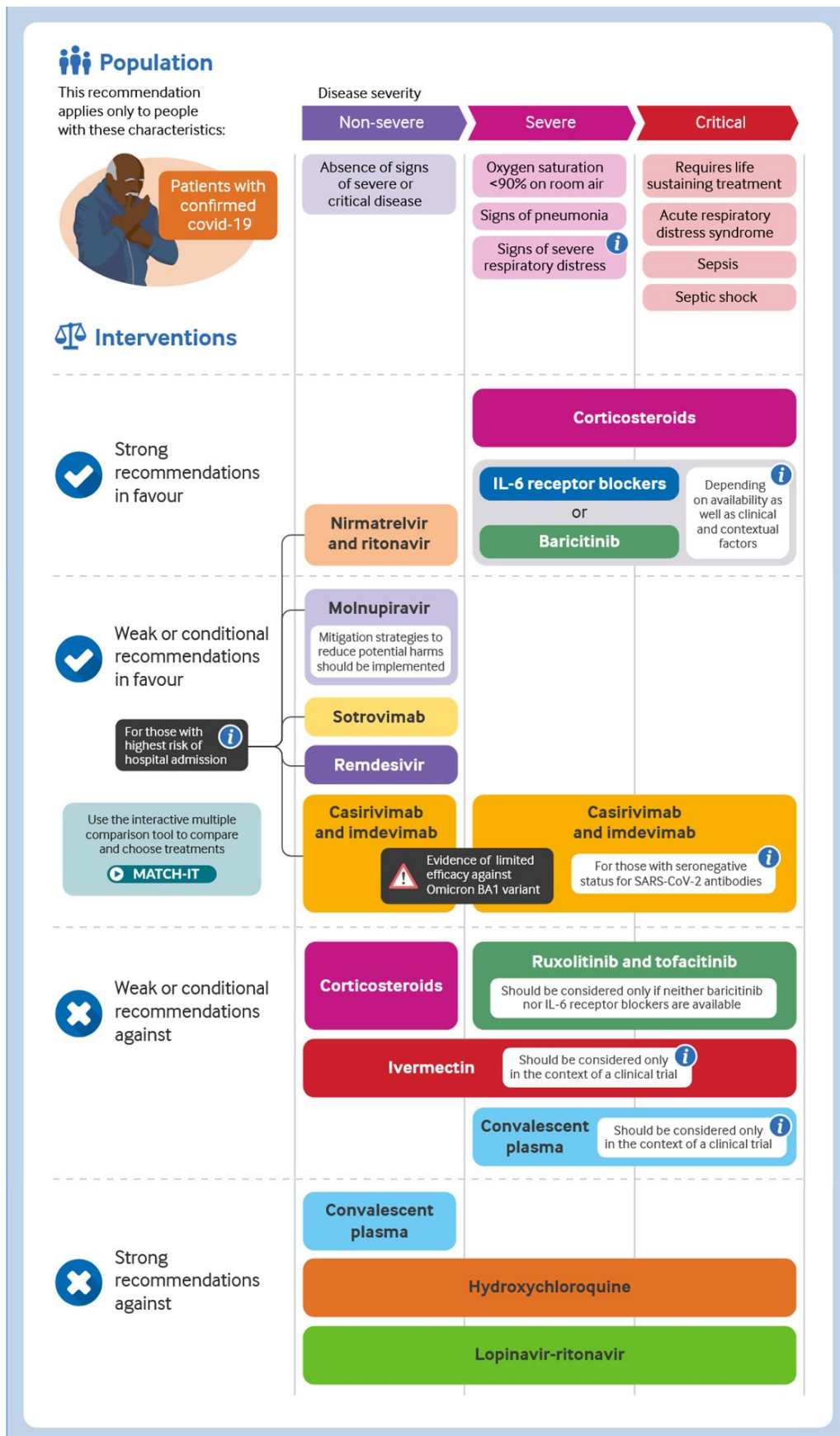


Figure 29 : Recommandations de traitement de la COVID-19 émises par l'OMS le 22 avril 2022 (369).

V. Prophylaxie contre la COVID-19

Les mesures sanitaires telles que le port du masque, l'hygiène des mains, l'aération des espaces fermés ou encore la distanciation physique sont des mesures de prévention primaires dont la mise en place a permis de limiter le nombre des contaminations dès le début la pandémie. Le développement de vaccins contre le SARS-CoV-2 a d'emblée été perçu comme la porte de sortie de cette pandémie, d'où un effort de recherche sans précédent qui a mené à l'arrivée sur le marché de plusieurs vaccins de fabricants différents dès la fin de l'année 2020. Néanmoins, les personnes immunodéprimées qui développent une faible réponse immunitaire après vaccination ne sont pas protégées, alors qu'elles constituent une catégorie de patients à risque de forme sévère de COVID-19. Les traitements prophylactiques à base d'anticorps monoclonaux se sont donc imposés comme une alternative pour la protection de ces patients.

A. Anticorps monoclonaux

La prophylaxie par l'administration d'anticorps monoclonaux est réservée aux patients à très haut risque de forme sévère (déficit immunitaire ou acquis, notamment patients greffés) et faiblement/non répondeurs à la vaccination (IgG anti-S <264 BAU/mL) après un schéma vaccinal complet, ou non éligibles à la vaccination. Elle peut être envisagée dans deux contextes : en pré-exposition, c'est-à-dire en prévention primaire systématique, ou en post-exposition après contact avec un cas confirmé de COVID-19. L'association casirivimab-imdevimab (Ronapreve[®]) ne doit plus être employée en pré-exposition du fait de la circulation largement prédominante du variant omicron. Son usage en prévention post-exposition devient exceptionnel, car il exige la mise en évidence du variant delta chez le cas index. La prophylaxie par anticorps monoclonaux repose donc aujourd'hui uniquement sur la bithérapie tixagévimab/cilgavimab (Evusheld[®]) active sur le variant omicron, utilisable en pré-exposition suite à une autorisation d'accès précoce par la HAS en décembre 2021. Après administration d'une dose unique en intra-musculaire, la durée de la protection conférée est estimée à au

moins 6 mois. Une utilisation de cette combinaison d'anticorps peut aussi être possible en post-exposition après demande d'autorisation d'accès compassionnel.

B. Vaccination

La mise à disposition de vaccins anti-SARS-CoV-2 a été un véritable tournant dans la gestion de la pandémie, permettant d'envisager une stratégie préventive sur le long terme. Le principe de base de la vaccination est d'exposer l'organisme à une partie ou la totalité de l'agent pathogène pour stimuler la réponse immunitaire et générer une réponse effectrice et mémoire.

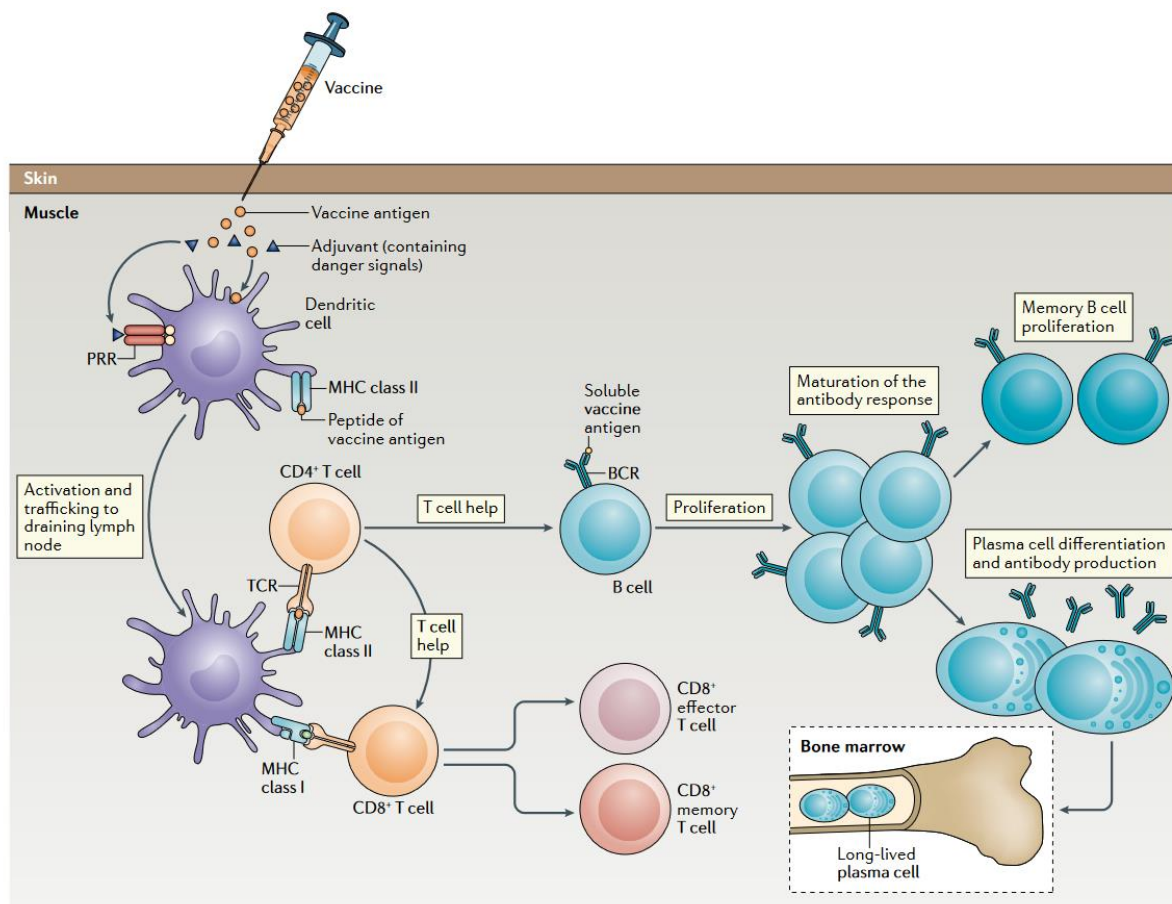


Figure 30 : Principe du développement d'une réponse immunitaire vaccinale.
Pollar et al., 2021 (383).

Plusieurs vaccins ont été développés à travers le monde, basés sur des technologies différentes dont les vaccins recombinants à vecteur viral, les nanoparticules lipidiques

renfermant de l'ARN messager (ARNm), les virus inactivés, les virus vivants atténués ou encore les vaccins protéiques sous-unitaires. L'essentiel de ces vaccins visent à induire une réponse immunitaire contre la protéine S, protéine très immunogène du SARS-CoV-2 et principale cible des anticorps neutralisants.

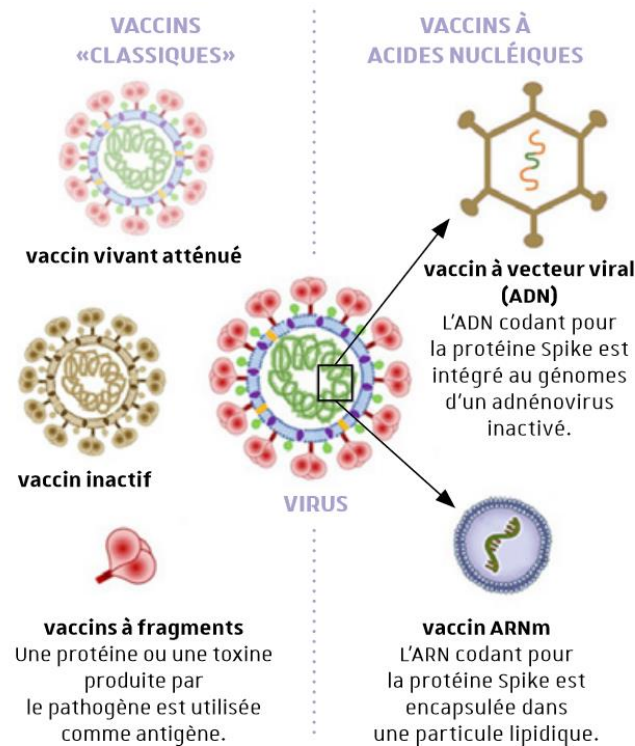


Figure 31 : Principaux types de vaccins développés contre le SARS-CoV-2. Magazine Savoir(s), Université de Strasbourg, n°43 (novembre 2021) (384).

1. Vaccins disponibles contre le SARS-CoV-2

1.1. Vaccins autorisés en France

Cinq vaccins ont été autorisés en France à ce jour, dont les trois premiers sont arrivés sur le marché à seulement un mois d'intervalle entre la fin décembre 2020 et la fin janvier 2021.

Le **vaccin BNT162b2 (Comirnaty®, Pfizer/BioNTech)** a été le premier vaccin commercialisé (autorisation de mise sur le marché (AMM) européenne le 21 décembre 2021) et reste aujourd'hui l'un des vaccins de référence dans le monde. Il s'agit d'un vaccin à base d'ARNm incorporé dans une nanoparticule lipidique. L'ARNm code la protéine S de la souche virale

ancestrale de Wuhan, mais avec quelques modifications qui optimisent l'efficacité de sa traduction par la cellule et la stabilité de la protéine produite, notamment en empêchant le clivage entre S1 et S2 et le changement de conformation de S2 vers une conformation post-fusion (68). Une fois entré dans le cytoplasme cellulaire, l'ARNm est directement traduit en protéines S par la machinerie de la cellule hôte. Certaines protéines produites pourront s'ancrer à la surface de la membrane plasmique cellulaire par la voie d'exocytose et stimuler les lymphocytes B. Une autre partie des protéines produites subit un clivage protéolytique intracellulaire permettant l'association de peptides aux CMH de type I ou II, respectivement nécessaires à la stimulation des LT CD8+ et CD4+ (68). Ainsi, ce vaccin génère en parallèle une réponse humorale et une réponse cellulaire spécifiques de la protéine S du SARS-CoV-2.

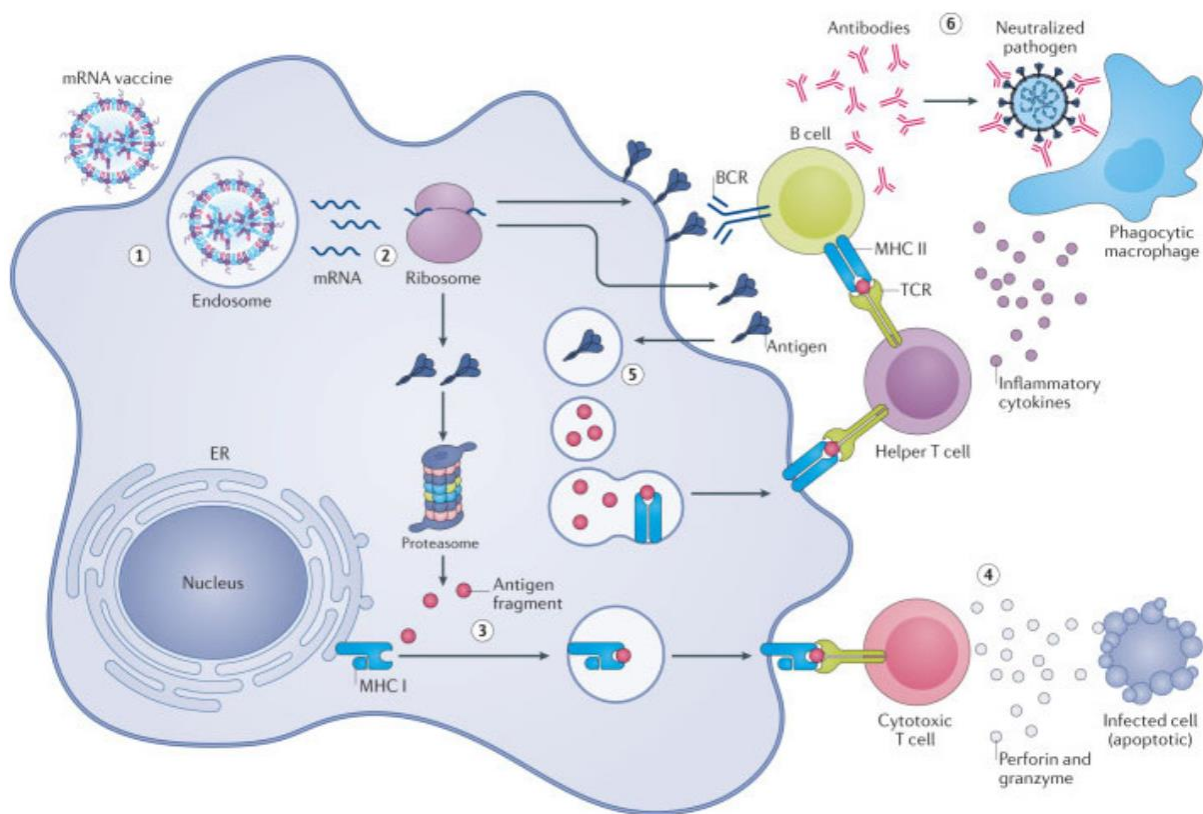


Figure 32 : Mécanisme d'action des vaccins basés sur l'ARN messager.
E Joubert et al., 2021 (385).

La technologie de l'ARNm ne nécessite pas d'adjuvant pour induire cette réaction immunitaire, l'ARN étant reconnu comme signal de danger par la cellule. Chaque dose de vaccin Pfizer destinée aux adultes contient 30 µg d'ARNm. Le schéma de primovaccination comprend l'administration de deux doses espacées d'au moins 21 jours (3 à 7 semaines).

Le vaccin mRNA-1273 (Spikevax[®], Moderna), autorisé par AMM en Europe le 6 janvier 2021, repose sur la même technologie d'ARNm encapsidé en nanoparticule lipidique. Il contient toutefois une quantité plus importante d'ARNm (100 µg pour chaque dose vaccinale complète). Le schéma vaccinal de base est proche de celui du vaccin BNT162b2 (deux doses espacées de 4 à 7 semaines). Ce vaccin présente un avantage logistique car il se conserve à -20°C tandis que le vaccin BNT162b2 de Pfizer/BioNTech se conserve à -80°C, ce qui nécessite de disposer de congélateurs adaptés. Néanmoins, les stocks restreints de vaccin mRNA-1273 ont limité son usage au début de la pandémie. Aujourd'hui, il constitue le second vaccin de référence dans les recommandations françaises (avec le vaccin BNT162b2), mais son usage est réservé aux adultes de 30 ans et plus du fait d'un surrisque de myocardites d'évolution favorable en dessous de cet âge (386).

Le troisième vaccin commercialisé en France est le vaccin ChAdOx1 nCoV-19 aussi appelé AZD1222 (Vaxzevria[®], Oxford/AstraZeneca), autorisé par AMM en Europe le 29 janvier 2021. Il s'agit d'un vaccin à base d'ADN incorporé dans le génome d'un adénovirus de chimpanzé (ChAdOx1) jouant le rôle de vecteur viral. Cet adénovirus est modifié par la délétion des gènes précoces E1 et E3, ce qui le rend non répliquatif, et par l'insertion d'ADN codant la protéine S du SARS-CoV-2 dans la région E1 (68). Après l'entrée de cet adénovirus dans sa cellule cible, l'ADN libéré est transféré dans le noyau, transcrit en ARN messager puis traduit en protéine S par la machinerie cellulaire, suscitant une réponse immunitaire humorale et cellulaire. Là encore, aucun adjuvant n'est nécessaire car l'adénovirus est lui-même perçu comme un danger par la cellule. Le délai à observer entre les deux doses de ce vaccin est de 9 à 12 semaines : ce délai est plus long qu'avec les autres vaccins, mais permet d'optimiser l'efficacité vaccinale (387). En mars 2021, le dispositif de pharmacovigilance a remonté des

cas d'événements thromboemboliques et hémorragiques graves et rares, entraînant la suspension temporaire de l'utilisation de ce vaccin puis le rétablissement de son autorisation mais uniquement chez les personnes de plus de 55 ans (388). Le 8 avril 2021, la HAS a publié un avis dans lequel elle recommande l'administration d'un vaccin à ARN messager (Pfizer-BioNTech ou Moderna) en seconde dose pour les personnes de moins de 55 ans ayant déjà reçu une première dose de vaccin Vaxzevria[®], avec un délai de 12 semaines entre les deux doses (389). Cette stratégie vaccinale est appelée « prime-boost hétérologue », impliquant un changement de type de vaccin entre la première et la seconde injection.

Le quatrième vaccin est le Ad26.COV2.S (Janssen COVID-19[®], Janssen / Johnson & Johnson), autorisé en Europe par AMM le 11 mars 2021 et utilisé en France depuis le 24 avril. Il s'agit également d'un vaccin à ADN vectorisé, mais basé sur un adénovirus humain de type 26 modifié pour coder la protéine S du SARS-CoV-2. Au vu des événements thrombotiques survenus en Amérique du Nord avec le vaccin Janssen et de leurs similitudes cliniques et biologiques avec ceux observés avec le vaccin Vaxzevria[®] (aussi vectorisé par adénovirus), l'indication du vaccin Janssen a été d'emblée restreinte aux personnes de 55 ans et plus en France (390). Contrairement aux autres vaccins disponibles, il se caractérisait lors de sa sortie par un schéma vaccinal en dose unique, ce qui lui donnait une place particulière pour les publics les plus éloignés du système de santé, en situation de précarité ou de handicap (391). Néanmoins, au vu de la protection insuffisante conférée par une seule dose vaccinale, il est demandé depuis août 2021 l'injection d'une dose supplémentaire de vaccin à base d'ARNm dans les 4 semaines à 2 mois après la première injection de vaccin Janssen pour considérer la vaccination initiale complète (392). Les données récentes de pharmacovigilance suggèrent une augmentation du risque d'infarctus du myocarde dans les deux semaines suivant la vaccination avec Janssen, ce qui a finalement conduit la HAS à recommander la suspension de son utilisation en février 2022 par principe de précaution et dans l'attente des conclusions l'Agence Européenne des Médicaments (393,394).

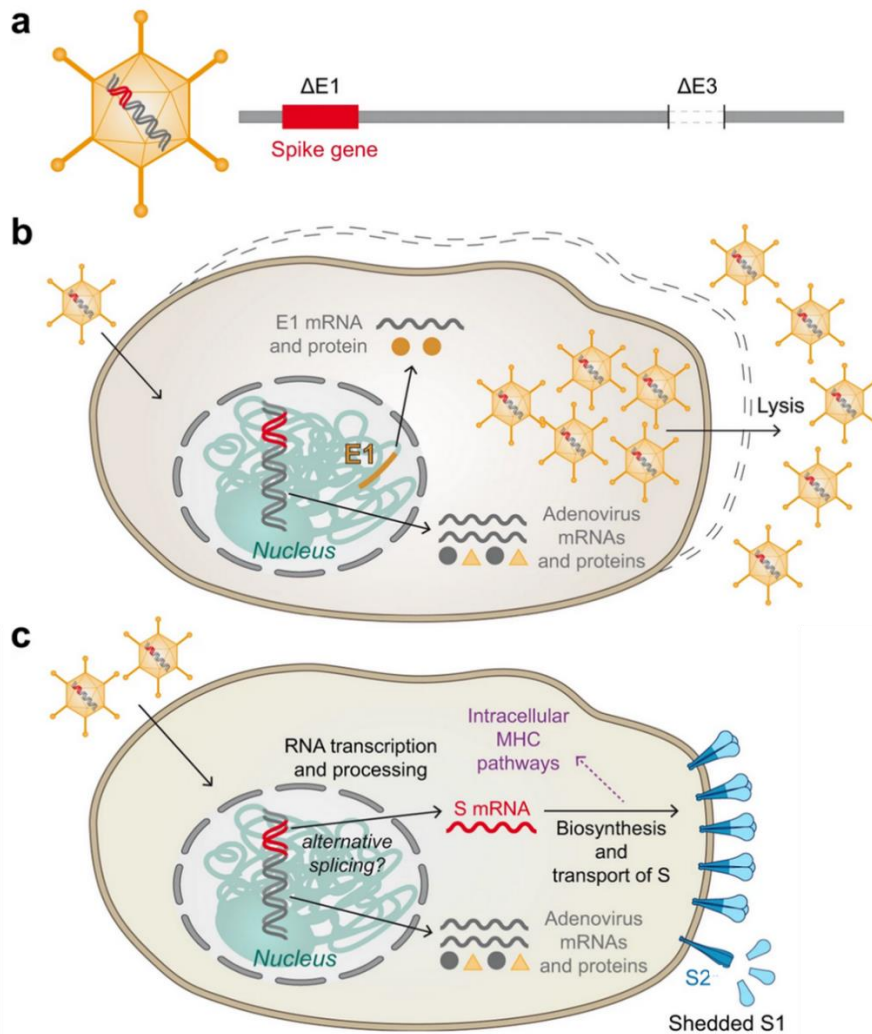


Figure 33 : Principe des vaccins basés sur une vectorisation par adénovirus.

a. Schéma de la particule virale non répliquante d'adénovirus et de son génome à ADN. E1 et E3 : Gènes précoces (*early*) 1 et 3 de l'adénovirus. b. Formation des particules vaccinales par production en lignée cellulaire complétement par l'intégration chromosomique de E1 et libération par lyse cellulaire. c. Expression de la protéine S dans les cellules des individus vaccinés sans répliquant possible de l'adénovirus.

D'après Heinz et Stiasny, *npj Vaccines*, 2021 (68).

Enfin, le vaccin NVX-CoV2373 (Nuvaxovid[®], Novavax) a été autorisé en Europe plus tardivement, le 20 décembre 2021. Il s'agit d'un vaccin qui se compose de protéines S recombinantes du SARS-CoV-2 sauvage (souche Wuhan) encapsidées en nanoparticules lipidiques et associées à un adjuvant à base de saponine Matrix-M, celui-ci permettant d'augmenter l'immunogénicité du vaccin en induisant des réponses cellulaires Th1/Th2 équilibrées et une réponse humorale (395). Le schéma de primovaccination avec ce vaccin repose sur l'administration de 2 doses espacées de 3 semaines (tolérance de 18 à 28 jours)

(396). Son utilisation est réservée aux patients qui présentent une contre-indication aux autres vaccins disponibles ou qui refusent la vaccination par un vaccin à ARN messager (397).

1.2. Autres vaccins commercialisés dans le monde

D'autres vaccins mis sur le marché à travers le monde ont été administrés dans un nombre plus restreint de pays, dont ne fait pas partie la France.

Les vaccins Covishield (Serum Institute of India), R-Covi (R-PHARMA) et Fiocruz COVID-19 (Fiocruz) dont la composition et le procédé de fabrication sont similaires à ceux du vaccin d'Oxford/AstraZeneca sont considérés comme équivalents à ce dernier par l'Agence Européenne du Médicament (398).

D'autres vaccins ont été développés sur la base de technologies différentes, dont voici les principaux :

- Les vaccins CoronaVac (Sinovac) et Covilo (Sinopharm) sont des vaccins entiers inactivés produits par culture sur cellules Vero et adjuvés par de l'hydroxyde d'aluminium. Ils sont tous deux reconnus par l'OMS et autorisés dans de nombreux pays, notamment en Asie et en Amérique du Sud (399). La primo-vaccination avec ces vaccins doit être complétée par l'administration d'une dose de vaccin à ARNm pour être reconnue en France (398).
- Le vaccin Covaxin (Bharat Biotech) est un autre vaccin entier inactivé cultivé sur cellules Vero et recommandé tardivement par l'OMS (novembre 2021) (399). Outre son stockage peu contraignant au réfrigérateur, il se distingue des vaccins inactivés précédents par un nouvel adjuvant. Il s'agit d'une molécule de la classe des imidazoquinoléines agoniste des TLR 7 et 8 adsorbée sur hydroxyde d'aluminium qui favorise une polarisation vers une réponse cellulaire de type Th1 (400).
- Le vaccin Sputnik V (Gamaleya Research Institute) est un vaccin à vecteur viral qui utilise, pour ses deux doses, deux adénovirus humains différents (AdV 26 et 5). Bien qu'autorisé dans au moins 57 pays dans le monde, il n'est reconnu ni par l'Agence

Européenne du Médicament ni par l'OMS (399). Ainsi, les personnes ayant reçu ce vaccin à l'étranger peuvent bénéficier à nouveau d'un schéma complet de primo-vaccination par un autre vaccin en France (398).

- Enfin, le vaccin Covovax est un vaccin sous-unitaire équivalent au Nuvaxovid® mais produit par un fabricant différent en Inde (Serum Institute of India). Il a été autorisé par l'OMS en même temps que ce dernier en décembre 2021 (399).

2. Schémas de vaccination recommandés en France

2.1. Vaccination de la population générale

La primovaccination par vaccin à base d'ARNm est actuellement privilégiée, du fait d'une bonne tolérance et d'une meilleure efficacité contre les formes symptomatiques et les formes sévères de la COVID-19 pour tous les variants du SARS-CoV-2 en comparaison des autres vaccins disponibles. Quel que soit le vaccin considéré, le schéma de primovaccination comprend l'administration de deux doses vaccinales, à l'exception des personnes déjà infectées avant leur première dose ou plus de 15 jours après celle-ci pour lesquelles l'injection d'une seconde dose n'est pas indiquée. En cas d'antécédent d'infection par le SARS-CoV-2, la vaccination est possible à partir de deux mois suivant le diagnostic.

Suite à l'observation d'un déclin de l'immunité vaccinale à partir de 6 mois suivant la primovaccination, une campagne de rappel vaccinal a été lancée dès le mois de septembre 2021 pour les personnes les plus à risque et les soignants (392). Elle a par la suite été élargie le 27 novembre à l'ensemble de la population adulte vaccinée, puis le 24 janvier 2022 aux mineurs de 12 à 17 ans. Ce rappel concerne aussi les personnes avec un antécédent d'infection par le SARS-CoV-2 avant, pendant ou moins de trois mois après la complétion du schéma vaccinal initial. La dose de rappel est administrée entre trois et six mois après la primovaccination ou l'infection post-vaccinale, de préférence avec un vaccin à ARNm indépendamment des types de vaccins reçus lors de la primovaccination. Les vaccins de Pfizer/BioNTech pleine dose (30 µg) et de Moderna demie-dose (50 µg) sont considérés équivalents pour cette dose de rappel, mais seul le vaccin de Pfizer/BioNTech est

recommandé pour les moins de 30 ans. Les personnes âgées de 55 ans et plus qui ne souhaitent pas recevoir de vaccin à ARNm ou qui ont présenté un évènement indésirable grave aux vaccins à ARNm peuvent recevoir une dose de rappel avec le vaccin Janssen à partir de 3 mois après la primo-vaccination (401). À ce stade, le vaccin de Novavax n'est pas autorisé en vaccination de rappel.

Enfin, les personnes immunodéprimées ou âgées de plus de 60 ans font l'objet d'une recommandation d'un second rappel, dès 3 mois suivant le premier rappel. Le reste de la population n'est pour le moment pas concerné par cette dose de rappel.

2.2. Vaccination des patients sévèrement immunodéprimés

Les patients sévèrement immunodéprimés, tels que les patients transplantés d'organes solides, greffés récents de moelle osseuse ou dialysés, répondent mal au vaccin et font à ce titre l'objet de recommandations particulières, qui ont évolué avec le temps et sur la base de l'expérience clinique. Celles-ci visent à indiquer dans quels cas poursuivre la vaccination chez ces patients et dans quels cas privilégier l'utilisation d'anticorps monoclonaux. En effet, l'administration de ces derniers neutralise de façon durable la protéine S synthétisée à partir de l'ARNm vaccinal et empêche ainsi l'immunité vaccinale de se développer, rendant ces deux méthodes de protection incompatibles de manière simultanée.

Le Conseil d'Orientation de la Stratégie Vaccinale a recommandé dès le mois d'avril 2021 l'injection systématique d'une troisième dose pour toutes les personnes sévèrement immunodéprimées, quatre semaines après la deuxième dose (ou dès que possible pour les personnes ayant dépassé ce délai), et avec évaluation de la réponse vaccinale par sérologie un mois après la seconde et la troisième dose (402). La Société Francophone de Transplantation a par ailleurs préconisé de compléter la primovaccination par l'administration d'une quatrième dose chez les sujets avec une réponse vaccinale à la troisième dose positive (IgG anti-S > 0 BAU/mL) mais faible (< 264 BAU/mL), et de privilégier l'administration d'anticorps monoclonaux pour les sujets non répondeurs (403,404).

Pour les personnes qui n'ont pas encore complété le schéma de primo-vaccination, il est actuellement préconisé d'effectuer un schéma vaccinal initial à deux doses avec un vaccin à ARNm, puis d'effectuer une sérologie quantitative anti-S 15 jours plus tard et de compléter la primo-vaccination avec une troisième dose si la réponse obtenue après deux doses est jugée suffisante (> 264 BAU/mL). Dans le cas contraire, les patients sont d'emblée éligibles à la prescription d'anticorps monoclonaux en prophylaxie. Le même schéma peut être suivi pour une éventuelle administration de quatrième dose dans le schéma de primo-vaccination (405).

Quel que soit le nombre de doses administrées au cours de la primo-vaccination, le contrôle sérologique réalisé après la dernière dose conditionne la suite de la stratégie prophylactique : les patients avec une sérologie > 264 BAU/mL sont éligibles à un rappel vaccinal avec vaccin à ARNm (de préférence Moderna en pleine dose), réalisé 3 mois après la dernière injection, tandis que les autres patients sont éligibles à la prescription des anticorps monoclonaux en prophylaxie primaire (405). Le seuil de 264 BAU/mL a été établi sur la base d'une étude menée au Royaume-Uni chez des sujets vaccinés par le vaccin d'Oxford/AstraZeneca dans un contexte de circulation prédominante du variant alpha (406). Dans cette étude, un titre en anticorps supérieur à 264 BAU/mL était associé à 80 % de protection contre une forme symptomatique de COVID-19. Dès lors, cette valeur a été utilisée comme seuil de corrélat de protection clinique, un titre en anticorps inférieur correspondant à une réponse vaccinale défectueuse.

Après un délai de 15 jours suivant ce premier rappel, une nouvelle sérologie est réalisée et conditionne l'éligibilité au 2^e rappel selon les mêmes critères. Ce 2^e rappel est réalisé trois mois après le premier (préférentiellement avec le vaccin de Moderna à dose pleine, soit 100 µg), avec contrôle de la réponse 15 jours plus tard. Si la protection est jugée suffisante (IgG anti-S > 264 BAU/mL), le schéma vaccinal est complet et un suivi sérologique peut être effectué tous les trois mois afin de s'assurer que la protection se maintient. Si la réponse humorale devient inférieure à ce seuil, une protection par anticorps monoclonaux (Evusheld®) doit être envisagée (405,407).

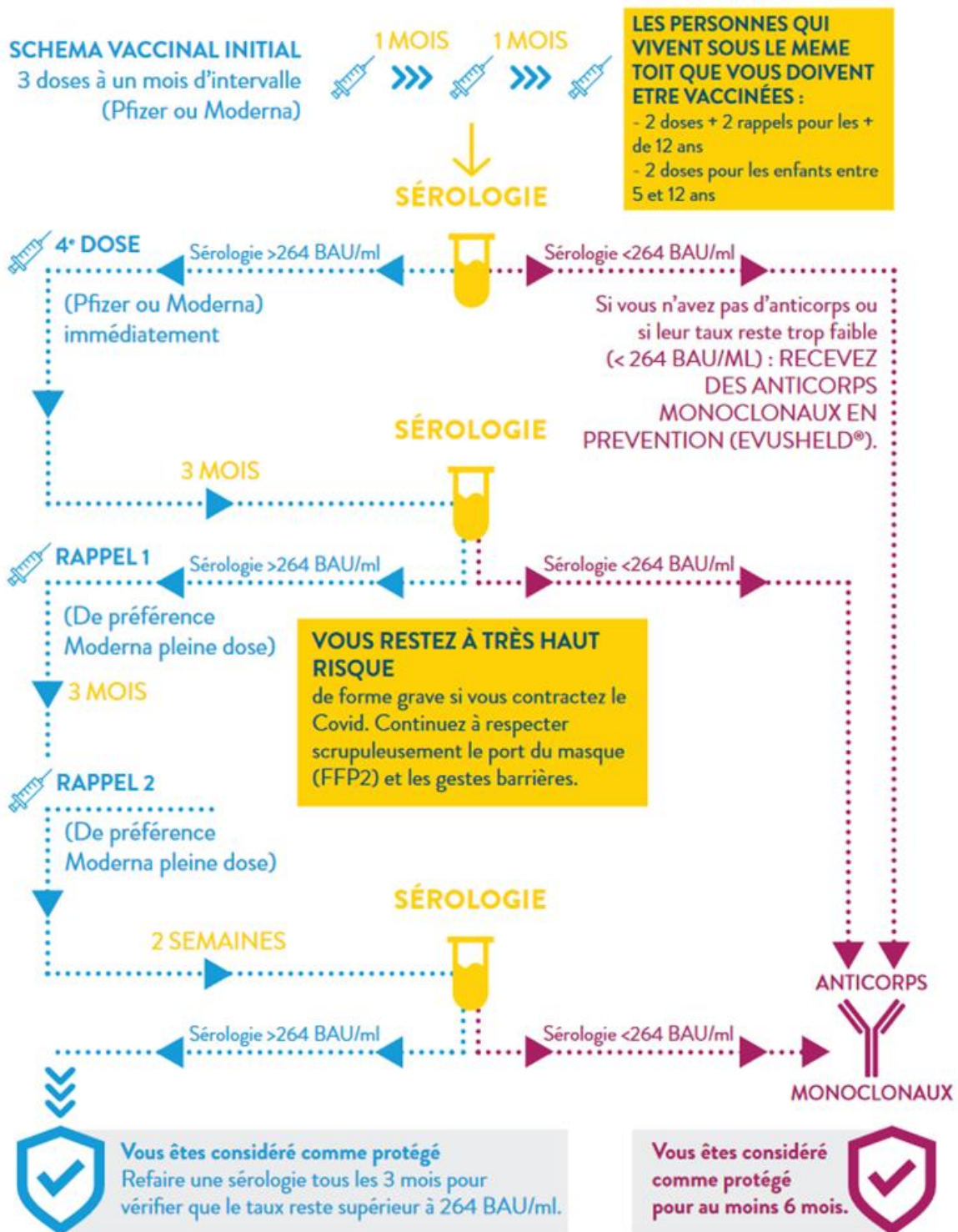


Figure 34 : Stratégie de prévention de la COVID-19 chez les patients sévèrement immunodéprimés.

Algorithme décisionnel basé sur les recommandations nationales : Avis du conseil d'orientation de la stratégie vaccinale du 6 janvier 2022 ; DGS-URGENT N°2022_16 du 28 janvier 2022 (405). *D'après l'infographie réalisée par l'association de patients Renaloo, avec le soutien de la société Abbott (référence ADD-137963-FRA-FR).*

3. Couverture vaccinale

Débutée en France dès la fin décembre 2020, la vaccination contre la COVID-19 était tout d'abord réservée aux personnels de santé et aux populations les plus à risque du fait de stocks limités, en particulier les personnes âgées, immunodéprimées ou présentant des comorbidités. La vaccination a par la suite progressivement été étendue jusqu'à se généraliser à l'ensemble de la population adulte à partir du 31 mai 2021, aux enfants de 12 à 17 ans deux semaines plus tard et aux enfants de 5 à 11 ans le 22 décembre 2021. Seuls les personnels de santé, du secteur médico-social et en contact avec des personnes vulnérables ont fait l'objet d'une obligation vaccinale pour l'exercice professionnel, à compter du 15 septembre 2021. Cependant, de fortes contraintes sanitaires ont été instaurées pour les personnes non vaccinées avec la mise en place successive du pass sanitaire puis du pass vaccinal, restreignant notamment l'accès aux restaurants, lieux de loisirs et de culture et aux transports. Ces mesures ont été levées le 14 mars 2022 (sauf dans les établissements de soins et les transports de longue distance), dans un contexte de prédominance du variant omicron moins pathogène que les variants précédents. A cette date, la couverture vaccinale en France était relativement élevée (79,1 % de la population totale avec un schéma de primo-vaccination complet et 58,3 % avec une dose de rappel) et se stabilisait. La vaccination de la population française a majoritairement été réalisée avec le vaccin de Pfizer/BioNTech, correspondant à plus de 79 % des doses injectées au cours de la primo-vaccination (408).

Si la couverture vaccinale est importante en France, de fortes disparités de couverture vaccinale existent encore à l'échelle mondiale, malgré les programmes solidaires de dons de vaccins à l'instar du programme Covax. En effet, à la date du 14 mars 2022, si 63,8 % de la population mondiale avait reçu au moins une dose de vaccin, seule 19,7 % de la population africaine en avait bénéficié (409). Cette sous-vaccination dans les pays à faible revenu pourrait favoriser l'émergence de nouveaux variants d'échappement et ainsi freiner la sortie de la pandémie. Il est donc crucial d'y accentuer l'effort de vaccination comme l'a rappelé l'OMS, et l'accélération du rythme des vaccinations observé en 2022 est encourageant (410).

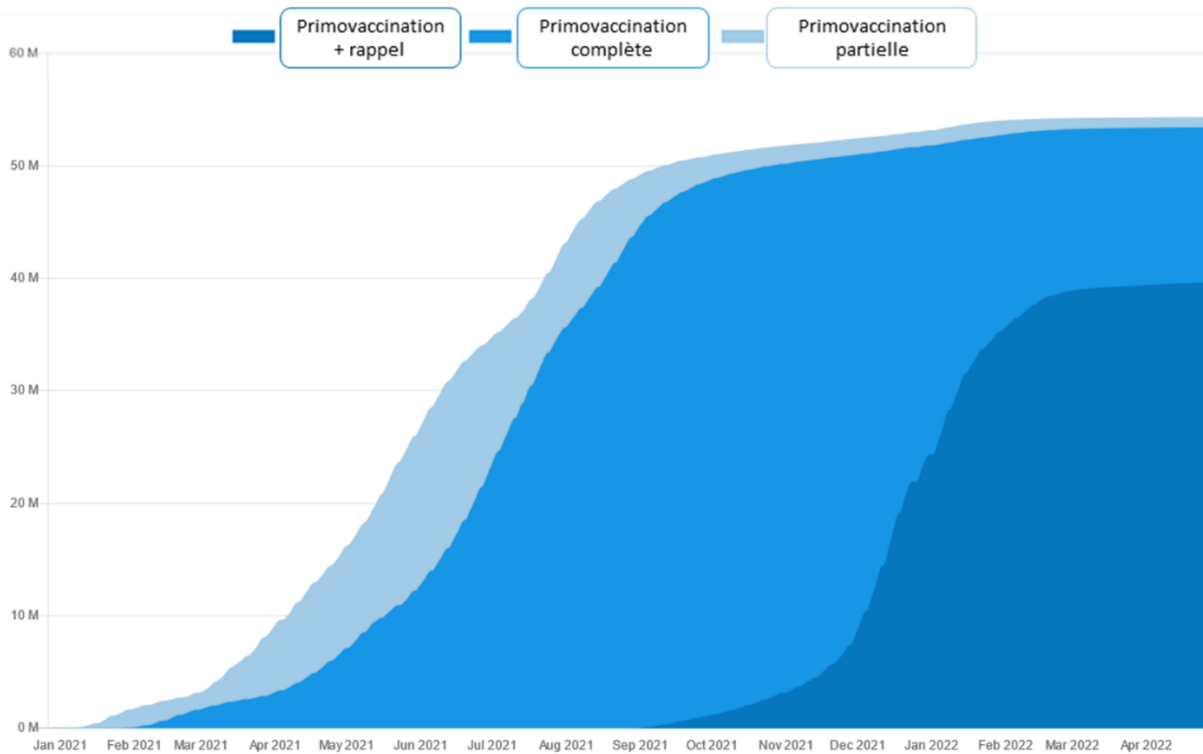


Figure 35 : Nombre cumulé de personnes vaccinées en France au cours du temps.
 Graphique réalisé par CovidTracker.fr - Données : Ministère de la Santé (408).

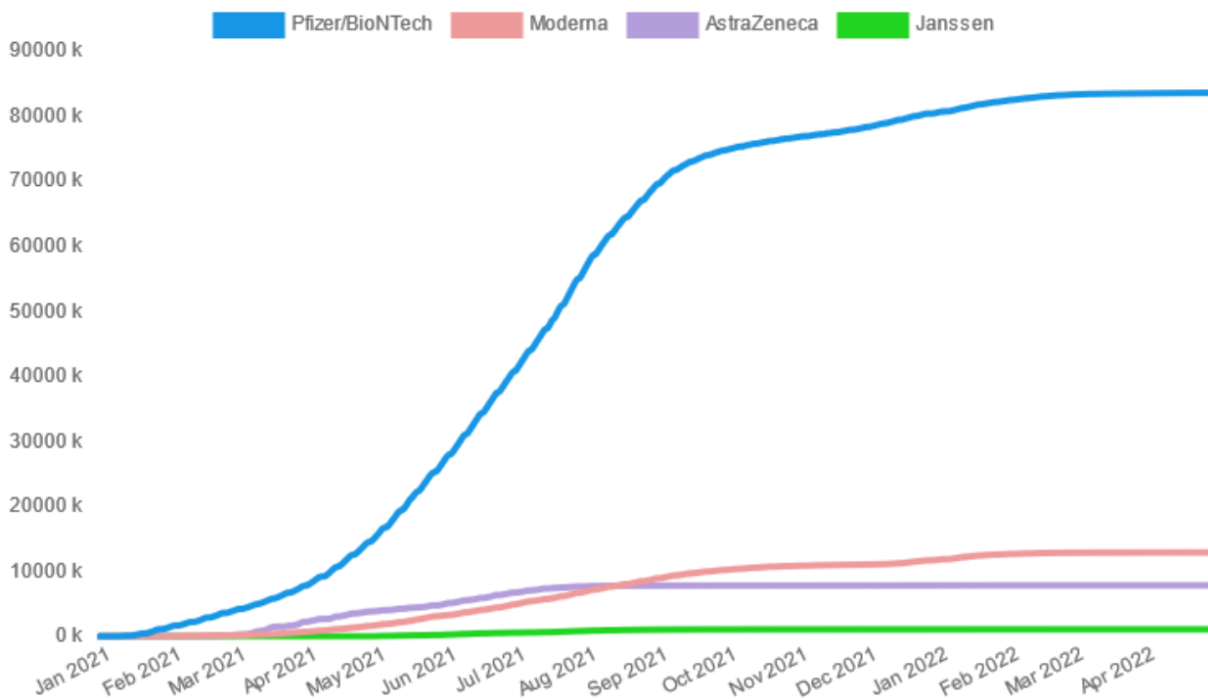


Figure 36 : Cumul des premières et secondes injections vaccinales en France.
 Graphique réalisé par CovidTracker.fr - Données : Ministère de la Santé (408).

4. Immunité vaccinale anti-SARS-CoV-2

4.1. Immunité cellulaire développée après vaccination

Les vaccins contre le SARS-CoV-2 induisent une réponse cellulaire importante dès la première dose (411). Les vaccins à ARNm et vectorisés par adénovirus favorisent une orientation de la réponse cellulaire CD4 vers une polarisation Th1, et une réponse CD8 de plus faible amplitude (412). Les lymphocytes T développés en réponse à un vaccin basé sur la protéine S reconnaissent en moyenne 11 épitopes pour les LT CD4+ et 10 épitopes pour les LT CD8+ (413). Cette immunité est très conservée entre les variants, y compris au sein des sous-populations de lymphocytes T centraux et effecteurs : la réponse vaccinale développée contre la souche vaccinale de Wuhan croise avec le variant omicron à 82-100 % pour les LT CD4+ à 82-84 % pour les LT CD8+ (413,414). Cette réponse T de large spectre persiste dans le temps, avec le maintien de plus de 80 % des lymphocytes T mémoires reconnaissant le variant omicron six mois après la primo-vaccination avec vaccin à ARNm ou vectorisé (413).

4.2. Immunité humorale développée après vaccination

La réponse humorale à la vaccination a été davantage étudiée, en particulier du fait de sa forte corrélation avec l'efficacité vaccinale. En dehors du cas particulier de la vaccination par vaccin entier inactivé, la vaccination anti-SARS-CoV-2 induit une immunité dirigée uniquement contre la protéine S, et notamment la production d'anticorps neutralisants qui empêchent l'entrée du virus dans ses cellules cibles. Tout comme après une infection, l'immunité humorale vaccinale repose sur les plasmocytes à longue durée de vie qui produisent les anticorps, majoritairement d'isotype IgG à distance de la vaccination, et sur les lymphocytes B mémoires (415).

Le pouvoir neutralisant anti-SARS-CoV-2 induit par une seule dose vaccinale est faible chez les sujets naïfs d'infection, mais la complétion de la primo-vaccination permet d'atteindre des niveaux d'IgG anti-S et de titres neutralisants équivalents voire supérieurs à ceux observés chez les patients convalescents de COVID-19 non vaccinés. Durant les essais cliniques de phase I et II, tous les sujets vaccinés par ARNm ont développé des anticorps anti-S détectables et un pouvoir de neutralisation du SARS-CoV-2 contre la souche sauvage

(416,417). Cette réponse humorale est plus forte avec les vaccins à ARNm en comparaison des vaccins vectorisés par adénovirus (418). Néanmoins, un schéma de vaccination hétérologue associant un vaccin vectorisé pour la première dose puis un vaccin à ARNm est plus immunogène et génère des anticorps à une concentration au moins équivalente à un schéma homologue à ARNm (419).

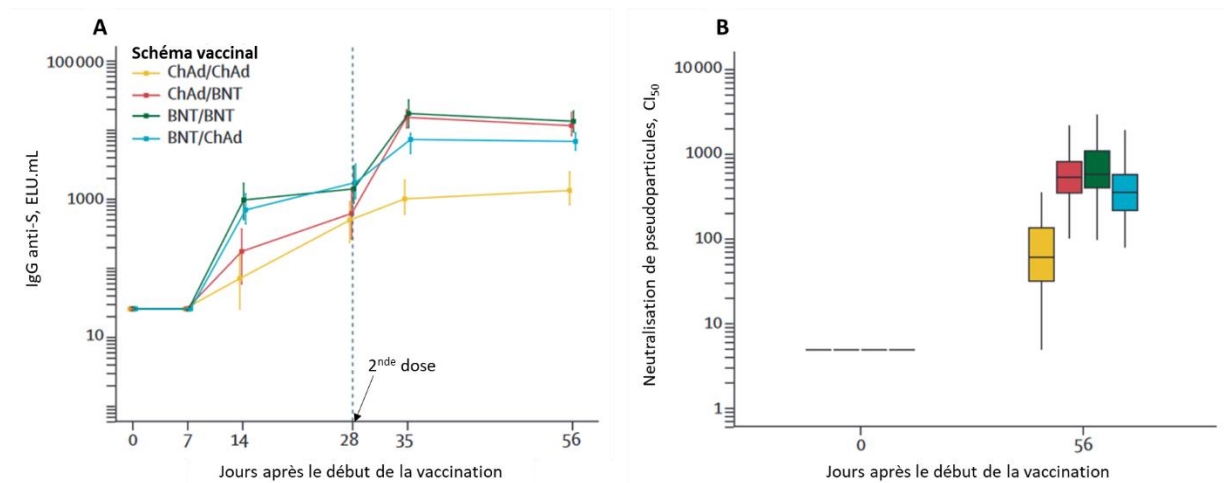


Figure 37 : Cinétique de la réponse humorale contre le SARS-CoV-2 après primo-vaccination homologue ou hétérologue.

A. Concentration en IgG anti-S ; B. Titres en anticorps neutralisants. La seconde dose a été administrée à 28 jours de la première pour l'ensemble des participants. BNT = vaccin BNT162b2 (Pfizer-BioNTech). ChAd=vaccin ChAdOx1 nCoV-19 (Oxford/AstraZeneca). ELU=ELISA laboratory units. IC₅₀ = Concentration neutralisant 50 % des pseudoparticules virales (souche sauvage).

D'après Liu et al., *Lancet*, 2021 (419).

Certains sujets peuvent cependant présenter une réponse vaccinale plus faible. Les personnes âgées de plus de 65 ans ont en effet un pic d'anticorps et de neutralisation plus bas que la population plus jeune (418,420–422). Un défaut de réponse plus marqué est observé chez les personnes immunodéprimées, telles que les patients traités par immunosuppresseurs, les transplantés d'organe solide et les patients atteints d'hémopathies malignes (423,424).

La vaccination par vaccin à ARNm induit la génération d'une réponse centro-germinale persistante dans les organes lymphoïdes secondaires, avec des cellules B centro-germinales et des plasmablastes reconnaissant la protéine S détectées pendant au moins 12 semaines

après la seconde dose (425). Malgré cette stimulation prolongée du système immunitaire et la persistance des lymphocytes B mémoires, les concentrations circulantes en anticorps produits par les plasmocytes de longue durée de vie et leur pouvoir neutralisant diminuent au cours du temps et en particulier à partir de 6 mois suivant la primo-vaccination, justifiant la recommandation d'une dose de rappel (418,421).

Contrairement à la réponse cellulaire, l'efficacité de la réponse humorale post-vaccinale est fortement impactée par les variants. Ainsi, les titres en anticorps neutralisants sont réduits de deux à quatre fois contre le variant delta et de plus de 6 fois contre le variant beta en comparaison de la souche originale de SARS-CoV-2, mais avec seulement une perte minimale contre le variant alpha (110,124,426,427). Seule une très faible neutralisation du variant omicron est observée après une primo-vaccination par vaccin à ARNm, avec des titres neutralisants de 35 à plus de 120 fois inférieurs à ceux développés contre la souche ancestrale (sans différence notable entre les sous-lignages du variant omicron), et une perte totale de neutralisation observée chez plus de la moitié des individus après 6 mois (427–430). L'administration du rappel induit un net gain de pouvoir neutralisant du variant omicron, devenant inférieur de seulement trois à six fois à celui de la souche sauvage (427–429). Ce pouvoir neutralisant persiste mieux dans le temps qu'après la primo-vaccination, mais décroît plus rapidement que vis-à-vis des autres variants (429).

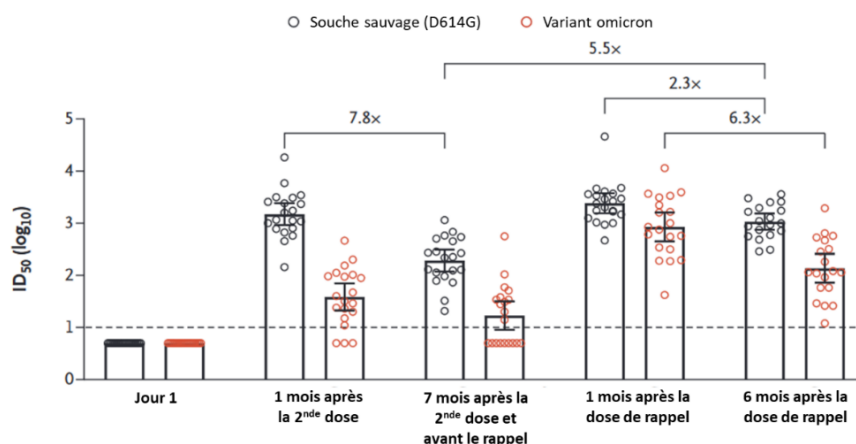


Figure 38 : Neutralisation de pseudo-particules du SARS-CoV-2 de la souche avec mutation D614G et du variant omicron après vaccination par le vaccin mRNA-1273. D'après Pajon et al., NEJM, 2022 (429).

Dès l'arrivée des vaccins, plusieurs équipes ont tenté de définir un seuil d'anticorps protégeant contre la COVID-19, révélant une corrélation de la protection effective avec la concentration en IgG anti-S, en IgG anti-RBD et avec le titre en anticorps neutralisants. Ce dernier paramètre est étroitement corrélé à la protection contre l'infection symptomatique à SARS-CoV-2, via une relation non linéaire (431). Ainsi, des titres en anticorps neutralisants élevés sont obtenus avec les vaccins à ARNm et correspondent à une efficacité vaccinale élevée, tandis que les vaccins inactivés ou vectorisés par adénovirus sont associés à des titres neutralisants et une protection plus faibles. Une méta-analyse menée par Khoury et al. en 2021 a révélé qu'un titre en anticorps neutralisants correspondant à 20 % du titre moyen mesuré chez les sujets convalescents protège à 50 % contre l'infection à SARS-CoV-2. Cependant, les titres neutralisants nécessaires pour protéger contre les formes sévères de COVID-19 sont six fois inférieurs à ceux requis pour protéger contre les infections symptomatiques (431).

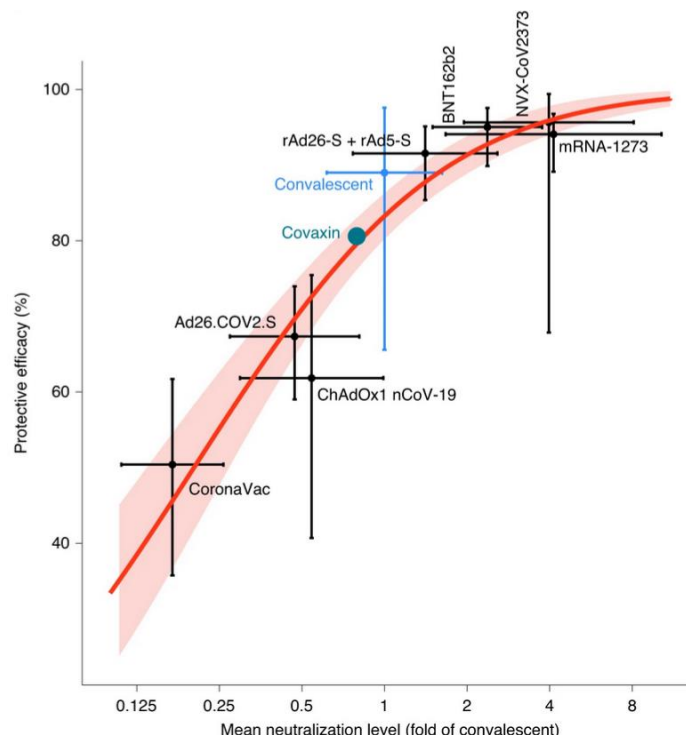


Figure 39 : Relation entre les titres en anticorps neutralisants et la protection vaccinale. Les données d'efficacité vaccinale de la phase III des essais cliniques de sept vaccins sont représentées en fonction des moyennes de titres neutralisants observées en phase I et II rapportées au pouvoir neutralisant observé chez des sujets convalescents (avec intervalles de confiance à 95 %).

D'après Khoury et al., Nat Med, 2021 (431).

5. Efficacité vaccinale en vie réelle contre la COVID-19

L'efficacité vaccinale observée en vie réelle est un enjeu crucial dans la gestion de la pandémie et a fait l'objet de très nombreuses études à travers le monde, en particulier dans le contexte d'émergence de nouveaux variants du SARS-CoV-2. Il en ressort que la première dose vaccinale ne permet pas d'atteindre une protection suffisante, mais que la seconde dose protège efficacement contre les formes graves de la maladie, et réduit donc fortement le risque d'hospitalisation et de décès. Une méta-analyse menée sur 58 études parues jusqu'en juillet 2021 a conclu à une efficacité observée en vie réelle d'une dose unique chez les sujets naïfs de 52 % (intervalle de confiance à 95 % : 31-73 %) contre une forme symptomatique de COVID-19 et de 66 % (50-81 %) contre une infection nécessitant une hospitalisation. Cette protection était nettement accrue avec un schéma vaccinal complet à deux doses : l'efficacité était de 85 % (81-89 %) contre les infections, 97 % (97-98 %) contre une forme symptomatique, 93 % (89-96 %) contre une hospitalisation, et 96 % (93-98 %) contre une admission en réanimation (432). Une seconde méta-analyse considérant les publications parues jusqu'en octobre 2021 rapporte des chiffres proches, avec une protection de 89,1 % (85,6-92,6 %) contre l'infection, 97,2 % (96,1-98,3 %) contre l'hospitalisation, 97,4 % (96,0-98,8 %) contre une admission en réanimation et 99,0 % (98,5-99,6 %) contre le décès lié à la COVID-19 (433).

Ces chiffres sont cependant associés à une variabilité de la protection conférée en fonction de plusieurs paramètres :

- Les vaccins utilisés n'ont pas tous la même efficacité protectrice. Les vaccins à ARNm confèrent une protection proche entre eux (supérieure à 90 %) et supérieure aux vaccins vectorisés par adénovirus, ce qui justifie leur place actuelle de vaccins de référence (434,435).
- L'efficacité vaccinale peut aussi dépendre du temps écoulé entre l'administration des doses vaccinales, avec une meilleure réponse dans le cas d'injections plus espacées (436,437).

- Les facteurs de l'hôte tels que l'âge ou l'immunodépression influent sur la force de la réponse vaccinale, avec notamment une réponse plus faible observée chez les sujets âgés (420,433,438).
- L'efficacité vaccinale à un temps donné dépend également de facteurs épidémiologiques, dont le niveau d'immunité dans la population et l'intensité de la circulation virale (439).
- Enfin, le niveau de protection varie en fonction des variants de SARS-CoV-2 considérés, du fait de mutations d'échappement à la réponse immunitaire au sein de leurs génomes et de différences de transmissibilité. Ainsi l'efficacité globale d'une primovaccination complète a été estimée à 85 % (80-91 %) contre l'infection par le variant alpha, 75 % (71-79 %) contre le variant beta, 54 % (35-74 %) contre le variant gamma et 74 % (62-85 %) contre le variant delta (432). De même, une étude menée dans plusieurs pays européens par l'ECDC (*European Centre for Disease Prevention and Control*) rapporte une efficacité de 94 % du vaccin de Pfizer/BioNTech contre les infections respiratoires sévères avant l'émergence du variant delta (du 3 janvier au 31 mai 2021), et de 82 % en période de circulation prédominante du variant delta (du 1^{er} juillet au 15 décembre 2021) (440).

Une baisse de l'efficacité vaccinale est observée au cours du temps, avec une perte globale estimée de 25 points contre les formes symptomatiques et de 10 points contre les formes sévères entre 1 et 6 mois après primovaccination (441). De plus, l'efficacité vaccinale a été fortement impactée par l'émergence du variant omicron : après deux doses de vaccin de Pfizer/BioNTech, elle était initialement de 65-70 % contre les formes symptomatiques pour chuter à environ 15 % après 6 mois (442). Avec le vaccin d'Oxford/AstraZeneca, l'efficacité initiale n'était que de 45-50 % et devenait négligeable après 6 mois (442). C'est cette perte d'efficacité et le contexte d'émergence du variant delta puis du variant omicron qui ont conduit à recommander l'administration de doses de rappel vaccinal.

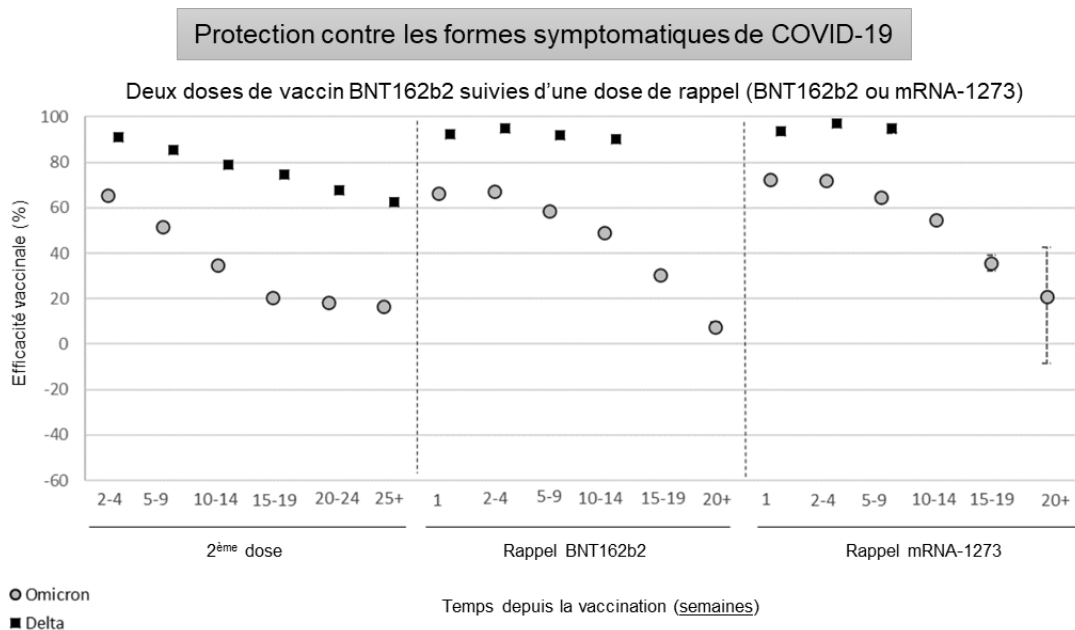


Figure 40 : Efficacité vaccinale après une primo-vaccination par deux doses de vaccin BNT162b2 (Pfizer/BioNTech) suivie d'un rappel avec vaccin à ARNm.

Les carrés noirs et les points gris représentent respectivement la protection contre les variants delta et omicron.

D'après le rapport de surveillance hebdomadaire de la semaine n°17 de la UK Health National Agency (Royaume-Uni) (442).

L'administration d'une dose de rappel permet de rétablir une efficacité vaccinale importante contre les formes symptomatiques dues au variant omicron (60 à 75%), qui chute cependant rapidement jusqu'à devenir très faible après 5 mois (442). Cependant, l'efficacité contre les formes sévères est conservée dans la durée, avec environ 85 % de protection contre l'hospitalisation entre 4 et 6 mois après cette dose de rappel (442). Le suivi de l'incidence des infections et de leur sévérité permettra de déterminer dans quelle mesure la protection conférée par la vaccination est durable à plus long terme.

Objectifs de la Thèse

Dès le début de la pandémie, l'étude de la réponse immunitaire adaptative développée contre le SARS-CoV-2 représentait un enjeu majeur. En effet, outre son intérêt pour le diagnostic rétrospectif d'une l'infection, la caractérisation de ses déterminants, de sa persistance dans le temps et de la protection conférée contre une nouvelle infection étaient autant de paramètres nécessaires à une meilleure compréhension de la physiopathologie de l'infection, à la gestion de la pandémie et à notre projection dans l'avenir. Un an plus tard, la mise sur le marché de plusieurs vaccins a rebattu les cartes et fait naître l'espoir d'une rapide sortie de crise. Cependant, l'émergence concomitante de variants plus transmissibles ou avec un potentiel d'échappement à la réponse immunitaire ont bouleversé les projections initiales. Dès lors, l'étude de la réponse vaccinale devenait cruciale pour optimiser les schémas vaccinaux et entrevoir la sortie de crise.

Au cours de ce travail de thèse, nous avons entrepris d'étudier la réponse immunitaire adaptative développée après infection par le SARS-CoV-2 et après vaccination, et ce dans différents contextes cliniques. Les questions auxquelles visaient à répondre ces travaux de recherche reflètent en partie l'évolution des problématiques survenues successivement au cours de la pandémie. Les résultats présentés se découpent en trois axes centraux :

- L'étude de la réponse adaptative post-infectieuse, de ses déterminants et de sa persistance dans le temps
- L'analyse de la réponse vaccinale sous traitements immunosuppresseurs
- La caractérisation de l'immunité anamnétique au cours d'infections post-vaccinales

L'ensemble de ces travaux a donné lieu à plusieurs publications et contribué à l'effort mondial de recherche sur cette thématique au cœur de l'actualité.

Partie I : Immunité adaptative développée après infection par le SARS-CoV-2

I. Recherche d'une immunité cellulaire chez des sujets exposés séronégatifs

A. Contexte et objectifs de l'étude

La détermination rétrospective de la proportion de personnes précédemment infectées par le SARS-CoV-2 repose généralement sur les tests sérologiques. Cette stratégie permet notamment de mettre en évidence un antécédent d'infection restée asymptomatique, ou de confirmer une suspicion passée qui n'a pas été confirmée par PCR. Cependant, plusieurs personnes ont été diagnostiquées séronégatives à l'issue de la première vague alors qu'elles rapportaient des symptômes compatibles avec une COVID-19 au moment du pic de contaminations. De plus, certaines d'entre elles vivaient à leur domicile avec d'autres membres du foyer diagnostiqués positifs à la COVID-19 peu de temps auparavant l'apparition de leurs propres symptômes. La description de ces cas nous a alors fait poser l'hypothèse d'éventuelles transmissions du virus sans séroconversion. Afin d'explorer cette possibilité, nous avons étudié les cas de onze couples dont l'un des partenaires avait développé une COVID-19 confirmée par RT-PCR ou sérologie (cas index) lors de la première vague, et dont l'autre membre est resté séronégatif (cas contact). Après confirmation de leur statut sérologique, la réponse adaptative cellulaire dirigée contre les protéines structurales et certaines protéines accessoires du SARS-CoV-2 (souche sauvage) a été évaluée par ELISPOT IFN- γ chez l'ensemble de ces participants et chez 10 personnes sans exposition connue correspondant au groupe contrôle. La réactivité contre la protéine S des HCoV-229E et OC43 a également été évaluée dans l'hypothèse d'une réactivité croisée.

B. Principaux résultats

Six des cas contacts inclus ont développé des symptômes évocateurs de COVID-19 de 1 à 10 jours après leur partenaire contaminé, tandis que les cinq autres sont restés asymptomatiques. Le statut séronégatif des cas contacts a été confirmé avec trois kits commerciaux distincts, à une médiane 59 jours (intervalle : 44 - 93) après le début des symptômes pour les cas symptomatiques. Une réactivité cellulaire a été mise en évidence pour au moins trois antigènes du SARS-CoV-2 testés chez quatre des six cas contact symptomatiques, notamment contre les protéines structurales S et N pour trois et deux d'entre eux, respectivement, avec une intensité relativement faible en comparaison des cas index. Un cinquième cas contact symptomatique avait une réactivité cellulaire uniquement contre la fraction N-terminale de la protéine S, mais avec une fréquence élevée de cellules productrices d'IFN- γ supérieure à celle du cas index correspondant. En revanche, seule une faible réactivité contre un unique antigène viral a été trouvée chez le dernier cas contact symptomatique et chez trois des cinq cas contacts restés asymptomatiques, considérée comme une réaction non spécifique dans cette étude. De même, cinq des dix participants non exposés correspondant au groupe contrôle avaient une faible réactivité contre un ou deux antigènes viraux, majoritairement contre la fraction C-terminale de la protéine S (4/5). Enfin, tous les participants sauf un du groupe contrôle avaient une réponse cellulaire détectable contre la protéine S des coronavirus endémiques saisonniers, avec la majorité (69 %) immunisés contre les deux coronavirus étudiés et neuf participants (28 %) positifs uniquement pour le HCoV 229E. Aucune corrélation n'a été observée entre ces réponses cellulaires et celles dirigées contre la protéine S du SARS-CoV-2.

C. Article n°1

Intrafamilial Exposure to SARS-CoV-2 Associated with Cellular Immune Response without Seroconversion, France.

Floriane Gallais, Aurélie Velay, Charlotte Nazon, Marie-Josée Wendling, Marialuisa Partisani, Jean Sibilia, Sophie Candon, Samira Fafi-Kremer.

Emerging Infectious Diseases, 2021 Jan; 27(1): 113–121.

Intrafamilial Exposure to SARS-CoV-2 Associated with Cellular Immune Response without Seroconversion, France

Floriane Gallais, Aurélie Velay, Charlotte Nazon, Marie-Josée Wendling, Marialuisa Partisani, Jean Sibilia, Sophie Candon, Samira Fafi-Kremer

We investigated severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)-specific antibodies and T-cell responses against SARS-CoV-2 and human coronavirus (HCoV) 229E and OC43 in 11 SARS-CoV-2 serodiscordant couples in Strasbourg, France, in which 1 partner had evidence of mild coronavirus disease (COVID-19) and in 10 unexposed healthy controls. Patients with confirmed COVID-19 were considered index patients and their partners close contacts. All index patients displayed positive SARS-CoV-2-specific antibody and T-cell responses that lasted up to 102 days after symptom onset. All contacts remained seronegative for SARS-CoV-2; however, 6 reported COVID-19 symptoms within a median of 7 days after their partners, and 4 of those showed a positive SARS-CoV-2-specific T-cell response against 3 or 4 SARS-CoV-2 antigens that lasted up to 93 days after symptom onset. The 11 couples and controls displayed positive T-cell responses against HCoV-229E or HCoV-OC43. These data suggest that exposure to SARS-CoV-2 can induce virus-specific T-cell responses without seroconversion.

Coronavirus disease (COVID-19), caused by infection with severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), is a pandemic that raises a major concern all around the world (1). To contain the spread of the virus, several countries have imposed population lockdowns (2). In France, the first cases of COVID-19 were recorded at the end of January 2020 (3). Due to the rapid increase of new cases and death, a lockdown was imposed during March 17–May 11,

Author affiliations: Strasbourg University Hospital, Strasbourg, France (F. Gallais, A. Velay, C. Nazon, M.-J. Wendling, M. Partisani, J. Sibilia, S. Fafi-Kremer); Strasbourg University, Strasbourg (F. Gallais, A. Velay, C. Nazon, M.-J. Wendling, J. Sibilia, S. Fafi-Kremer); Rouen University Hospital, Rouen, France (S. Candon)

DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2701.203611>

2020. After the lifting of the lockdown, the number of new cases of SARS-CoV-2 decreased substantially. However, we cannot exclude the possibility that a second pandemic wave could occur; an increase in new cases had already been observed in the first week of August 2020 in several regions (4).

Estimating infections with immunizing effects is crucial in helping to predict the postpandemic dynamics of the virus (4). Serologic tests for SARS-CoV-2 have been developed to determine the extent of immunity to the virus (4), and immunity certifications based on the results of these tests have been considered by some countries in Europe and by the US government. Several persons belonging to households with an index COVID-19 patient reported symptoms of COVID-19 but remained seronegative even though the index patient practiced no quarantine measures. The absence of antiviral antibodies after exposure has been previously reported for other viral infections. In these cases, the presence of virus-specific T-cell responses provided proof of viral transmission (5). In this study, we investigated humoral and cellular responses to SARS-CoV-2 in 11 serodiscordant couples in whom 1 partner had evidence of mild COVID-19 and in 10 unexposed healthy blood donors (controls). We also explored the T-cell response against 2 human coronaviruses (HCoV) that cause common colds, given the potential cross-reactive immunity between SARS-CoV-2 and common cold HCoVs.

Materials and Methods

Study Participants

We included in the study 11 couples in whom 1 of the 2 partners met clinical, epidemiologic, and laboratory criteria for a mildly symptomatic confirmed COVID-19 case. We collected blood samples from both

partners of each couple during May 7–June 26, 2020. Ten healthy blood donors who had not been exposed to COVID-19 patients and who had tested negative for SARS-CoV-2 antibodies were enrolled as controls. All participants gave written informed consent for research according to protocols approved by the institutional review board of Strasbourg University Hospitals (ClinicalTrials.gov NCT 04405726).

SARS-CoV-2 Reverse Transcription PCR

We performed in-house real-time reverse transcription PCR (rRT-PCR) tests for SARS-CoV-2 nucleic acid on samples from nasopharyngeal swab specimens collected during the symptomatic phase from 8 index patients and 3 contacts. Primer and probe sequences target 2 regions of the RdRp gene and are specific to SARS-CoV-2. Assay sensitivity is ≈ 10 copies/reaction (<https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/real-time-rt-pcr-assays-for-the-detection-of-sars-cov-2-institut-pasteur-paris.pdf>).

Serologic Tests

We used 3 serologic assays to detect the presence of SARS-CoV-2 antibodies. The Abbott Architect SARS-CoV-2 IgG assay (Abbott, <https://www.corelaboratory.abbott>) is a chemiluminescent microparticle immunoassay for detecting IgG against the SARS-CoV-2 nucleoprotein and has sensitivity and specificity close to 100% (6,7). The EUROIMMUN SARS-CoV-2 assay (EUROIMMUN, <https://www.euroimmun.com>) is an ELISA for detecting IgG and IgA against the SARS-CoV-2 S1 domain of the spike glycoprotein, including the immunologically relevant receptor-binding domain. This assay was reported to have a clinical specificity of 98% for IgG and 91% for IgA detection, with a maximal sensitivity reached after 28 days after symptom onset (IgG 98% and IgA 95%) (7). The Biosynex COVID-19 BSS assay (Biosynex, <https://www.biosynex.com>) is a lateral flow assay for detecting IgM and IgG directed against the SARS-CoV-2 receptor-binding domain of the spike glycoprotein and has a sensitivity of 95.6% and a specificity of 99.4% (8). All 3 assays were approved by the French National Agency of Medicine and Health Products Safety for their excellent analytical performances. All tests were performed according to manufacturer instructions.

Interferon-Gamma Enzyme-Linked Immunospot Assay

We investigated T-cell immune response against SARS-CoV-2 by performing an interferon-gamma (IFN- γ) enzyme-linked ImmunoSpot ELISPOT assay (ImmunoSpot, <http://www.immunospot.com>) in duplicate on fresh peripheral blood mononuclear cells

(PBMC) isolated from heparin-anticoagulated blood. PBMCs were seeded at 200,000 CD3⁺ cells/well after dilution according to measurement of CD3⁺ cell frequencies by flow cytometry. They were stimulated for 20 \pm 4 h with overlapping 15-mer peptide pools used at a final concentration of 1 μ g/mL and spanning the sequences of the N-terminal portion of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein (pool S1, amino acid residues 1–643) and the C-terminal part of the same protein (pool S2, amino acid residues 633–1273), the nucleoprotein (N), the membrane protein (M), the envelope small membrane protein (E), and the accessory proteins 3A, 7A, 8 and 9B (PepMix; JPT Peptide Technologies, <https://www.jpt.com>).

To investigate the possibility of preexisting cross-reactive coronavirus-specific T cells, PBMCs were stimulated in parallel with peptide pools spanning the spike glycoprotein sequences of HCoV-229E (ES1 and ES2) and HCoV-OC43 (OS1 and OS2). Phytohemagglutinin (PHA) was used in duplicate as a positive control and culture medium in quadruplicate as a negative control. After colorimetric revelation of IFN- γ capture (UCytech, <https://ucytech.com>), spots were counted using an ELISPOT reader (AID, <https://www.aid-diagnostics.com>). For each condition, the mean number of spot-forming cells per million CD3⁺ cells was calculated from duplicates after subtraction of the background value obtained from negative controls to determine the frequency of antigen-specific T cells. The threshold defining T-cell reactivity for 1 antigen was set at >3 SD of the negative control background. The SARS-CoV-2-specific T-cell response was considered positive if analysis showed reactivity for ≥ 3 SARS-CoV-2 antigens.

Results

The median age of the 11 couples was 49 years (range 38–65 years); 11 (50%) were male (Table 1). Partners who met the confirmed case definition of COVID-19 (positive for SARS-CoV-2 by RT-PCR or serology or both) were the first to report symptoms in each couple and were considered index patients (P). Because of the lockdown from March 17 to May 11, 2020, each couple stayed in the same household during this period. Therefore, the partner of each index patient was considered a close contact (C) as defined by the US Centers for Disease Control and Prevention (CDC).

During March 2–April 9, all index patients reported histories of ≥ 1 symptoms: 8 had fever, 6 had cough, 4 had fatigue, 8 had headache, 8 had anosmia, 7 had ageusia, 3 had dyspnea, and 3 had myalgia (Table 1). We tested 8 of these patients for SARS-CoV-2 using RT-PCR on nasopharyngeal samples; results for 7 were positive

Table 1. Clinical and virological characteristics of COVID-19 patients and their contacts at symptom onset, Strasbourg, France, March 10–26, 2020*

ID	Age, y/sex	RT-PCR†	Symptoms								Duration of symptoms, d	Symptom onset delay, d‡	
			Fever	Cough	Fatigue	Headache	Anosmia	Ageusia	Dyspnea	Myalgia			
Couples with symptomatic contacts													
P1	47/F	ND	Y	N	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	15	5
C1	50/M	ND	Y	N	N	N	N	N	N	N	N	3	
P2	54/F	ND	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	13	7
C2	57/M	ND	Y	N	Y	Y	N	N	Y	N	N	6	
P4§	45/M	Pos (8.39)	Y	Y	N	Y	Y	Y	Y	N	N	12	6
C4	48/F	Neg	Y	Y	N	Y	N	N	N	N	N	10	
P5	38/M	Pos (7.65)	Y	N	N	Y	Y	Y	Y	N	N	2	10
C5	40/F	Neg	N	Y	N	Y	N	N	N	N	N	7	
P7	45/M	Pos	Y	Y	N	N	Y	Y	N	Y	Y	4	1
C7	45/F	Neg	N	N	N	N	N	Y	N	N	N	1	
P8	63/M	Pos	Y	N	Y	Y	Y	Y	N	N	N	10	10
C8	57/F	ND	N	N	Y	N	N	N	Y	N	Y	10	
Couples with asymptomatic contacts													
P3	65/F	ND	N	Y	N	Y	N	N	N	N	N	9	NA
C3	61/M	ND										NA	
Asymptomatic													
P6#	43/F	Pos (3.99)	N	Y	N	N	Y	Y	Y	Y	N	7	NA
C6	45/M	ND										NA	
Asymptomatic													
P9	57/M	Pos (6.20)	Y	Y	N	N	N	N	Y	Y	Y	14	NA
C9	58/F	ND										NA	
Asymptomatic													
P10	39/F	Neg	N	N	N	Y	Y	Y	N	N	N	10	NA
C10	39/M	ND										NA	
Asymptomatic													
P11	58/F	Pos (8.46)	Y	N	Y	Y	N	N	N	N	N	21	NA
C11	57/M	ND										NA	
Asymptomatic													

*In ID column, same number indicates partners in 1 couple. C, contact; d, days; ID, identification; ND, not done; NA, not applicable; neg, negative; P, index patient; pos, positive; RT-PCR, reverse-transcription PCR; SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2.
 †SARS-CoV-2 RT-PCR was performed in nasopharyngeal specimens during the symptomatic phase. When available, viral load (log copies/reaction) is indicated in parentheses below the result.
 ‡Days from symptom onset in index patient to onset in contact.
 §This index patient quarantined himself by dining separately and wearing a mask after positive SARS-CoV-2 PCR testing 1 day after symptom onset.
 #This index patient wore a mask after positive SARS-CoV-2 PCR testing 3 days after symptom onset.

(Table 1). The duration of symptoms varied (2–21 days, median 10 days). During this symptomatic phase, all couples rigorously washed their hands, and each avoided hugs and kisses with his or her partner except couple 2. Nine of the 11 couples slept in the same bed. Only 2 index patients, P4 and P6 (i.e., the index partners from couples 4 and 6), quarantined themselves by eating and sleeping separately or wearing a mask or both for 1 day (P4) and 3 days (P6) after symptom onset.

We performed serologic testing for SARS-CoV-2 antibodies in index patients at a median of 68 days (range 49–102 days) after symptom onset. All displayed IgG against the SARS-CoV-2 N protein, the spike glycoprotein, or both, as indicated by the 3 serologic assays (Table 2), confirming the persistence of the SARS-CoV-2 antibodies for up to 102 days after symptom onset. Results of tests for SARS-CoV-2 IgA were positive for 7 of the 11 index patients (Table 2).

Six of the 11 contacts (C1, C2, C4, C5, C7, and C8) experienced symptoms 1–10 days after symptom

onset in their partners (Table 1). We tested 3 of them for SARS-CoV-2 RNA by RT-PCR on samples from nasopharyngeal swab specimens during the symptomatic phase; results for all were negative (Table 1). Three had fever, 2 had cough, 2 had fatigue, 3 had headache, 1 had ageusia, 1 had dyspnea, and 1 had myalgia. The duration of symptoms varied (1–10 days, median 7 days) (Table 1). We performed serologic testing for SARS-CoV-2 at a median of 59 days (range 44–93 days) after symptom onset in symptomatic contacts and at the same time as their partners for asymptomatic contacts. All the contacts, including the symptomatic ones, were SARS-CoV-2 seronegative for IgM, IgA (except 1 equivocal result), and IgG (Table 2).

To investigate the SARS-CoV-2-specific T-cell response in the 11 couples, we collected fresh PBMC samples on the same day as the serum collections. We then stimulated the samples with 4 structural and 4 accessory SARS-CoV-2 proteins followed by IFN- γ ELISPOT analysis. All index and contact patients had

RESEARCH

normal lymphocyte counts (Table 2). All index patients showed SARS-CoV-2-specific IFN- γ responses against 4–8 SARS-CoV-2 antigens (Table 2; Figure 1). All of their immune systems recognized the structural proteins S1, S2, N, and M, and 9 of them recognized ≥ 1 accessory protein (3A, 7A, 8, or 9B), showing that SARS-CoV-2-specific T-cell responses had developed (Figures 1, 2; Appendix Figure 1, <https://wwwnc.cdc.gov/EID/article/27/1/20-3611-App1.pdf>). Blood samples were collected 49–102 days after symptom onset, which suggests that antiviral T cells are maintained for up to 102 days in patients having recovered from mild COVID-19.

We evaluated SARS-CoV-2-specific T-cell response in contacts at a median time of 59 days (range 44–93 days) after symptom onset in symptomatic contacts and at the same time as their partner for asymptomatic contacts. Among the 6 symptomatic

contacts, 4 (C1, C4, C5, and C8) displayed a positive SARS-CoV-2-specific T-cell response with a reactivity to ≥ 3 SARS-CoV-2 antigens (Figure 1, row A; Appendix Figure 1). Contact C1 exhibited T-cell reactivity against 4 SARS-CoV-2 antigens, including 1 structural protein (S1) and 3 accessory proteins; contact C5 exhibited T-cell reactivity against 2 and C8 against 3 structural proteins (N, E, and S2 for C8) and the accessory protein 9B. Contact C4 exhibited T-cell reactivity against 1 structural protein (S2) and 2 accessory proteins. Although symptomatic contact C7 exhibited T-cell SARS-CoV-2-specific response against a single antigen (structural protein S1), the frequency of IFN- γ -producing T cells was higher than that observed in his partner (mean 353 ± 53 vs. 126 ± 25 spot-forming units/1 million cells). Symptomatic contact C2 and asymptomatic contacts C6, C9, and C10 exhibited a low

Table 2. Humoral and cellular immune response to SARS-CoV-2 of COVID-19 patients and their contacts 44–102 days after symptom onset, Strasbourg, France, 2020*

ID†	Lymphocyte count, $\times 10^9/L$	Days from symptom onset to sample collection	SARS-CoV-2 serologic test result	Assay results				SARS-CoV-2-specific T-cell response (no. antigens)
				Biosynex Antigen: RBD of protein S	Abbott Architect Antigen: protein N (index value)	Euroimmun Antigen: protein S (index value)	SARS-CoV-2-specific T-cell response (no. antigens)	
Couples with symptomatic contacts								
P1	1.3	58	Pos	Neg	Pos	Pos (3.36)	Pos (2.28)/neg	Pos (5)†
C1	1.8	53	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg/neg	Pos (4)†
P2	2.0	51	Pos	Neg	Pos	Pos (4.3)	Pos (2.3)/neg	Pos (7)†
C2	1.5	44	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg/neg	Neg (1)
P4	1.6	57	Pos	Pos	Pos	Pos (6.48)	Pos (4.24)/pos (4.16)	Pos (4)†
C4	1.7	51	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg/neg	Pos (3)†
P5	1.6	68	Pos	Pos	Pos	Pos (3.97)	Pos (4.86)/pos (2.38)	Pos (7)†
C5	2.0	80	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg/neg	Pos (3)†
P7	1.3	64	Pos	Pos	Neg	Pos (4.18)	Pos (3.43)/doubtful (0.94)	Pos (4)†
C7	2.2	64	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg/neg	Neg (1)
P8	1.9	102	Pos	Pos	Pos	Pos (7.55)	Pos (5.39)/pos (9.23)	Pos (5)†
C8	1.9	93	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg/neg	Pos (4)†
Couples with asymptomatic contacts								
P3	1.7	49	Pos	Pos	Pos	Pos (8.4)	Pos (7.23)/pos (3.83)	Pos (8)†
C3	1.5	NA	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg/Neg	Neg (0)
P6	2.1	69	Pos	Pos	Pos	Pos (6.37)	Pos (5.73)/pos (2.49)	Pos (6)†
C6	2.2	NA	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg/doubtful (0.85)	Neg (1)
P9	2.4	88	Pos	Pos	Pos	Pos (7.48)	Pos (7.02)/pos (5.98)	Pos (6)†
C9	3.0	NA	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg/neg	Neg (1)
P10	1.9	99	Pos	Pos	Neg	Pos (2.46)	Pos (1.75)/doubtful (0.95)	Pos (5)†
C10	1.1	NA	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg/neg	Neg (1)
P11	1.7	100	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos (4.01)/pos (1.72)	Pos (6)†
C11	1.9	NA	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg/neg	Neg (0)

*In ID column, same number indicates P and C are partners in 1 couple. C, contact; ID, identification; neg, negative; P, index patient; pos, positive; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; NA, not applicable; RBD, receptor-binding domain; SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2.

frequency of T-cell reactivity against a single antigen (S2 = 2, E = 1, 9B = 1) that was not considered here as a positive specific T-cell response to SARS-CoV-2 (Figure 1, row A and B; Figure 2; Appendix Figure 1). The asymptomatic contacts C3 and C11 showed no T-cell response against any of the SARS-CoV-2 antigens (Figure 1, row B; Appendix Figure 1).

We included 10 unexposed HD as controls, with a mean age of 46 years (range 29–60 years). We

confirmed their SARS-CoV-2 seronegative status with the 3 serologic assays. Five of them displayed low T-cell reactivity to SARS-CoV-2 against 1 or 2 antigens (S1, S2, M, 9B) (Figure 1, row C; Appendix Figure 1).

A recent study demonstrated that several CD4 T cells reacting to SARS-CoV-2 epitopes were a result of a cross-reaction with corresponding homologous sequences from commonly circulating HCoV-229E, which can cause common colds

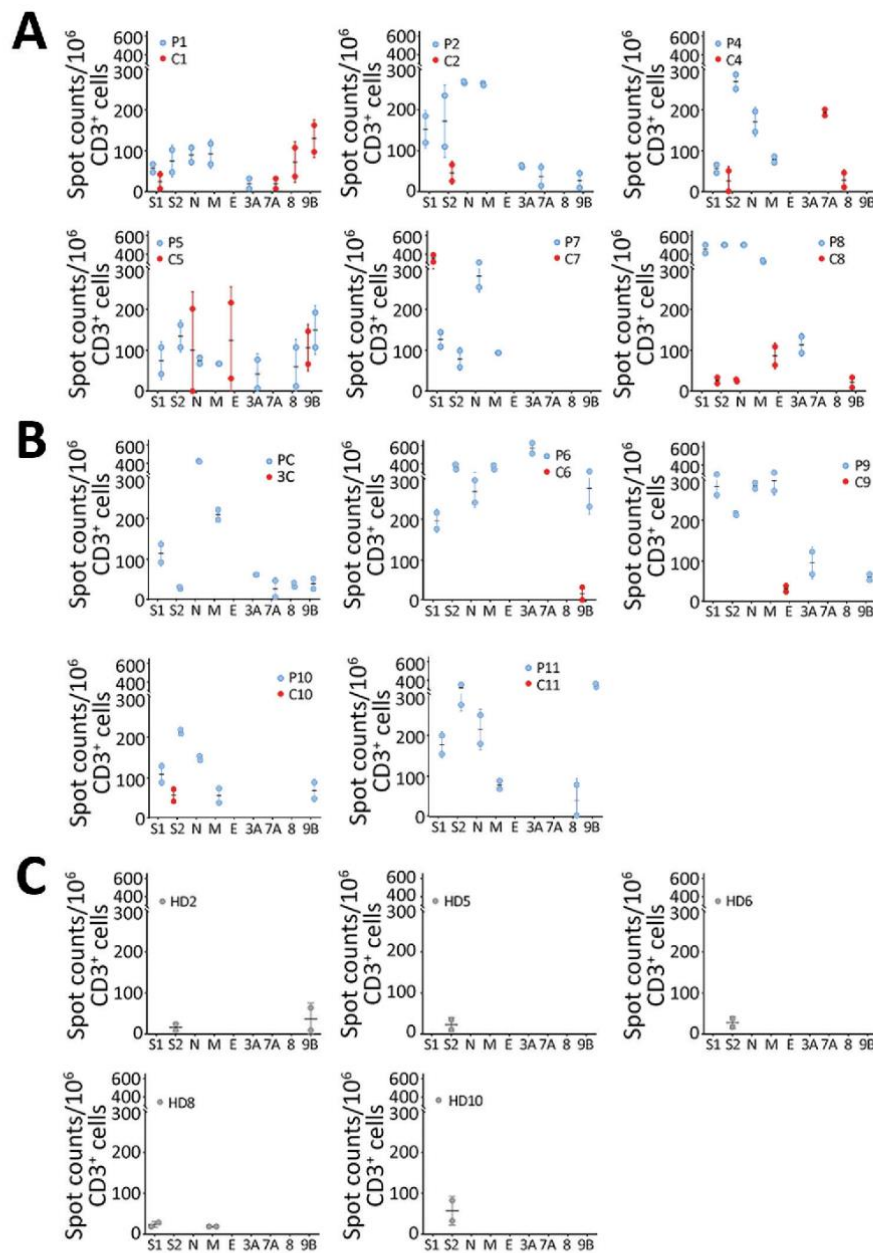


Figure 1. SARS-CoV-2-specific T-cell response patterns in index patients, contacts, and unexposed healthy donors in study of intrafamilial exposure to SARS-CoV-2, France. A, B) Spot counts of SARS-CoV-2-specific T cells measured by interferon-gamma (IFN- γ) ELISPOT assay are shown for 11 couples, each including 1 confirmed coronavirus disease case (P) and 1 SARS-CoV-2 seronegative symptomatic (A) or asymptomatic (B) contact (C). C) Spot counts of IFN- γ -producing T cells in response to SARS-CoV-2 antigens are shown for the 5 out of the 10 controls (HD) tested who displayed detectable T-cell responses. All experiments were performed in duplicate. Data are shown as means and standard deviations of spots counts of IFN- γ -producing T cells per 1 million CD3+ cells. Each dot represents a single measured value. Blue dots correspond to T-cell responses detected in index patients, red dots correspond to those detected in contacts and gray dots to those found in healthy donors. The x-axis represents the SARS-CoV-2 antigens spanned by the peptide pools used in ELISPOT assays: the N-terminal and C-terminal regions of SARS-CoV-2 spike glycoprotein (S1 and S2, respectively); the N, M, and E proteins; and the accessory proteins 3A, 7A, 8, and 9B. C, contact; E, envelope small membrane protein; HD, healthy blood donor (control); M, membrane protein; N, nucleoprotein; P, index patient; SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2.

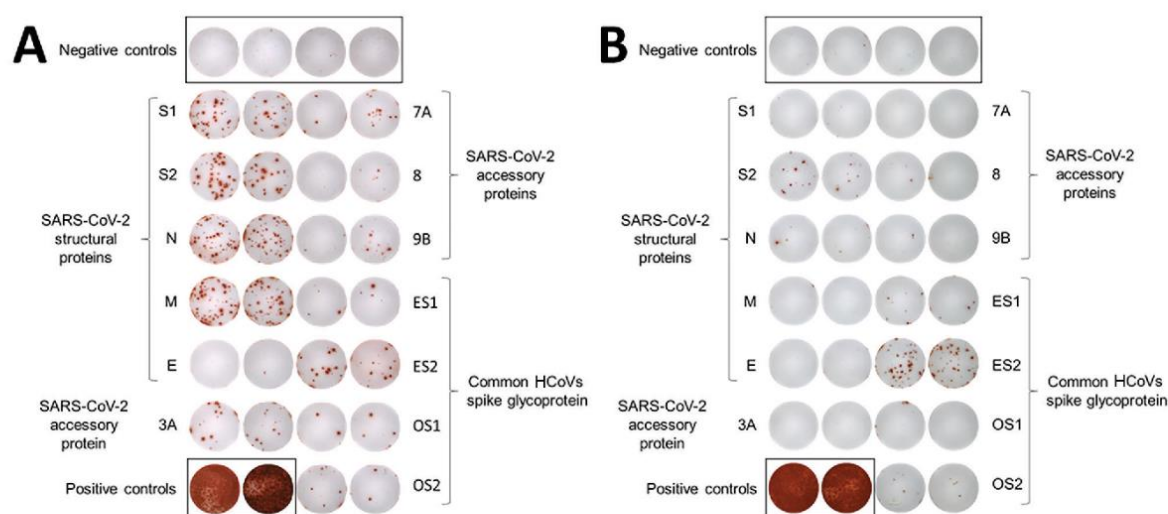


Figure 2. Example of IFN γ ELISPOT images corresponding to couple 2 (P2 and C2) in a study of intrafamilial exposure to SARS-CoV-2, France. T-cell-specific response was evaluated using peptide pools spanning SARS-CoV-2 structural protein (spike glycoprotein: N-terminal region = S1, C-terminal region = S2, N, M, and E proteins); SARS-CoV-2 accessory proteins (3A, 7A, 8, and 9B); and the N-terminal and C-terminal regions of the spike glycoprotein of common cold human coronaviruses 229 (ES1 and ES2) and OC43 (OS1 and OS2). All experiments were performed in duplicates with 4 wells of negative controls (cells with culture medium only) and 2 wells of positive controls (phytohemagglutinin) for each individual. P2 was reactive to all antigens tested except for SARS-CoV-2 proteins E and 8, whereas C2 was reactive to 1 SARS-CoV-2 protein only (S2) and to ES1, ES2, and OS2. C, contact; E, envelope small membrane protein; HCoV, human coronavirus; M, membrane protein; N, nucleoprotein; P, index patient; SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2.

(9). To investigate if there was a correlation between T-cell responses against SARS-CoV-2 and common cold HCoVs, we tested the 11 couples and the 10 unexposed controls for reactivity against the spike glycoprotein (S1 and S2 regions) of HCoV-229E and HCoV-OC43. All but 1 HD (HD9) showed IFN- γ -producing T cells directed against these antigens (Figure 3; Appendix Figure 2). Eight index patients (P2, P3, P4, P5, P6, P7, P10, and P11), 7 contacts (C1, C2, C4, C8, C9, C10, and C11), and 7 controls displayed a positive T-cell response against both HCoV-229E and HCoV-OC43. Three index patients (P1, P8, and P9), 4 contacts (C3, C5, C6, and C7), and 2 controls displayed positive T-cell responses only against HCoV-229E. We found no correlation between the responses to S1 and S2 peptide pools of SARS-CoV-2 and HCoVs (Figure 4).

Discussion

In this study, we demonstrate that intrafamilial contacts can display a SARS-CoV-2-specific T-cell response in the absence of seroconversion, especially when they have been symptomatic. This T-cell response provides evidence that transient or anatomically contained SARS-CoV-2 infection, or both, may have occurred and that T-cell responses would be

more sensitive indicators of SARS-CoV-2 exposure than antibodies.

Each couple stayed in the same household during the COVID-19 episode and the partners were in close contact for a long time due to the lockdown. Although 5 contacts were asymptomatic, 6 exhibited symptoms a median of 7 days after symptom onset in their partners, suggesting that at least those 6 were infected. However, results from neither RT-PCR nor serology testing using 3 different assays and targeting 2 different SARS-CoV-2 structural proteins were positive in contacts. In contrast, analysis of SARS-CoV-2-specific T-cell response showed a positive response against ≥ 3 antigens, including structural proteins in 4 symptomatic contacts, strongly suggesting that they were infected with SARS-CoV-2.

Five unexposed controls and 1 symptomatic and 3 asymptomatic contacts exhibited low frequencies of SARS-CoV-2 IFN- γ -producing T cells. Because these 4 contacts were exposed to COVID-19 patients and the unexposed controls donated blood in April and May 2020, it is unclear whether the detectable T-cell responses were the result of cross-reactivity with common cold HCoV antigens, as previously reported (10–12) or of SARS-CoV-2 infection. Al-

though recent research provided direct evidence of cross-reactivity between SARS-CoV-2 epitopes and common cold HCoVs (9), we observed no obvious relationship between the magnitude of T-cell responses against spike glycoproteins of common cold HCoVs and SARS-CoV-2 in index patients, contacts, and unexposed HD. In parallel with our findings, another recent study (13) reported finding memory T-cell response against SARS-CoV-2 structural proteins in exposed family members and healthy persons lacking detectable circulating antibodies who donated blood during the pandemic.

There are multiple explanations for virus-specific T cells developing without any antibody response. A study in a small cohort of patients (14) reported that 40% of asymptomatic and 12.9% of patients with mild COVID-19 no longer had antibodies 56 days after being discharged from the hospital. In our study, the serum samples were collected between 49 to 102 days after symptom onset, so it is possible

that the contacts had lost their antibodies during this period. It is also possible that very low levels of antibodies that might have developed in contacts were not detected by the serologic assays we used. The lack of specific antibodies might also be because of exposure to low doses of the virus with brief and transient viral replication, to a downstream event of protective innate immune response, or to abortive replication of defective viral genomes (5).

Eventually, the presence of SARS-CoV-2-specific T-cell response, whether because of infection with SARS-CoV-2 or a cross-reaction, might explain the mild and rapidly resolved symptoms in index patients and symptomatic contacts and the resistance of other contacts to symptomatic SARS-CoV-2 infection. However, this possible explanation needs to be investigated further in a large cohort.

Our study is subject to several limitations. First, our findings suffer from a limited sample size, although this is a unique cohort, and it was not possible to increase

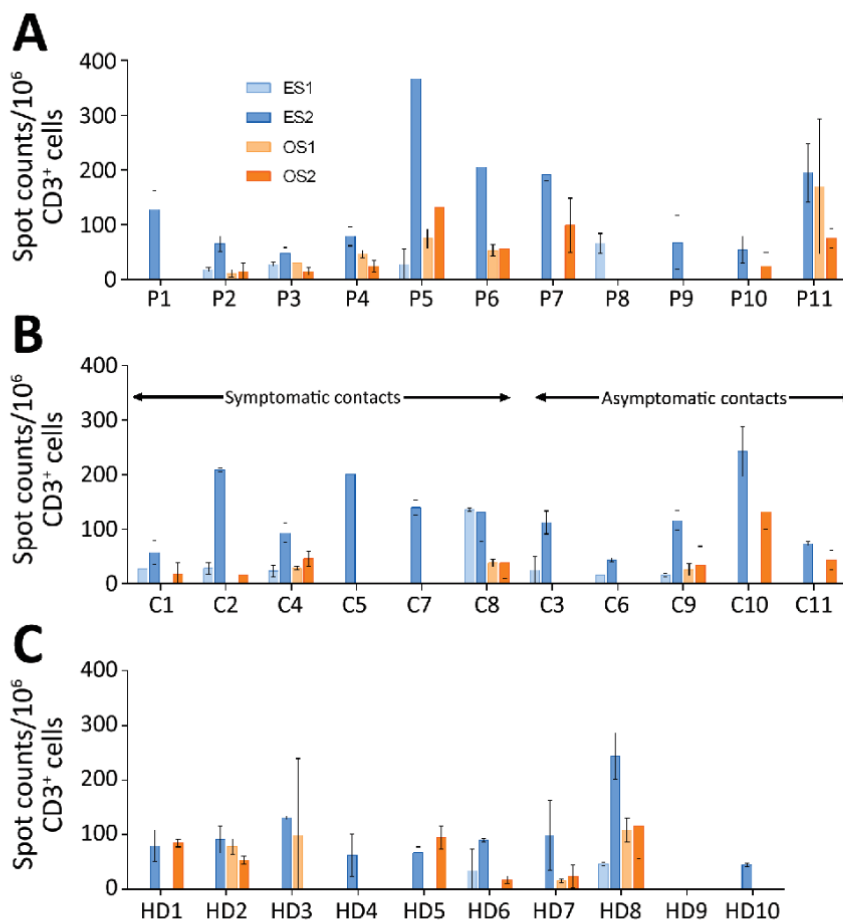


Figure 3. Frequency of specific T cells directed against spike glycoprotein antigens of the 2 common cold HCoVs 229E and OC43 in study of intrafamilial exposure to SARS-CoV-2, France. A) Index patients (n = 11); B) seronegative partners of index patients (n = 11); C) unexposed healthy controls (n = 10). Spot counts of common cold human coronaviruses-specific T cells were measured by interferon-gamma ELISPOT assay. All experiments were performed in duplicate. Data are shown as means and standard deviations of spot counts of interferon-gamma-producing T cells per 1 million CD3⁺ cells. T-cell secretion of IFN- γ was determined in response to peptide pools spanning the N-terminal and the C-terminal regions of the spike glycoprotein of HCoV 229E (ES1 and ES2 subpools) and HCoV OC43 (OS1 and OS2 subpools). Each color corresponds to 1 antigen subpool. C, contact; HCoV, human coronavirus; HD, healthy blood donor (control); P, index patient; SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2.

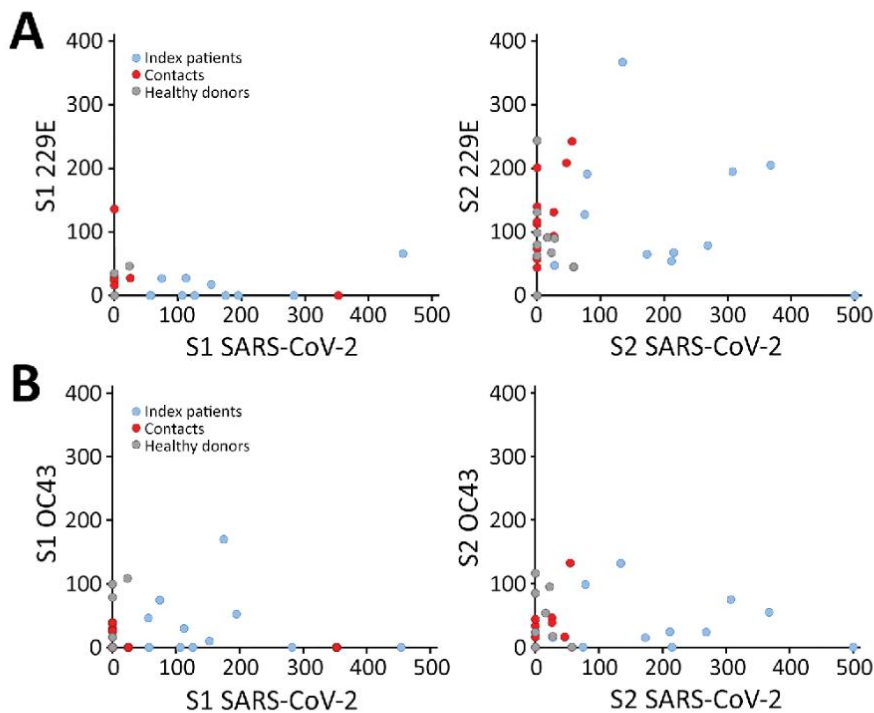


Figure 4. Correlation of the T-cell responses against spike glycoprotein antigens of SARS-CoV-2 and HCoVs 229E and OC43 in study of intrafamilial exposure to SARS-CoV-2, France. Means of spot counts of interferon gamma-producing T cells per 1 million CD3+ cells in response to peptide pools spanning the N terminal (S1) and the C-terminal (S2) regions of spike glycoproteins of SARS-CoV-2 compared with HCoV-229E (A) and HCoV-OC43 (B) in 11 confirmed coronavirus disease cases (index patients), their seronegative partners (contacts), and 10 healthy blood donor controls. HCoV, human coronavirus; SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2.

the sample size. Second, because of the unavailability of PBMCs collected before the pandemic, we recruited unexposed HD who donated their blood during the pandemic as controls, so we cannot exclude a potential infection by SARS-CoV-2 before the enrollment in the study. Third, although we detected high frequencies of T-cell response against diverse SARS-CoV-2 proteins in symptomatic contacts lacking circulating antibodies, it remains possible that a part of this response may be a result of cross-reaction with common cold HCoVs.

Overall, our results indicate that persons exposed to SARS-CoV-2 may develop virus-specific T-cell responses without detectable circulating antibodies. This aspect of the immune response against SARS-CoV-2 contributes substantially to the understanding of the natural history of COVID-19. Furthermore, our data indicate that epidemiologic data relying solely on the detection of SARS-CoV-2 antibodies may lead to a substantial underestimation of prior exposure to the virus. Our data may also have implications for vaccine development and tracking the future evolution of the SARS-CoV-2 pandemic.

Acknowledgments

We thank all the participants in this study.

This study was supported by the Strasbourg University Hospital (COVID-HUS study, HUS N°7760), the Agence

Nationale de la Recherche (ANR), Laboratoire d'Excellence TRANSPLANTE (ANR-11-LABX-0070_TRANSPLANTE), and Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (UMR_S 1109).

About the Author

Ms. Gallais is a PhD student under the supervision of Prof. S. Fafi-Kremer at the virology laboratory of Strasbourg University Hospital, INSERM unit 1109. She is working on understanding the mechanisms of viral infection control by the host's immune response. Her current research is focused on the cellular immune response against SARS-CoV-2 in the context of the COVID-19 pandemic.

References

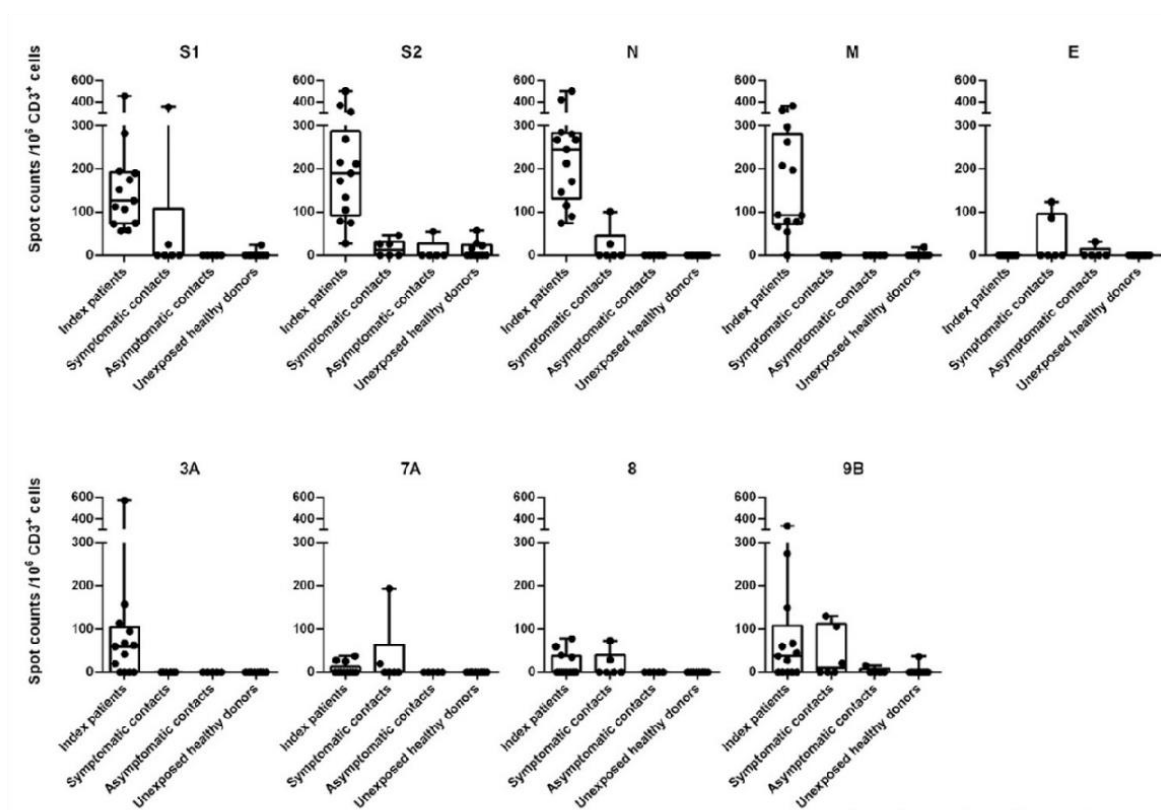
- Li Q, Guan X, Wu P, Wang X, Zhou L, Tong Y, et al. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia. *N Engl J Med*. 2020;382:1199–207. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001316>
- Studdert DM, Hall MA. Disease control, civil liberties, and mass testing—calibrating restrictions during the Covid-19 pandemic. *N Engl J Med*. 2020;383:102–4. <https://doi.org/10.1056/NEJMp2007637>
- Lescure FX, Bouadma L, Nguyen D, Parisey M, Wicky PH, Behillil S, et al. Clinical and virological data of the first cases of COVID-19 in Europe: a case series. *Lancet Infect Dis*. 2020;20:697–706. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30200-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30200-0)
- Kissler SM, Tedijanto C, Goldstein E, Grad YH, Lipsitch M. Projecting the transmission dynamics of SARS-CoV-2

- through the postpandemic period. *Science*. 2020;368:860–8. <https://doi.org/10.1126/science.abb5793>
5. Heller T, Werner JM, Rahman F, Mizukoshi E, Sobao Y, Gordon AM, et al. Occupational exposure to hepatitis C virus: early T-cell responses in the absence of seroconversion in a longitudinal cohort study. *J Infect Dis*. 2013;208:1020–5. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit270>
 6. Bryan A, Pepper G, Wener MH, Fink SL, Morishima C, Chaudhary A, et al. Performance characteristics of the Abbott Architect SARS-CoV-2 IgG assay and seroprevalence in Boise, Idaho. *J Clin Microbiol*. 2020;58:e00941-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.00941-20>
 7. Velay A, Gallais F, Benotmane I, Wendling MJ, Danion F, Collange O, et al. Evaluation of the performance of SARS-CoV-2 serological tools and their positioning in COVID-19 diagnostic strategies. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2020;98:115181. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2020.115181>
 8. Fafi-Kremer S, Bruel T, Madec Y, Grant R, Tondeur L, Grzelak L, et al. Serologic responses to SARS-CoV-2 infection among hospital staff with mild disease in eastern France. *EBioMedicine*. 2020;59:102915. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102915>
 9. Mateus J, Grifoni A, Tarke A, Sidney J, Ramirez SI, Dan JM, et al. Selective and cross-reactive SARS-CoV-2 T cell epitopes in unexposed humans. *Science*. 2020;370:eabd3871. <https://doi.org/10.1126/science.abd3871>
 10. Braun J, Loyal L, Frentsch M, Wendisch D, Georg P, Kurth F, et al. SARS-CoV-2-reactive T cells in healthy donors and patients with COVID-19. *Nature*. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2598-9>
 11. Grifoni A, Weiskopf D, Ramirez SI, Mateus J, Dan JM, Moderbacher CR, et al. Targets of T cell responses to SARS-CoV-2 coronavirus in humans with COVID-19 disease and unexposed individuals. *Cell*. 2020;181:1489–1501.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.015>
 12. Le Bert N, Tan AT, Kunasegaran K, Tham CYL, Hafezi M, Chia A, et al. SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls. *Nature*. 2020;584:457–62. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2550-z>
 13. Sekine T, Perez-Potti A, Rivera-Ballesteros O, Strålin K, Gorin J-B, Olsson A, et al.; Karolinska COVID-19 Study Group. Robust T cell immunity in convalescent individuals with asymptomatic or mild COVID-19. *Cell*. 2020;183:158–68.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.017>
 14. Long QX, Tang XJ, Shi QL, Li Q, Deng HJ, Yuan J, et al. Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. *Nat Med*. 2020;26:1200–4. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0965-6>

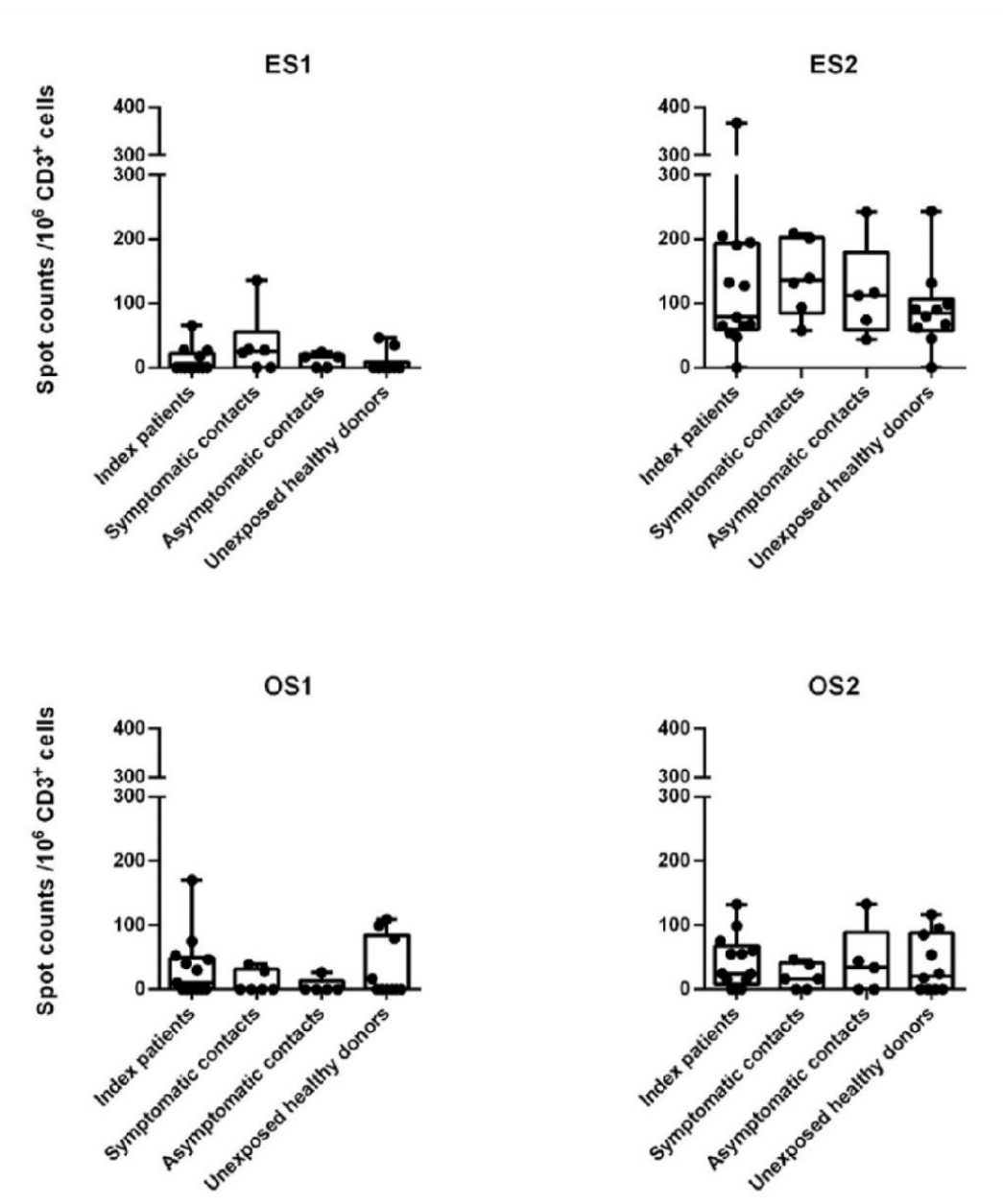
Address for correspondence: Samira Fafi-Kremer, Virology Laboratory and INSERM UMR_S 1109, Strasbourg University Hospitals, 3 rue Koeberlé, F-67000 Strasbourg, France; email: samira.fafi-kremer@unistra.fr

Intrafamilial Exposure to SARS-CoV-2 Associated with Cellular Immune Response without Seroconversion, France

Appendix



Appendix Figure 1. Specific T-cell response against structural and accessory SARS-CoV-2 proteins evaluated by ELISPOT assays. Dot plots showing the frequencies of IFN γ -producing cells responding in ELISPOT assays to overlapping peptides spanning several SARS-CoV-2 structural proteins [N- and C-terminal parts of spike protein (S1 and S2, respectively), nucleocapside (N), membrane (M), envelope (E)] and accessory proteins (7A, 8, and 9B). Each dot represents the mean response of 1 individual. Four groups are represented: COVID-19 confirmed cases (index patients), their partners with or without symptoms developed in the days after onset in the index patient, and unexposed healthy donors.



Appendix Figure 2. Specific T cells against the spike protein of the human coronaviruses HCoV-229E and OC43 evaluated by ELISPOT assays. Dot plots showing the frequencies of IFN γ -producing cells responding in ELISPOT assays to overlapping peptides spanning the N- and the C-terminal parts of the spike protein of the human coronaviruses HCoV-229E (ES1 and ES2, respectively) and OC43 (OS1 and OS2, respectively). Each dot represents the response of 1 individual. Four groups are represented: COVID-19 confirmed cases (index patients), their partners with or without symptoms developed in the days after onset in the index patient, and unexposed healthy donors.

D. Discussion

Cette étude a révélé une réactivité cellulaire dirigée contre plusieurs protéines du SARS-CoV-2 chez des sujets exposés au sein de leur foyer malgré l'absence d'anticorps détectables, en particulier chez ceux ayant développé des symptômes peu après l'infection de leur partenaire. Cette réactivité était généralement de faible intensité et couvrait un spectre antigénique moins large que les cas index séropositifs. En revanche, elle ciblait davantage de protéines virales que celle mise en évidence chez les cas contacts asymptomatiques et les sujets non exposés du groupe contrôle, suggérant que cette réactivité soit le fruit d'une contamination au SARS-CoV-2. Ces résultats révèlent donc que les patients infectés ne développeraient pas systématiquement des anticorps détectables et que l'exploration de l'immunité cellulaire pourrait être un complément aux examens sérologiques pour ne pas sous-estimer le nombre de cas de COVID-19 rétrospectivement diagnostiqués.

Des conclusions similaires ont été tirées par d'autres équipes de recherches, en particulier par Sekine et al. dont les travaux révèlent une réactivité contre les protéines structurales S, N et M plus importante chez une groupe de sujets séronégatifs exposés au SARS-CoV-2 au sein de leur foyer en comparaison de donneurs sains prélevés au cours de la première vague ou avant la pandémie (269). De même, une autre étude rapporte une réactivité cellulaire contre les protéines structurales S ou M chez sept des neuf sujets inclus convalescents de COVID-19 (confirmée par RT-PCR) et séronégatifs en IgG anti-S, tandis que cette réactivité n'était pas retrouvée chez le groupe des sujets sains non exposés (443). Enfin, une réponse cellulaire de type CD8 anti-SARS-CoV-2 a été décrite chez huit individus précédemment atteints de COVID-19 en l'absence d'IgG anti-S et anti-N détectables (444). L'ensemble de ces résultats sont en faveur d'une possible réponse cellulaire adaptative malgré un défaut de réponse humorale.

Cependant, la question de la réactivité croisée est majeure pour l'interprétation de ces résultats. En effet, les coronavirus saisonniers endémiques partagent une homologie de

séquence modérée avec le SARS-CoV-2, potentiellement à l'origine d'une réponse cellulaire croisée malgré un statut séronégatif. Cette hypothèse a été confortée par de nombreux travaux, qui mettent en évidence une réactivité cellulaire chez 28 % à 81 % des sujets non exposés prélevés avant même le début de la pandémie (266,294–297). Cette réponse était plus fréquemment dirigée contre les protéines S, N et non structurales (294). La fréquence relativement élevée de réactivité croisée contre le SARS-CoV-2 peut s'expliquer par le fait que plus de 90 % de la population soit séropositive pour au moins trois des quatre coronavirus saisonniers communs (445). De plus, cette réactivité croisée jouerait un rôle protecteur après l'exposition au virus. En effet, une publication conclue que l'infection récente à un coronavirus saisonnier est associée à des symptômes moins sévères de COVID-19, indépendamment de l'âge (300). Une autre étude rapporte que l'effet protecteur conféré par l'immunité cellulaire croisée reposerait davantage sur les cellules dirigées contre des cibles autres que la protéine S, en particulier contre la protéine N. Les auteurs décrivent en effet une fréquence plus importante de ces cellules reconnaissant des épitopes de réactivité croisée chez les sujets restés négatifs en RT-PCR après contact avec un cas index par rapport à ceux ayant développé une infection (446). La réactivité croisée avec les coronavirus saisonniers pourrait donc être à l'origine de la faible réponse cellulaire observée dans notre étude contre un ou deux antigènes du SARS-CoV-2 chez certains sujets contacts asymptomatiques ou non exposés, bien que l'on ne puisse écarter l'hypothèse d'un contact avec le SARS-CoV-2 étant donné que l'ensemble des participants ont été recrutés après le début de la pandémie. Cette réactivité était principalement dirigée contre la sous-unité S2 dans notre étude, en concordance avec les conclusions de Braun et al. qui rapportent une réactivité T CD4 équivalente contre les sous-unités S1 et S2 chez les patients convalescents de COVID-19, mais bien plus fréquente contre S2 en comparaison de S1 chez les donneurs sains. Cette observation s'explique par un degré d'homologie plus élevé entre les épitopes associés au CMH-II du SARS-CoV-2 et des coronavirus saisonniers sur la fraction C-terminale de la protéine S (296).

L'hypothèse que la réponse cellulaire observée dans notre étude chez certains sujets contacts symptomatiques contre au moins trois antigènes du SARS-CoV-2 serait uniquement imputable à une réactivité croisée ne peut être rejetée. Cependant, le spectre plus large des cibles antigéniques et la fréquence globalement plus élevée des cellules réactives chez ces sujets que dans le groupe contrôle non exposé, ainsi que l'absence de corrélation entre les réactivités anti-S du SARS-CoV-2 et des coronavirus 229E et OC43 plaident pour une réponse cellulaire stimulée par un contact avec le SARS-CoV-2 chez ces individus. Celle-ci pourrait résulter d'une réactivation de lymphocytes T mémoires initialement développés contre les coronavirus saisonniers et/ou de l'activation de lymphocytes T naïfs par le SARS-CoV-2.

La littérature va également dans le sens d'une possible réponse cellulaire témoin d'une contamination par le SARS-CoV-2 malgré l'absence d'anticorps détectables. En effet, les travaux de deux équipes distinctes montrent une réactivité cellulaire anti-SARS-CoV-2 plus importante chez les volontaires sains séronégatifs prélevés pendant la pandémie en comparaison de donneurs sains prélevés avant la pandémie (269,447). Ceci suggère que certains donneurs sont entrés en contact avec le SARS-CoV-2 avant leur prélèvement, et ont été soit protégés de l'infection par la stimulation de la réponse croisée préexistante dirigée contre les coronavirus saisonniers, soit ont développé une forme asymptomatique de l'infection éliminée rapidement sans l'intervention de l'immunité humorale.

De plus, la réponse cellulaire développée après stimulation par le SARS-CoV-2 couvre un spectre d'antigènes plus large en comparaison de la réactivité croisée de base. En effet, l'étude menée par Ogbe et al. montre une réactivité des lymphocytes T plus importante et dirigée contre un spectre plus large d'antigènes (protéines M, N, ORFs 3, 6, 7 et 8) chez huit médecins séronégatifs fortement exposés au virus au cours de la pandémie et ayant développé des symptômes compatibles de COVID-19, en comparaison des sujets non exposés ou pré-pandémiques pour lesquelles les lymphocytes réactifs ciblaient majoritairement les sous-unités S1 et S2 de la protéine S (448). Par ailleurs, l'étude de Grifoni et al. décrit une réactivité marginale contre les protéines N et M chez un groupe 10 donneurs non exposés

tandis que la protéine S était ciblée par 23 % de la réactivité anti-SARS-CoV-2 croisée des LT CD4+ (266). Ces conclusions sont en ligne avec nos observations de réactivité multi-antigénique chez certains sujets contacts symptomatiques et plus limitée dans le groupe contrôle.

Enfin, les sujets séronégatifs malgré une exposition au virus peuvent présenter une réactivité cellulaire dirigée contre des épitopes spécifiques du SARS-CoV-2 non ciblés par les lymphocytes de réactivité croisée. C'est notamment ce qui a été montré dans l'étude de Nelde et al. qui portait sur la caractérisation de la réponse cellulaire chez des patients avec antécédent de COVID-19 confirmée par RT-PCR. Celle-ci a révélé que 10 % de ces patients étaient séronégatifs avec deux techniques distinctes basées sur deux antigènes différents (S et N), mais que plus de la moitié de ces derniers avaient une réactivité cellulaire dirigée contre des épitopes spécifiques du SARS-CoV-2. La spécificité de ces épitopes avait été démontrée par l'absence de réactivité parmi un groupe de 94 sujets non exposés prélevés avant le début de la pandémie, alors qu'une réponse cellulaire croisée était détectée chez 81 % d'entre eux mais contre d'autres épitopes (297).

L'ensemble de ces travaux confortent notre hypothèse de réactivité cellulaire développée au contact du SARS-CoV-2 chez certains sujets contacts symptomatiques dans notre étude. Plusieurs mécanismes peuvent expliquer la sérologie négative observée chez ces participants malgré l'exposition au virus. Elle peut résulter de la perte rapide des anticorps développés après infection, ou d'une concentration d'anticorps circulants très faible inférieure au seuil de détection des techniques sérologiques utilisées. Une autre possibilité serait une clairance virale rapide avant même la stimulation de l'immunité humorale, du fait d'une faible exposition au virus ou d'un contrôle précoce de l'infection par l'immunité innée avec le concours éventuel de l'immunité cellulaire. Ces résultats soulignent donc un risque de sous-estimation du nombre de personnes exposées au SARS-CoV-2 en se basant uniquement sur les résultats de sérologie et soulignent l'intérêt de l'exploration de l'immunité cellulaire dans ce contexte. La persistance de cette immunité cellulaire isolée reste cependant à déterminer.

II. Étude longitudinale de la réponse humorale et du risque de réinfection au cours de la première année suivant l'infection

A. Contexte et objectifs de l'étude

La majorité des patients développent une réponse humorale après infection et produisent des anticorps neutralisants anti-SARS-CoV-2. Cependant, la question de la persistance des anticorps contre ce nouveau virus a suscité un vif intérêt dès le début de la pandémie. En effet, sa détermination était nécessaire pour connaître la fiabilité des études de séroprévalence, mais surtout pour évaluer la durée de protection face au risque de réinfection, en particulier avec l'émergence de variants du SARS-CoV-2. Dans ce contexte, nous avons conduit une étude monocentrique de suivi sérologique sur une cohorte de personnes travaillant au sein des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, composée de 393 individus infectés lors de la première vague (COVID+), dont 93,4 % atteints de forme légère de COVID-19, et de 916 participants sans antécédent de COVID-19 et séronégatifs à l'inclusion (COVID-). Les anticorps ont été recherchés par test immunochromatographique ciblant les IgM et IgG anti-RBD, par ELISA IgG anti-N et par CMIA quantitatif dosant les IgG anti-RBD à un mois de l'infection (M1) chez les sujets convalescents et au même moment pour les sujets non infectés, puis à M3-6, M7-9 et M11-13. Cette étude initiée très tôt dans l'une des régions les plus précocement et intensément touchées par la première vague de COVID-19 en France a été l'une des premières à caractériser la persistance des anticorps jusqu'à plus d'un an après infection et leur efficacité protectrice sur cette période face aux nouvelles infections. Le pouvoir neutralisant des anticorps sur virus entier a également été évalué un an après infection contre la souche infectante portant la mutation D614G et contre les variants alpha et beta ayant émergé au cours du suivi, chez un sous-groupe de 15 participants non vaccinés et de 13 participants vaccinés par une dose unique afin d'observer le gain obtenu par cette vaccination.

B. Principaux résultats

Le suivi sérologique a mis en évidence une persistance des anticorps de type IgG anti-RBD jusqu'à au moins 13 mois suivant un premier épisode de COVID-19, avec un taux de séropositivité établi par CMIA de 97,1 % identique à celui observé seulement un mois après l'infection. De plus, notre étude souligne les divergences de performances analytiques des coffrets sérologiques commercialisés, qui s'accroissent à distance de l'infection avec une sensibilité plus faible des autres tests. L'analyse de l'évolution des concentrations en IgG anti-RBD au cours du temps après infection par le SARS-CoV-2 a mis en évidence une lente décroissance en début de convalescence, suivie d'une progressive stabilisation. En fin de suivi et en l'absence de vaccination, la demi-vie des anticorps était estimée à 725 jours (intervalle de confiance à 95 % (IC95): 623-921) avec une concentration médiane de 35 BAU/mL (IC95 : 26-47) à M11-13 de l'infection. L'analyse de l'influence de facteurs d'hôtes sur la cinétique des concentrations d'IgG anti-RBD par analyse multivariée a révélé une décroissance plus rapide entre M3-6 et M7-9 chez les hommes et les individus de rhésus négatif, sans influence de l'âge, de l'indice de masse corporelle, du groupe sanguin, ou encore du Ct initial lors du diagnostic de l'infection par RT-PCR. La cinétique observée des IgG anti-N était différente et se découpait en trois phases, avec tout d'abord une diminution importante des anticorps jusqu'à M3-6, puis une relative stabilisation avant une seconde chute plus marquée aboutissant à 80 % de séronégativité un an après infection. Leur décroissance entre M3-6 et M7-9 était plus lente chez les personnes d'âge plus avancé et chez les hommes, révélant une influence du sexe opposée à celle sur la cinétique des IgG anti-RBD. Au cours du suivi, 69 participants du groupe COVID- ont été infectés, tandis que seul un cas de réinfection asymptomatique a été diagnostiqué dans le groupe COVID+, révélant une réduction de l'incidence de 96,7 % de la COVID-19 après une première infection. La sérologie réalisée en fin de suivi a montré que les titres d'anticorps obtenus à partir du 6^e jour après vaccination atteignaient au moins le double de ceux mesurés à M1 de l'infection chez 98 % des sujets COVID+, et que ces titres dépassaient les 1000 BAU/mL pour 93 % d'entre eux. Par ailleurs, l'administration d'une deuxième dose lors de la primo-vaccination des personnes précédemment infectées n'était associée à aucun bénéfice sur les concentrations en IgG

anti-RBD dans notre étude. Enfin, le pouvoir neutralisant des anticorps à M11-13 était étroitement corrélé aux titres en IgG anti-RBD, et plus élevé contre la souche sauvage et le variant alpha que contre le variant beta. Ce dernier n'était que faiblement ou non neutralisé à un an de l'infection (médiane de $1,5 \log_{10}$ IC50), tandis que la vaccination des sujets convalescents a permis d'atteindre des titres neutralisants du variant beta d'au moins $2,5 \log_{10}$ IC50 chez tous les participants.

C. Article n°2

Evolution of antibody responses up to 13 months after SARS-CoV-2 infection and risk of reinfection.

Floriane Gallais, Pierre Gantner, Timothée Bruel, Aurélie Velay, Delphine Planas, Marie-Josée Wendling, Sophie Bayer, Morgane Solis, Elodie Laugel, Nathalie Reix, Anne Schneider, Ludovic Glady, Baptiste Panaget, Nicolas Collongues, Marialuisa Partisani, Jean-Marc Lessinger, Arnaud Fontanet, David Rey, Yves Hansmann, Laurence Kling-Pillitteri, Olivier Schwartz, Jérôme De Sèze, Nicolas Meyer, Maria Gonzalez, Catherine Schmidt-Mutter, Samira Fafi-Kremer.

EBioMedicine, 2021 Sep;71:103561.



Contents lists available at ScienceDirect

EBioMedicine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ebiom

Research paper

Evolution of antibody responses up to 13 months after SARS-CoV-2 infection and risk of reinfection



Floriane Gallais^{a,b}, Pierre Gantner^{a,b}, Timothée Bruel^{c,d,e}, Aurélie Velay^{a,b}, Delphine Planas^{c,d,e}, Marie-Josée Wendling^a, Sophie Bayer^f, Morgane Solis^{a,b}, Elodie Laugel^{a,b}, Nathalie Reix^f, Anne Schneider^g, Ludovic Glady^f, Baptiste Panaget^{a,b}, Nicolas Collongues^h, Marialuisa Partisaniⁱ, Jean-Marc Lessinger^f, Arnaud Fontanet^{j,k}, David Reyⁱ, Yves Hansmann^l, Laurence Kling-Pillitteri^m, Olivier Schwartz^{c,d,e}, Jérôme De Sèze^h, Nicolas Meyerⁿ, Maria Gonzalez^m, Catherine Schmidt-Mutter^h, Samira Fafi-Kremer^{a,b,*}

^a CHU de Strasbourg, Laboratoire de Virologie, Strasbourg F-67091, France^b Strasbourg University, INSERM, IRM UMR-S 1109, Strasbourg F-67000, France^c Virus and Immunity Unit, Department of Virology, Institut Pasteur, Paris, France^d CNRS UMR Paris 3569, France^e Vaccine Research Institute, Creteil, France^f CHU de Strasbourg, Laboratoire de Biochimie Clinique et Biologie Moléculaire, Strasbourg F-67091, France^g CHU de Strasbourg, Département de Génétique Moléculaire du Cancer, Strasbourg F-67091, France^h CHU de Strasbourg, Center d'Investigation Clinique INSERM CIC 1434, Strasbourg F-67091, Franceⁱ CHU de Strasbourg, Trait d'Union, Strasbourg F-67091, France^j Department of Global Health, Emerging Diseases Epidemiology Unit, Institut Pasteur, Paris, France^k PACRI Unit, Conservatoire National des Arts et Métiers, Paris, France^l CHU de Strasbourg, Service des Maladies Infectieuses et Tropicales, Strasbourg F-67091, France^m CHU de Strasbourg, Service de Pathologies Professionnelles, Strasbourg F-67091, Franceⁿ CHU de Strasbourg, Service de santé Publique, GMRC, Strasbourg F-67091, France

ARTICLE INFO

Article History:

Received 2 June 2021

Revised 4 August 2021

Accepted 16 August 2021

Available online 27 August 2021

Keywords:

SARS-CoV-2

COVID-19

Immunity

Neutralizing antibodies

Reinfection

ABSTRACT

Background: Assessment of the kinetics of SARS-CoV-2 antibodies is essential in predicting risk of reinfection and durability of vaccine protection.

Methods: This is a prospective, monocentric, longitudinal, cohort clinical study. Healthcare workers (HCW) from Strasbourg University Hospital were enrolled between April 6th and May 7th, 2020 and followed up to 422 days. Serial serum samples were tested for antibodies against the Receptor Binding Domain (RBD) of the spike protein and nucleocapsid protein (N) to characterize the kinetics of SARS-CoV-2 antibodies and the incidence of reinfection. Live-neutralization assays were performed for a subset of samples before and after vaccination to analyze sensitivity to SARS-CoV-2 variants.

Findings: A total of 4290 samples from 393 convalescent COVID-19 and 916 COVID-19 negative individuals were analyzed. In convalescent individuals, SARS-CoV-2 antibodies followed a triphasic kinetic model with half-lives at month (M) 11–13 of 283 days (95% CI 231–349) for anti-N and 725 days (95% CI 623–921) for anti-RBD IgG, which stabilized at a median of 1.54 log BAU/mL (95% CI 1.42–1.67). The incidence of SARS-CoV-2 infections was 12.22 and 0.40 per 100 person-years in COVID-19-negative and COVID-19-positive HCW, respectively, indicating a relative reduction in the incidence of SARS-CoV-2 reinfection of 96.7%. Live-virus neutralization assay revealed that after one year, variants D614G and B.1.1.7, but less so B.1.351, were sensitive to anti-RBD antibodies at 1.4 log BAU/mL, while IgG ≥ 2.0 log BAU/mL strongly neutralized all three variants. These latter anti-RBD IgG titers were reached by all vaccinated HCW regardless of pre-vaccination IgG levels and type of vaccine.

Interpretation: Our study demonstrates a long-term persistence of anti-RBD antibodies that may reduce risk of reinfection. By significantly increasing cross-neutralizing antibody titers, a single-dose vaccination strengthens protection against variants.

Fun Ding: None.

© 2021 The Author(s). Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

* Corresponding author at: Institut de Virologie, 3 rue Koeberlé, Strasbourg, 67000, France.
E-mail address: samira.fafi-kremer@unistra.fr (S. Fafi-Kremer).

<https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103561>

2352-3964/© 2021 The Author(s). Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

Research in context

Evidence before this study

Data on persistence and long-term efficacy of the immune response are crucial in understanding the overall evolution of the COVID-19 pandemic and post-pandemic dynamics, especially in the era of emerging SARS-CoV-2 variants. We searched PubMed using the terms “SARS-CoV-2”, “antibody”, “kinetics”, and “one year” for relevant articles published up until June 2, 2021. We found two articles that have analyzed anti-SARS-CoV-2 antibodies one year after COVID-19, including one longitudinal study focusing on anti-spike (S) antibodies only and one on a small cohort of 52 individuals. By using terms “SARS-CoV-2” and “reinfection”, only one article reported risk of reinfection in Italy up to one year after infection. However, the observation ended before new SARS-CoV-2 variants began to spread.

Added value of this study

Our prospective longitudinal study assesses over more than one year: (i) the anti-SARS-CoV-2 antibody persistence (both against anti-RBD and anti-N) after primary infection, (ii) the neutralizing capacity of these antibodies against live virus variants of concern (iii) the influence of host factors on antibody kinetics, (iv) the impact of vaccination on humoral responses against SARS-CoV-2 variants after COVID-19, and (v) long-term risk of reinfection during SARS-CoV-2 variants spread. We found that anti-N antibodies dramatically decreased whereas anti-RBD IgG persist for up to 13 months at a level that neutralizes infectious variants D614G, B.1.1.7 but less B. 1.351 and that they decline faster in men than in women over time. We also showed that vaccination of convalescent COVID-19 increases anti-RBD IgG to a level that strongly neutralizes all three variants regardless of pre-vaccine IgG levels and vaccine type. Moreover, this study offered a unique opportunity to evaluate risk of reinfection following previous COVID-19 with a longitudinal follow-up of convalescent and seronegative individuals during the same period, which encompasses the three COVID-19 waves experienced in France. Analysis of clinical and virological data revealed that the risk of reinfection was reduced by 96.7% over one year. Finally, this study revealed a strong correlation between the levels of anti-RBD IgG measured by a commercial quantitative test and the titers measured by live-virus neutralization.

Implications of all the available evidence

In conclusion, our study provides crucial information on the persistence of circulating antibodies against SARS-CoV-2 more than one year after COVID-19, and on the long-term risk of reinfection. By increasing the levels of cross-neutralizing antibodies, SARS-CoV-2 vaccination may strengthen protection, especially against variants harboring antibody escape mutations like B1.351. The strong correlation of antibody levels and their neutralizing capacity against variants may be of great help for the interpretation of serological results and for the future determination of a protective anti-RBD IgG level.

1. Introduction

Since the beginning of the pandemic, the hypothesis of waning humoral immunity in coronavirus disease 2019 (COVID-19) convalescent patients has raised many concerns about the reliability of population-based seroprevalence studies, and more critically about

long-term antibody protection against reinfection and, by extension, the durability of vaccine protection. COVID-19 leads to the development of protective neutralizing antibodies in the vast majority of cases [1–4]. Several reports suggested a rapid decline of SARS-CoV-2 antibodies as early as 3 months after infection [3,5], while others reported persistence of antibody responses for up to eight months [4,6,7]. A recent rigorous study investigating T and B cell responses in convalescent COVID-19 patients reported that substantial immune memory is generated after COVID-19, and that 95% of subjects retained immune memory around 6 months after infection [8]. Furthermore, the presence of SARS-CoV-2 anti-spike (S) and anti-nucleocapsid (N) IgG antibodies were associated with a reduced risk of SARS-CoV-2 reinfection up to 7 months after initial infection [9–11]. The recent emergence of SARS-CoV-2 variants with high transmissibility such as variant B.1.1.7, or decreased susceptibility to antibodies such as variant B.1.351, has raised the question of whether antibodies still protect against reinfection [12]. Data on persistence and long-term efficacy of the immune response are therefore of vital importance in understanding the overall evolution of the pandemic and post-pandemic dynamics, especially in the era of emerging variants [13–16].

Here, using validated serological assays [17–19] on a large cohort of healthcare workers (HCW) who have recovered from COVID-19, we described the dynamics of SARS-CoV-2 humoral response up to one year after infection, and analyzed the incidence of reinfection within this period. Secondly, we used the S-Fuse live-virus neutralization assay [20], to assess the sensitivity of infectious SARS-CoV-2 variants to HCW sera before and after vaccination, several months after primary infection.

2. Methods

2.1. Study design and participants

This is a prospective, monocentric, longitudinal, cohort clinical study (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04441684). A total of 1,496 HCW recruited among all Strasbourg University Hospital staff were initially screened by SARS-CoV-2 serology between 6th April and 7th May 2020 in our institution. All participants with a COVID-19 history, proven either by serology at screening or by a previous RT-PCR, were recruited as COVID-19 positive HCW. They were followed at month (M)3–6, M7–9 and/or M11–13 after infection. In parallel, participants displaying negative serology without a history of positive RT-PCR for SARS-CoV-2 were recruited as COVID-19 negative HCW to evaluate the incidence of infection, and were followed by the same visit schedule as the COVID-19 positive cohort. HCW without follow-up were excluded from the study. Participants completed a questionnaire at each visit in reference to sociodemographic characteristics, COVID-19 exposure, symptoms, virological findings and eventually vaccination. The investigators were not blinded to allocation during experiments and outcome assessment. However, different teams performed the clinical sampling, biological measurement and data analysis. Only the final assembly of the data revealed a global view of the results.

2.2. RT-PCR assay

RT-PCR for SARS-CoV-2 RNA detection was previously performed on nasopharyngeal swab samples at the time of diagnosis. All except six RT-PCR positive samples were analyzed in our laboratory with SARS-CoV-2 specific primers and probes targeting two regions on the viral RNA-dependent RNA polymerase (*RdRp*) gene (Institut Pasteur, Paris, France; WHO technical guidance). Ct values obtained in each sample were considered for statistical analyses.

2.3. Serological assays

Screening assays: All sera were initially screened for SARS-CoV-2 antibodies using the Biosynex® (COVID-19 BSS IgG/IgM) Lateral Flow Assay (LFA), and the EDI™ Novel coronavirus COVID-19 IgG ELISA. These assays were the only ones available in sufficient quantities in our laboratory when we started the study in April 6th, 2020. The LFA detects separately IgM and IgG directed against the Receptor Binding Domain (RBD) of the SARS-CoV-2 S protein, with estimated overall sensitivity and specificity of 96 and 99% at 22 days since symptoms onset (DSO), respectively [18]. The ELISA detects anti-N IgG at 22 DSO [18], which, in our hands, displayed a sensitivity of 81% and a specificity of 96%. The results rely on a ratio of specimen absorbance reported to the cut off (S/CO) value defined by the manufacturer.

2.4. Confirmation assay

All sera that screened positive or were associated with a history of positive SARS-CoV-2 RT-PCR were analyzed retrospectively with the Abbott Architect SARS-CoV-2 IgG II Quant assay (Abbott, Sligo, Ireland), if possible given the remaining volume of serum. This allowed to confirm positive serological status and to measure the anti-RBD IgG titer. Results in Arbitrary Units (AU)/mL specific of this assay were converted into Binding Antibody Units (BAU)/mL adapted to the WHO standard for SARS-CoV-2 immunoglobulin by multiplying them by the factor 0.142. This assay is an automated chemiluminescence microparticle immunoassay (CMIA) that quantifies anti-RBD IgG, with 7.1 BAU/mL (50 AU/mL) as a positive cut-off and 5,680 BAU/mL (40,000 AU/mL) as an upper threshold of quantification (11,360 BAU/mL at 1:2 dilution). According to the manufacturer, this CMIA displays clinical sensitivity and specificity of 98.81 and 99.55% at 15 DSO, respectively. According to the manufacturer, antibody titers measured by this assay correlate, with a high probability (>95%), to neutralizing antibody titers assessed by plaque reduction assay on SARS-CoV-2 reference strain. This correlation was confirmed by previous studies [17,21].

2.5. S-Fuse live-virus neutralization assay

A neutralization assay was performed on sera collected at M11-13 from a panel of 28 COVID-19 positive HCW, including 13 who had received a single dose of COVID-19 vaccine. Live-virus neutralization was analyzed using the S-Fuse reporter cells, as previously reported [20]. Briefly, S-Fuse reporter cells correspond to U2OS cells (ATCC Cat# HTB-96, RRID: CVCL_0042) engineered to express ACE2 and either GFP1-10 or GFP11. When mixed, these cells produce GFP upon syncytia formation which occurs during productive infection with SARS-CoV-2. Neutralization of infectious D614G, B.1.1.7, and B.1.351 variants grown in Vero E6 cell lines (ATCC Cat# CRL-1586, RRID: CVCL_0574) was assessed for each serum using limiting dilutions. Infection was quantified by measuring the number of GFP+ syncytia 18 h after infection. The percentage of neutralization was calculated using the number of syncytia as the value with the following formula: $(1 - \frac{(X_{serum} - X_{non-infected})}{(X_{control} - X_{non-infected})}) \times 100\%$. Neutralizing activity of each serum was expressed as the half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀).

2.6. Statistics

Chi-squared test, Kruskal-Wallis rank sum test and Fisher's exact test were conducted to identify any significant changes in categorical variables over time and between groups. Non-parametric Wilcoxon paired tests and Mann-Whitney tests were conducted to compare quantitative data over time or between groups, respectively. All tests were two-sided with an α level of 0.05. Missing data were excluded for analysis. Anti-RBD (log-transformed) and anti-N IgG titers over

time were modelled, with the best fitting model assessed by an F Test, selecting the simplest model between simple linear regression, one-, two-, or three-phase decays of log data in the two settings. The half-life ($t_{1/2}$) of each decay phase was also calculated.

To assess characteristics of patients with a faster/slower decay in anti-RBD and anti-N IgG titers, non-parametric tests were used for univariable analyses (Wilcoxon and Fisher's exact tests). Variables included in the univariable analysis were as follows: age, sex, BMI, blood group, Rhesus, SARS-CoV-2 RT-qPCR Ct, COVID-19 symptoms, DSO, hospitalization, anti-RBD or anti-N IgG titers at M3-6. Variables achieving a p value <0.17 in the univariable analysis were entered into a multivariable linear regression model (with a backward stepwise method based on the likelihood ratio test) [22]. Multivariable analyses were performed with R software version 4.0.3 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Factor effects in multivariable linear regression are given with a 95% CI. A quality control of the models was performed: the linearity assumption and the quality of the variance of the dependent variable over the full range of values of the independent variable were assessed with scatter plots and the assumption that the dependent variable is normally distributed was assessed with a normal probability plot (data not shown). All other data were analyzed and represented using Graphpad Prism version 9.0.0.

We used the Kaplan–Meier method to estimate the cumulative probability of SARS-CoV-2 infection or reinfection per group (COVID-19 negative or COVID-19 positive, respectively) and used the log-rank test to perform between-group comparisons. Time of exposure begins from the first negative serology for the COVID-19 negative HCW and from two months after initial SARS-CoV-2 infection (date of first symptoms, positive RT-PCR, or first positive serology) for the COVID-19 positive group, as described previously [11]. SARS-CoV-2 infection/reinfection was documented by RT-PCR or serological testing among COVID-19 negative and positive HCW, respectively. A sensitivity analysis was performed considering RT-PCR positive HCW only to verify that the reinfection rate was different than infection rate. Vaccinated individuals were censored at the time of the first vaccine dose. We also calculated the incidence of SARS-CoV-2 infection/reinfection per month, according to at-risk days during the follow-up of COVID-19 positive and COVID-19 negative individuals.

2.7. Ethics

This analysis was conducted on data from an on-going prospective, monocentric, longitudinal, cohort study enrolling healthcare workers from Strasbourg University Hospital (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04441684). All participants received written information about the study and were asked to give written informed consent for participation. The protocol was approved by the institutional review board of CPP Sud Méditerranée III (Ref: 2020.04.15 bis_20.04.10.66856).

2.8. Role of the funding source

The funders had no role in study design, data collection, data analysis, data interpretation, or writing of the report. The corresponding author had full access to all the data in the study and had final responsibility for the decision to submit for publication.

3. Results

3.1. Cohort characteristics

This study involved 4290 samples from 1309 HCW, including 393 convalescent COVID-19 (here called COVID-19 positive) HCW and 916 COVID-19 negative HCW (Fig. 1). The COVID-19 positive HCW included 345 with a history of positive SARS-CoV-2 RT-PCR and 48

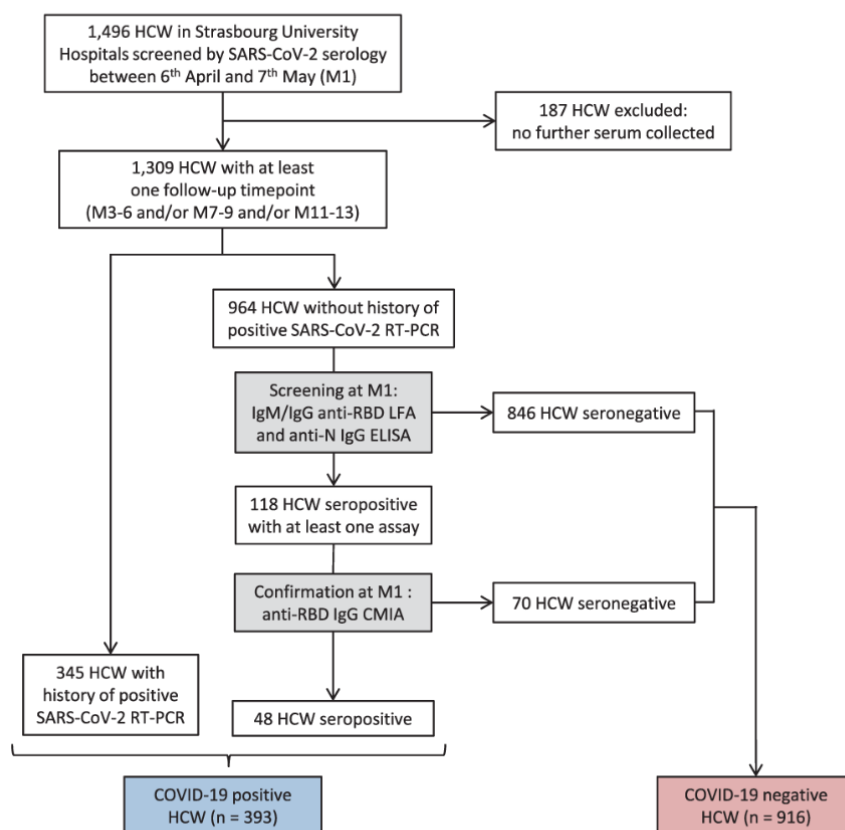


Fig. 1. Flow chart of survey recruitment and serum sampling among the healthcare workers (HCW) at Strasbourg University Hospital. First line serological screening was performed using two commercial assays: the Biosynex® (COVID-19 BSS IgG/IgM) Lateral Flow Assay (LFA) detecting anti-Receptor Binding Domain (RBD) antibodies and the EDI™ Novel coronavirus COVID-19 IgG ELISA detecting the anti-nucleocapsid protein (N) IgG. A third assay, the Abbott SARS-CoV-2 IgG II Quant assay, measuring the anti-RBD IgG, was used to confirm seropositive samples. Serological testing on the first serum sample of each participant between 6 April and 7 May 2020 (M1) and on further sera collected at M3-6, M7-9, and M11-13 led to the establishment of two separate cohorts of COVID-19 positive or negative HCW, both with serological follow-up. Anti-RBD: anti-Receptor Binding Domain; Anti-N: anti-nucleocapsid protein; CMIA: chemiluminescent microparticle immunoassay; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; HCW: healthcare workers; LFA: lateral flow assay; RT-PCR: real-time reverse transcriptase PCR.

with positive serology only. Both COVID-19 positive and COVID-19 negative cohorts included various professional groups (nurses, doctors, caregivers and administrative staff), both with a median age of 39 (Interquartile Range (IQR) 30–51 and 30–50, respectively), and a predominance of females (76.8 and 78.5%). In COVID-19 positive HCW, a history of contact with a COVID-19 case was reported in 66% of participants. COVID-19 consistent symptoms were reported by 383 participants (97.5%), including 367 (93.4%) and 16 (4.1%) with mild or moderate disease, respectively (Table 1). Ten participants were asymptomatic. No severe cases were reported. The first serum sample collected from the 383 symptomatic COVID-19 positive participants during the screening step corresponds to a median of 31 DSO (IQR: 24–38) and was considered as M1. Since the pandemic started about a month before our study, the first serum sample from the ten asymptomatic individuals was also arbitrarily considered as M1. A total of 383 were sampled at M3-6 (median: 107 DSO; IQR: 92–131), 346 at M7-9 (median: 215 DSO; IQR: 195–243) and lastly 233 at M11-13 (median: 373 DSO; IQR: 347–396), of which 93 were vaccinated against SARS-CoV-2 before M11-13 sampling. Only one asymptomatic reinfection was reported after nine months in this cohort. Conversely, among the 916 COVID-19 negative HCW, 69 (7.5%) reported a SARS-CoV-2 infection including 49 with symptoms (8 before M3-6, 29 before M7-9 and 32 before M11-13). This was

confirmed by a positive RT-PCR test and by seroconversion in 62% and 100% of these cases, respectively.

3.2. Natural history of humoral response up to one year after COVID-19

Using LFA, 91.3 and 83.7% of COVID-19 positive HCW were tested positive at M1 for anti-RBD IgM and IgG, respectively, versus 51.8% IgM and 56.8% IgG at M11-13, showing a significant decrease in the rates of LFA-detected antibodies one year after COVID-19 (both $p < 0.0001$). Using CMIA, 97.1% of individuals were tested positive both at M1 and M11-13 ($p = 0.76$). Positivity rates of anti-N IgG response as measured by ELISA significantly decreased from M1 (85.0%) to M11-13 (20.1%) ($p < 0.0001$).

Anti-RBD titers assessed by CMIA significantly decayed by 0.07, 0.04 and 0.02 log BAU/mL per month from M1 to M3-6, M3-6 to M7-9 and M7-9 to M11-13, respectively (all $p < 0.01$) (Fig. 2b, c). The estimated half-life ($t_{1/2}$) of each phase was of 202 (95% CI 170–234), 306 (95% CI 292–368) and 725 (95% CI 623–921) days, respectively. At M11-13, the median titer of anti-RBD IgG was 1.54 log BAU/mL (95% CI 1.42–1.67), with 60.0% of participants showing IgG > 1.4 log BAU/mL.

Next, we investigated the effect of age, sex, body mass index (BMI), blood group, rhesus status, DSO, COVID-19 symptoms, hospitalization, and initial Ct values obtained by real-time reverse

Table 1
Characteristics of the 393 COVID-19 positive healthcare workers.

	Total	Females	Males	p value
Number of COVID-19 positive HCW	393	302	91	NA
Age (years), median (IQR)	39.0 (29.6–50.5)	40.0 (30.1–51.1)	34.3 (28.6–44.6)	0.0965
BMI (kg/m ²), median (IQR)	23.6 (21.3–26.9)	23.6 (21.0–27.8)	24.0 (21.9–25.6)	0.8157
Blood group				
A, n (%)	162 (41.2)	125 (41.4)	37 (40.7)	0.2112
B, n (%)	33 (8.4)	23 (7.6)	10 (11.0)	
AB, n (%)	16 (4.1)	14 (4.6)	2 (2.2)	
O, n (%)	129 (32.8)	108 (35.8)	21 (23.1)	
Rhesus negative, n (%)	60 (15.3)	50 (16.6)	10 (11.0)	0.2448
Unknown, n (%)	53 (13.5)	32 (10.6)	21 (23.1)	0.0045
COVID-19 history				
Contact with COVID-19 case, n (%)	259 (65.9)	200 (66.2)	59 (64.8)	0.8021
Previous positive SARS-CoV-2 RT-PCR, n (%)	345 (87.8)	263 (87.1)	82 (90.1)	0.5837
COVID-19 symptoms, n (%)	383 (97.4)	294 (97.4)	89 (97.8)	1.0
Known date of symptoms onset, n (%)	378 (96.2)	289 (95.7)	89 (97.8)	0.5359
Hospitalization, n (%)	16 (4.1)	10 (3.3)	6 (6.6)	0.2211
Serum collection				
HCW sampled at M1, n (%)	393 (100)	302 (100)	91 (100)	0.8042
HCW sampled at M3–6, n (%)	383 (97.5)	294 (97.4)	89 (97.8)	
HCW sampled at M7–9, n (%)	346 (88.0)	275 (91.1)	71 (78.0)	
HCW sampled at M11–13, n (%)	233 (59.3)	181 (59.9)	52 (57.1)	
Time from symptom onset to serum collection				
M1 (days), median (IQR; range)	31 (24–38; 6–58)	32 (24–38; 6–53)	29 (24–37; 13–58)	0.2087
M3–6 (days), median (IQR; range)	107 (92–131; 78–172)	107.5 (92.3–131; 78–172)	105 (90–130; 78–164)	0.6583
M7–9 (days), median (IQR; range)	215 (195–243; 161–284)	217 (196–246; 161–284)	210 (194–237; 169–281)	0.3388
M11–13 (days), median (IQR; range)	373 (347–396; 321–422)	369 (346–396; 321–421)	384 (348–396; 332–422)	0.2053
Vaccination				
Single-dose vaccination between M7–9 and M11–13, n (% of M11–13)	59 (25.3)	43 (23.8)	16 (30.8)	0.3655
Double dose vaccination between M7–9 and M11–13, n (% of M11–13)	34 (14.6)	27 (14.9)	7 (13.5)	1.0

BMI: body mass index; HCW: Healthcare workers; IQR: Interquartile range; NA: not applicable; NS: not significant; RT-PCR: Real-time reverse transcriptase PCR. *P* values were calculated with Mann-Whitney, Chi-square and Fisher exact tests using the Graphpad Prism version 9.0.0 software.

transcriptase PCR (RT-PCR) in nasal swabs, on CMIA anti-RBD IgG titers at M7–9 and on decay speed between M3–6 and M7–9 by univariable (Supplementary Table 1) and multivariable analyses. No significant difference in the absolute values of anti-RBD IgG titers was found in univariable analysis according to sex. However, antibody titers declined faster in men in univariable analysis between M3–6 and M7–9. By multivariable analysis (Fig. 2d), anti-RBD IgG titers also decayed faster in men than in women with an acceleration in this decrease of a median of -0.033 log BAU/mL per month (95% confidence interval (95%CI): -0.053 to -0.014 ; $p = 0.0008$). Another factor significantly associated with faster decay was the rhesus-negative (Rh-) status, affecting decay by a factor of -0.021 log BAU/mL per month (95% CI: -0.002 to -0.040 ; $p = 0.0008$). Notably, no significant effect of age, BMI, blood group, DSO or initial Ct values on the anti-RBD titer slope was observed (Fig. 2d).

As shown in Fig. 2e, triphasic kinetic dynamics of anti-N IgG ratio over time was observed, with an initial steep decay between M1 and M3–6 (median: -0.26 S/CO per month), followed by a slower decay up to M7–9 (-0.02) before a second drop up to M11–13 (-0.05 ; all $p < 0.0001$) (Fig. 2f). The $t_{1/2}$ of each phase was therefore 58 (95% CI 51–66), 682 (95% CI 417–2500) and 283 (95% CI 231–349) days, respectively. In univariable analysis, higher antibody ratios were found in men at M7–9 compared to women (Supplementary Table 1). Moreover, a slower decay from M3–6 to M7–9 was revealed by multivariable analysis in men (0.046 S/CO per month; 95% CI 0.007–0.087; $p = 0.02$) and in older participants (0.017 per 10-year age; 95% CI 0.002–0.032; $p = 0.03$) (Fig. 2g). Thus, male participants displayed a faster decay of anti-RBD antibodies and, conversely, a slower decay of anti-N antibodies.

We then assessed the relative incidence of SARS-CoV-2 infection in COVID-19 positive and COVID-19 negative HCW during follow-up. Overall, 70 SARS-CoV-2 infections developed after enrollment: one RT-PCR proven reinfection in the COVID-19 positive group (incidence of 0.40 per 100 person-years) and 69 seroconversions in the COVID-19 negative group (incidence of 12.22 per 100 person-years),

indicating a relative reduction in the incidence of SARS-CoV-2 reinfection in the previously infected group of 96.7% (hazard ratio (HR): 4.053 (95% CI: 2.437–6.743); $p < 0.0001$, Fig. 3a, b). To verify that the reinfection rate was different than infection rate, we also performed a sensitivity analysis focusing on RT-PCR tests only. Thus 43 infected participants in the COVID-19 negative group and one reinfecting in the COVID-19 positive were taken into account, still providing a HR of 3.966 (95%CI: 2.099–7.494; $p < 0.0001$). The only case of reinfection occurred in a 23 year old female medical student. She first developed a symptomatic, mild COVID-19 in March 2020 with a high viral load, identified by nasopharyngeal swab (Ct=17), leading to an anti-RBD and anti-N IgG seroconversion (1.8 log BAU/mL and 1.0 OD S/CO after 96 DSO, respectively). The second episode in January 2021 was asymptomatic and revealed by a low viral load (Ct=34), detected six days after non-professional COVID-19 exposure. The reinfection case showed a positive anti-RBD IgM and a concomitant rebound of anti-RBD and anti-N IgG ($+1.0$ log BAU/mL and $+0.7$ S/Co, respectively) without vaccination, 22 days after a second positive RT-PCR. Since no systematic RT-PCR test was performed during follow-up, we examined whether other convalescent HCWs had an increase of anti-RBD and anti-N titers of at least $+0.5$ log BAU/mL and $+0.5$ S/Co, respectively. Only one HCW showed such increase of anti-N titer ($+0.7$ S/Co) but stable anti-RBD titer between M3–6 and M7–9. This HCW subsequently showed a decrease of anti-N titer (-1.1 S/Co) and an increase of anti-RBD titer ($+0.6$ log BAU/mL) between M7–9 and M11–13. This case was not considered here as a reinfection. Altogether, our findings indicate that although anti-SARS-CoV-2 antibody titers decline, the risk of reinfection within a year post-infection remains low.

3.3. Impact of SARS-CoV-2 vaccination on humoral response in COVID-19 positive HCW

To investigate how SARS-CoV-2 antibodies evolve after COVID-19 vaccination in COVID-19 positive HCW, serological results of the 93 COVID-19 positive HCW who received at least one dose of vaccine

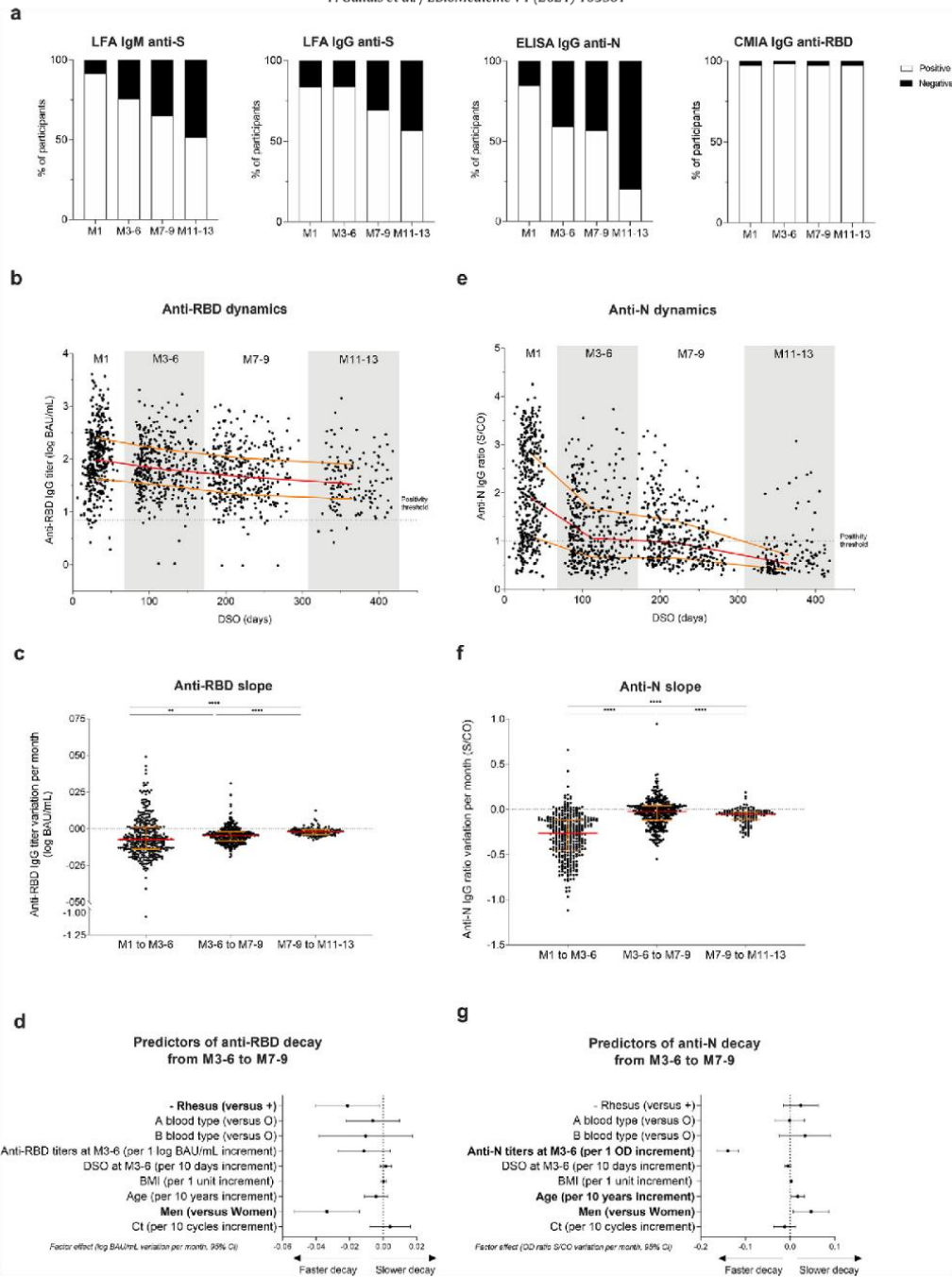


Fig. 2. Dynamics and determinants of SARS-CoV-2 humoral responses after COVID-19. (a) SARS-CoV-2 seropositive rate over time among participants (M1 ($n = 393$), M3-6 ($n = 383$), M7-9 ($n = 346$), M11-13 ($n = 139$)) according to the serological assays. (b) Dynamics of anti-RBD IgG titers expressed in log BAU/mL over time among HCW with known first date of symptoms (M1 ($n = 369$), M3-6 ($n = 369$), M7-9 ($n = 332$), M11-13 ($n = 137$)). (c) Variation of anti-RBD IgG titers per month expressed in log BAU/mL between each time point (M1 to M3-6 ($n = 374$), M3-6 to M7-9 ($n = 337$), M7-9 to M11-13 ($n = 128$)). (d) Associations between anti-RBD IgG titers decay between M3-6 to M7-9 in log BAU/mL per month and demographic, biological, and virological data, and time of sampling at M3-6 expressed in days post symptoms onset (DSO) ($n = 337$). (e) Dynamics of anti-N IgG expressed in ratio optical density (OD) signal/Cut-Off (S/CO) over time among HCW with known first date of symptoms (M1 ($n = 378$), M3-6 ($n = 369$), M7-9 ($n = 332$), M11-13 ($n = 137$)). (f) Anti-N IgG ratios variation per month expressed in ratio OD Sample/CO between each timepoint (M1 to M3-6 ($n = 383$), M3-6 to M7-9 ($n = 337$), M7-9 to M11-13 ($n = 128$)). (g) Associations between anti-N IgG ratio decay between M3-6 to M7-9 in S/CO per month and demographic, biological, and virological data, and time of serum sampling at M3-6. (b, c, e, and f) Red lines represent median values and yellow lines the interquartile range for each population. * p value < 0.05; ** p value < 0.01; *** p value < 0.001; **** p value < 0.0001; calculated with non-parametric Wilcoxon paired tests using the Graphpad Prism version 9.0.0 software. (d, g) Data are depicted as factor effects in multivariable linear regression, with a 95% confidence interval given (95% CI). Multivariable analyses were performed with R software version 4.0.3 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

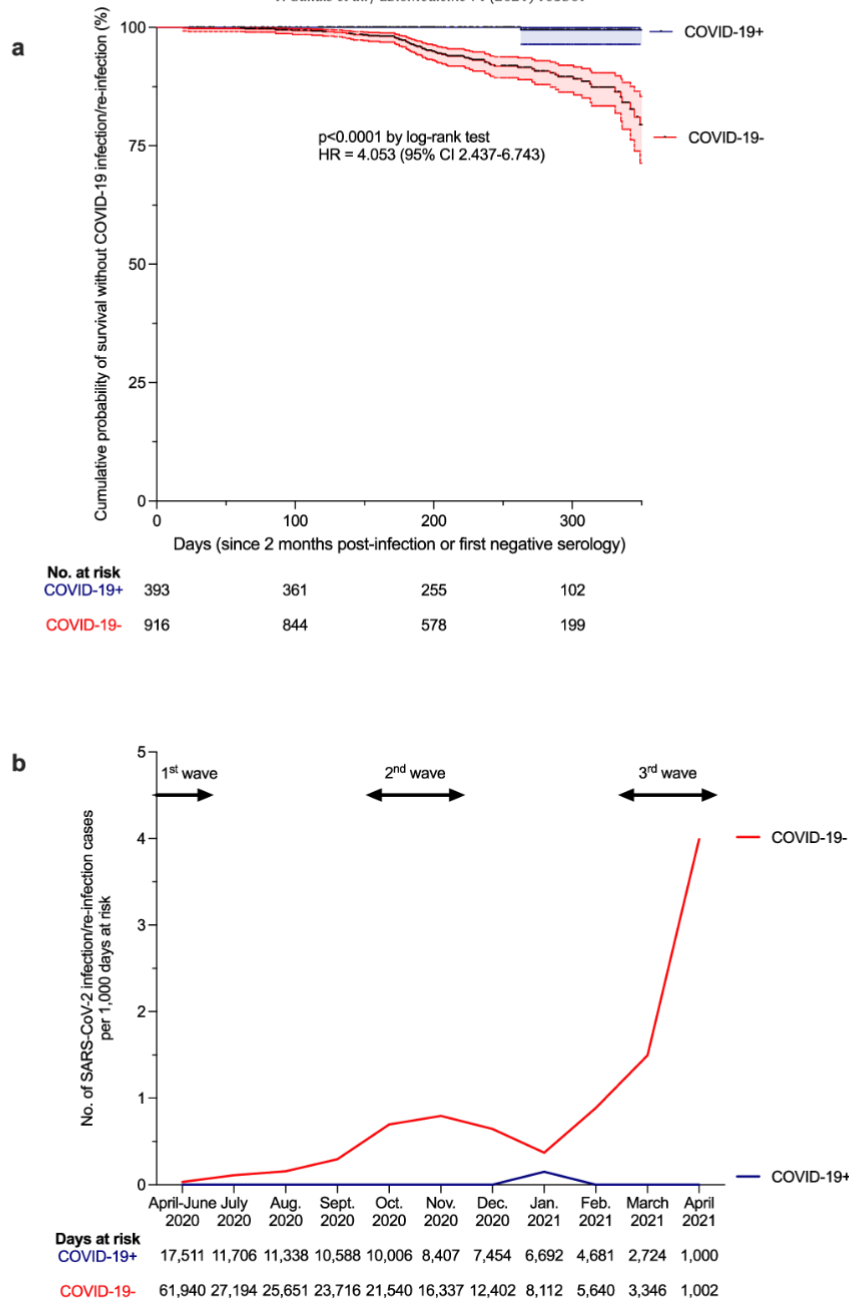


Fig. 3. The risk of reinfection after a first COVID-19 episode. (a) Kaplan-Meier estimates of the probability of SARS-CoV-2 infection protection. The cumulative probabilities of remaining free of SARS-CoV-2 infection among COVID-19 negative (COVID-19-) participants (red curve) and reinfection among former COVID-19 positive (COVID-19+) participants (blue curve) are shown at one year of follow-up (with 95% confidence interval (95%CI), dotted lines). The number of exposed participants is defined under the x axis. Comparison of survival curves was performed using log-rank test. A hazard ratio (HR) with 95% CI of reinfection in the COVID-19 positive group versus infection in the COVID-19 negative group was also calculated. (b) Calculated incidence of SARS-CoV-2 infection/reinfection per month, according to at-risk days during the follow-up of COVID-19+ (blue curve) and COVID-19- (red curve) individuals. Data are represented according to calendar months to allow comparison with national epidemic dynamics (epidemic waves depicted at the top of the graph with arrows). The number of at-risk days is shown under the x axis. (a, b) Exposure starts at the first negative serology for the COVID-19- group and at two months after initial SARS-CoV-2 infection for the COVID-19+ group. SARS-CoV-2 infection/reinfection was assessed either by RT-PCR or/and serology. To verify that the reinfection rate was different than infection rate, we performed a sensitivity analysis focusing on RT-PCR tests only. Thus 43 infected participants in the COVID-19 negative group and one reinfected in the COVID-19 positive were taken into account, still providing a HR of 3.966 (95%CI: 2.099-7.494; $p < 0.0001$ by log-rank test). Censoring criteria were: end of follow-up and anti-SARS-CoV-2 vaccination (at the time of the first vaccine dose). Comparison and p value were computed using the Graphpad Prism version 9.0.0 software. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

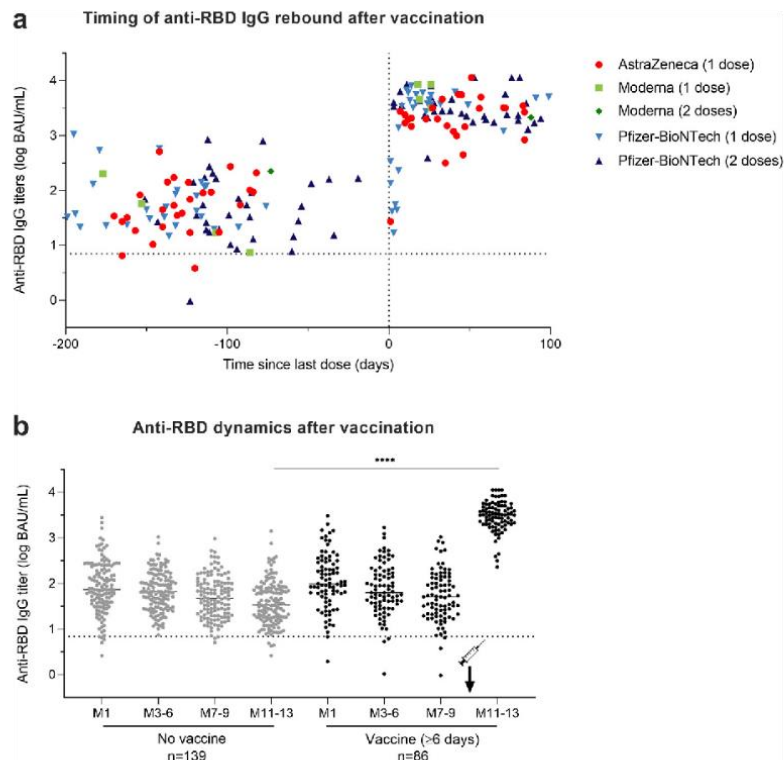


Fig. 4. Impact of SARS-CoV-2 vaccination on humoral response in COVID-19 positive HCW. (a) Timing of the rebound in anti-RBD IgG titers following vaccination among the 93 COVID-19 positive HCW who received at least one dose of vaccine against SARS-CoV-2 between M7-9 and M11-13 visits. The dotted vertical black line corresponds to the day of first injection (D0). Anti-RBD IgG titers among HCW vaccinated with one dose of AstraZeneca vaccine are depicted in red circles, with one or two doses of Moderna vaccine in light green squares and dark green diamonds, respectively, and with one or two doses of Pfizer vaccine in light blue upwards and dark blue downwards triangles, respectively. (b) Comparison of anti-RBD IgG titer dynamics over time between 139 unvaccinated HCW in grey dots and 86 HCW vaccinated for at least six days in black dots. * p value < 0.05; ** p value < 0.01; *** p value < 0.001, **** p value < 0.0001; calculated with non-parametric Wilcoxon paired tests and Mann-Whitney tests using the Graphpad Prism version 9.0.0 software. The dotted horizontal black line corresponds to the anti-RBD IgG titer positivity threshold. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

between M7-9 and M11-13 visits were compared to those of the 139 unvaccinated participants with a M11-13 follow-up. Among vaccinated-participants, 59 received a single-dose from 1 to 99 days before M11-13 sampling, including 27 HCW vaccinated with ChAdOx1 nCoV-19 vaccine (AstraZeneca), 4 with mRNA-1273 vaccine (Moderna) and 28 with BNT162b2 vaccine (Pfizer-BioNTech). The 34 other participants received two doses of BNT162b2 vaccine ($n = 33$) or mRNA-1273 vaccine ($n = 1$) and their M11-13 sera were collected from 3 to 94 days after the second dose of vaccine.

Five out of the seven participants sampled earlier than 6 days after a single dose vaccination still displayed anti-RBD antibody titers < 2.0 log BAU/mL at M11-13 (Fig. 4a). Conversely, a rebound of anti-RBD IgG titers was observed in all the 86 samples collected at least 6 days after vaccination with a median increase of 1.80 log BAU/mL between M7-9 and M11-13 (IQR, 1.38 to 2.17; $p < 0.0001$). Indeed, post-vaccination titers reached at least double the values measured at M1 post-infection for 98% of vaccinated HCW. Antibody titers > 3.0 log BAU/mL were found at M11-13 in 80 of these 86 vaccinated HCW (93.0%) (Fig. 4a, b).

3.4. Sensitivity of infectious SARS-CoV-2 variants to anti-S antibodies at M11-13

To assess whether SARS-CoV-2 variants are sensitive to anti-S antibodies that persist at M11-13 with or without prior vaccination, sera collected at M11-13 from 28 COVID-19 positive HCW (13

vaccinated and 15 unvaccinated) were analyzed with the S-Fuse live-virus neutralization assay [20] (Fig. 5a). The 13 vaccinated HCW had received a single dose, including eight with ChAdOx1 nCoV-19 vaccine (AstraZeneca), three with BNT162b2 vaccine (Pfizer-BioNTech) and two with mRNA-1273 vaccine (Moderna). Sera collected from unvaccinated participants showed median neutralizing antibody titers of 2.31 log IC₅₀ (IQR: 2.03–2.76), 2.10 log IC₅₀ (IQR: 1.76–2.45) and 1.51 log IC₅₀ (IQR: 1.48–1.87) against D614G, B.1.1.7 and B.1.351 live-strains, respectively. Sera from vaccinated participants showed a median neutralizing antibody titer of 4.01 log IC₅₀ (IQR: 3.88–4.35), 4.03 log IC₅₀ (IQR: 3.85–4.23) and 3.14 log IC₅₀ (IQR: 2.99–3.58) against the same viral strains, respectively (Fig. 5b). Strong correlation was observed at M11-13 between neutralizing antibody titers assessed by S-Fuse neutralization assay and anti-RBD IgG titers measured by CMIA with Spearman correlation coefficients of 0.967, 0.968 and 0.944 for variants D614G, B.1.1.7, and B.1.351, respectively (p values < 0.0001) (Fig. 5c). Anti-RBD titers around 1.4 log BAU/mL neutralized D614G, B.1.1.7 but not B.1.351 variants at more than 2.0 log IC₅₀. Anti-RBD IgG titers > 2.0 log BAU/mL neutralized D614G, B.1.1.7 at > 2.5 log IC₅₀, and B.1.351 at ≥ 2.0 log IC₅₀. These latter anti-RBD IgG titers were reached by all HCW vaccinated at least six days before regardless of pre-vaccination anti-RBD IgG titer, type of vaccine or number of vaccine doses. Based on the strong correlation between CMIA and neutralization assays, neutralizing titers were extrapolated to the remaining 124 unvaccinated HCW and the 73 single-dose or double-dose vaccinated HCW (those with serum collected at least

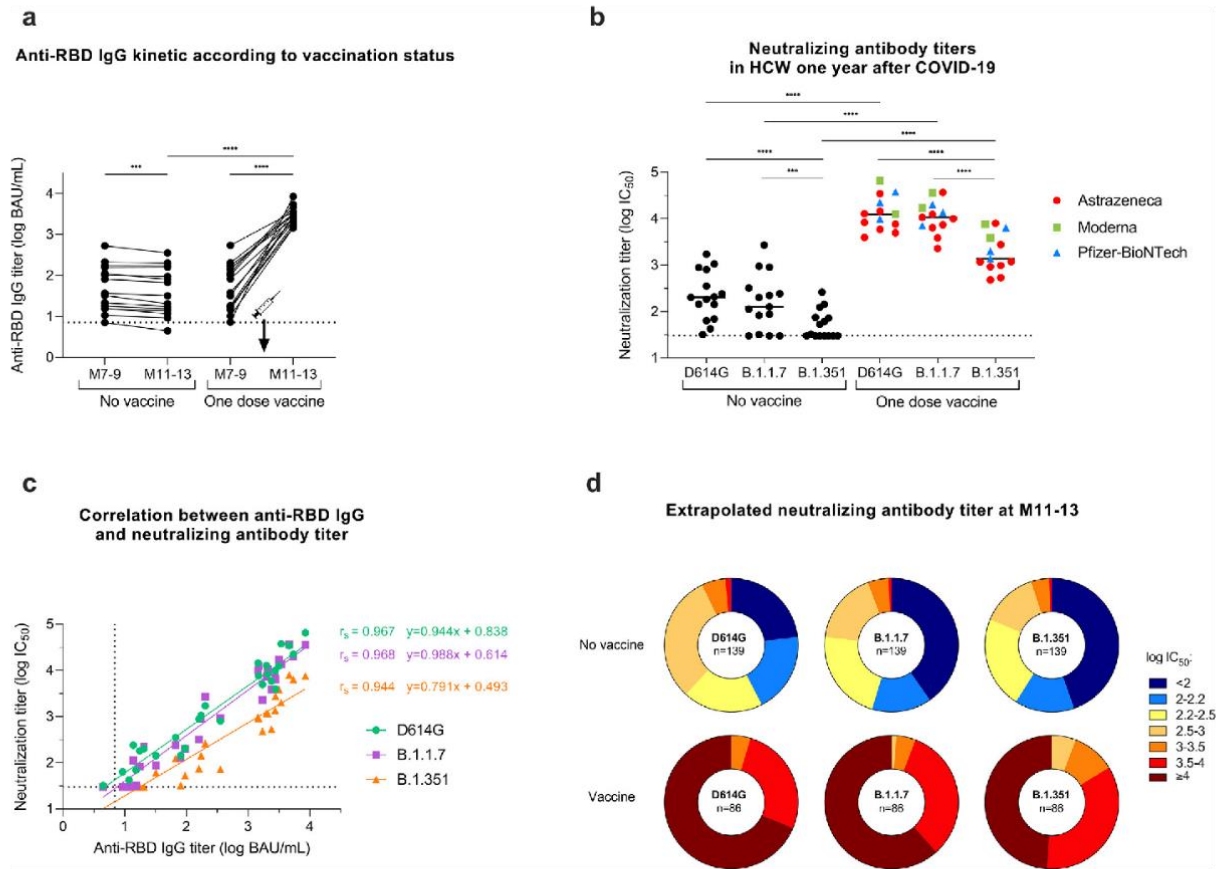


Fig. 5. Neutralization efficiency after single-dose vaccination among the COVID-19 positive HCW. Neutralizing antibody titers against live-strains of D614G, B.1.1.7, and B.1.351 variants of SARS-CoV-2 were measured in sera collected at M11-13 for 13 single-dose vaccinated HCW and 15 unvaccinated HCW. (a) Anti-RBD IgG (log BAU/mL) kinetics between M7-9 and M11-13 according to vaccination status. (b) Neutralizing antibody titers (log IC₅₀) against the D614G, B.1.1.7, and B.1.351 variants measured at M11-13. The dotted black line corresponds to the positivity threshold of neutralization assay. Neutralizing antibody titers measured in HCW vaccinated with one dose of AstraZeneca vaccine (red circles), Moderna vaccine (green squares) or Pfizer-BioNTech vaccine (light blue triangles). (c) Spearman correlation between anti-RBD IgG titers (log BAU/mL) and neutralizing antibody titer (log IC₅₀) against D614G (green circles), B.1.1.7 (purple squares), and B.1.351 (orange triangles) variants measured at M11-13 in vaccinated ($n = 13$) and unvaccinated ($n = 15$) HCW. The calculated correlation coefficients (r) and linear regression equations are depicted. (d) Pie charts depicting the frequency of log IC₅₀ neutralization titer categories (extrapolated from CMA anti-S titers) for all participants at M11-13 according to the viral strain and the vaccination status. The number of participants is included at the center of the pies (139 unvaccinated HCW and 86 HCW vaccinated for at least six days). * p value < 0.05; ** p value < 0.01; *** p value < 0.001, **** p value < 0.0001; calculated with non-parametric Wilcoxon paired tests or Spearman correlation. P values and correlation coefficients computed using the Graphpad Prism version 9.0.0 software. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

6 days post-vaccination) to predict the strength of neutralization at M11-13 in all participants (Fig. 5d). Altogether, our findings suggest that former COVID-19 positive individuals benefit from a single-dose vaccine and are able to strongly neutralize current SARS-CoV-2 variants.

4. Discussion

The duration and effectiveness of adaptive immunity directed against SARS-CoV-2 after primary infection are key questions in understanding the COVID-19 pandemic. The present study, involving a large cohort of HCW followed prospectively over one year, provides crucial information on the persistence of circulating SARS-CoV-2 antibodies after mild COVID-19. Serological monitoring of convalescent COVID-19 individuals up to 422 DSO shows that anti-SARS-CoV-2 antibodies directed against the S protein are well maintained over time up to more than one year, consistently with other recent studies [23–27]. These antibody titers follow a tri-phasic decay, potentially reflective of B cell turnover after infection [2]. From M7, anti-RBD

antibodies stabilize at a level that neutralizes infectious variants D614G and B.1.1.7, but less B.1.351, suggesting that most COVID-19 positive patients may be protected from reinfection by the former variants. Our hospital faced three waves of COVID-19, from March to June 2020, September 2020 – January 2021 and from March 2021 to present, with the current wave due to the B.1.1.7 variant. During the period April 2020 – April 2021, 69 new infections were reported in COVID-19 negative participants, while only one case of reinfection, which was asymptomatic, was reported in the COVID-19 positive participants. Although antibodies represent only a part of the immune response, this strongly suggests that COVID-19 positive patients develop a robust humoral immune response that reduces the risk of SARS-CoV-2 reinfection within at least one year. Interestingly, anti-RBD levels increase as early as 6 days after vaccination. This suggests that a robust memory B cell response is established in COVID-19 convalescents, including those with low antibody titers. This is in line with the study of Dan et al. who performed an extensive characterization of memory B cells, revealing that the slight antibody decline occurring in convalescent individuals does not reflect a real

waning of humoral immunity, but rather a contraction of the immune response, whilst antibody affinity maturation occurs, and anti-S memory B cells persist [8]. Recently, Wang et al. reported that memory B cell clones expressing broad and potent anti-S antibodies are selectively retained in the repertoire at least one year after infection, and expand after vaccination [28]. These observations are very hopeful for the durability of humoral responses developed after COVID-19, and suggest that protection against SARS-CoV-2 infection may last for years [28,29].

Unlike anti-RBD antibody titers that stabilize over time, we observed a steep decay of anti-N IgG titers after seven to nine months post-infection, with only 20% of COVID-19 positive HCW remaining seropositive after one year. These differences could be explained by an increased avidity or affinity that compensates antibody loss, or by changes in recognized epitopes over time [30].

We evaluated several host factors as potential predictors of antibody titers and of their kinetics up to 7–9 months after primary infection. While no differences in SARS-CoV-2 IgG titers were observed, their kinetics were influenced by sex and rhesus factor. Sex differences in the SARS-CoV-2 immune response were previously described early after infection. Takahashi and colleagues reported that female patients had more robust T cell activation than male patients in the early phase of SARS-CoV-2 infection [31]. The sex differences in immune responses may be multifactorial, notably based on sex steroid concentrations, on transcriptional factors, and on incomplete inactivation of immunoregulatory genes on the second X chromosome in females [32,33].

Our study presents some limitations. Neutralization experiments were performed on a small subset of the cohort due to insufficient volume of remaining sera. However, the strong correlation between CMIA IgG levels and neutralizing titers observed in this study, which is also reported by the manufacturer as well as by other studies [4,17,21], allows an extrapolation of the results to the entire cohort. Assessment of reinfection was based on participant reports during visits, as no RT-PCR surveillance was planned in the study. Therefore, it cannot be excluded that the COVID-19 positive participants had unnoticed asymptomatic reinfection during follow-up. However, no COVID-19 positive HCW, except the case of reinfection, had an increase of both anti-RBD and anti-N levels during follow-up. Another limitation is the unbalanced sex distribution, with a female predominance, which reflects the sex distribution of the healthcare workers in our hospital. Nevertheless, the sex difference in immune response was observed by using univariable and multivariable analysis. Furthermore, we were not able to investigate the kinetics of memory B cells because of the lack of peripheral blood mononuclear cells. Finally, our results were obtained in participants with a median age of 39 years (IQR 30–51), hence we cannot exclude that older individuals may experience a different evolution of humoral response over time.

However, taken together our data demonstrate a long-term persistence of anti-RBD IgG titers that may reduce risk of reinfection in convalescent COVID-19 patients by variants D614G and B.1.1.7. By increasing the levels of cross-neutralizing antibodies, SARS-CoV-2 vaccination may strengthen protection, especially against variants harboring antibody escape mutations like B.1.351. Future work will help to determine whether vaccine-induced antibodies evolve in the same manner, and whether their kinetics differ between the sexes.

Contributors

SFK, CSM, MG, YH and NM conceived and designed the study. CSM, JDS, NC, DR, MP AF, LKP and MG recruited participants. SB, NR, AS, LG, BP, and JML carried out LFA experiments. TB, DP and OS carried out S-Fuse neutralization experiments. FG, AV, MJW, MS and EL analyzed serological data. FG and PG performed statistical analyses.

SFK, FG and PG wrote the manuscript with substantial input from all co-authors.

Data sharing

All of the data generated or analyzed during this study are included in this published article. All data supporting the findings in this study are also available from the corresponding author upon request.

Declaration of Competing Interest

The authors have declared no potential conflicts of interest.

Acknowledgments

This work was supported by Strasbourg University Hospital (Sero-CoV-HUS; PRI 7782), the Agence Nationale de la Recherche (ANR-18-CE17-0028), Laboratoire d'Excellence TRANSPLANTE (ANR-11-LABX-0070_TRANSPLANTE), Strasbourg University and Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (UMR_S 1109). We are grateful to all of the study participants who donated blood, the team of Cellule d'Appel, Pôle des Ressources Humaines who scheduled the planning of participants, the DRCI team including Eric Demonsant, Hélène Soavelo, Caroline Bouvrais and Evelyne Acacie who prepared the IRB protocol, the ECRF and the administrative part of the protocol, the CIC Inserm 1434 team, including Alexandre Bolle who coordinated recruitment of participants and Noelle Huber, Christine Toulouse, Sophie Wohlgenuth who collected samples, the team of Service de Médecine du Travail who managed the cohort, Carole Weber, Elodie Kleiber and Corinne Renault for data management, and the technical staff of Pôle de Biologie and Laboratoire de Virologie including Anne Moncolin, Veronique Sohn, Axelle Grub, Nathalie Durand and Nadège Frey for management and distribution of samples. Manuscript edition and proofreading was provided by Dr. Kate Dunning (HUS).

Supplementary materials

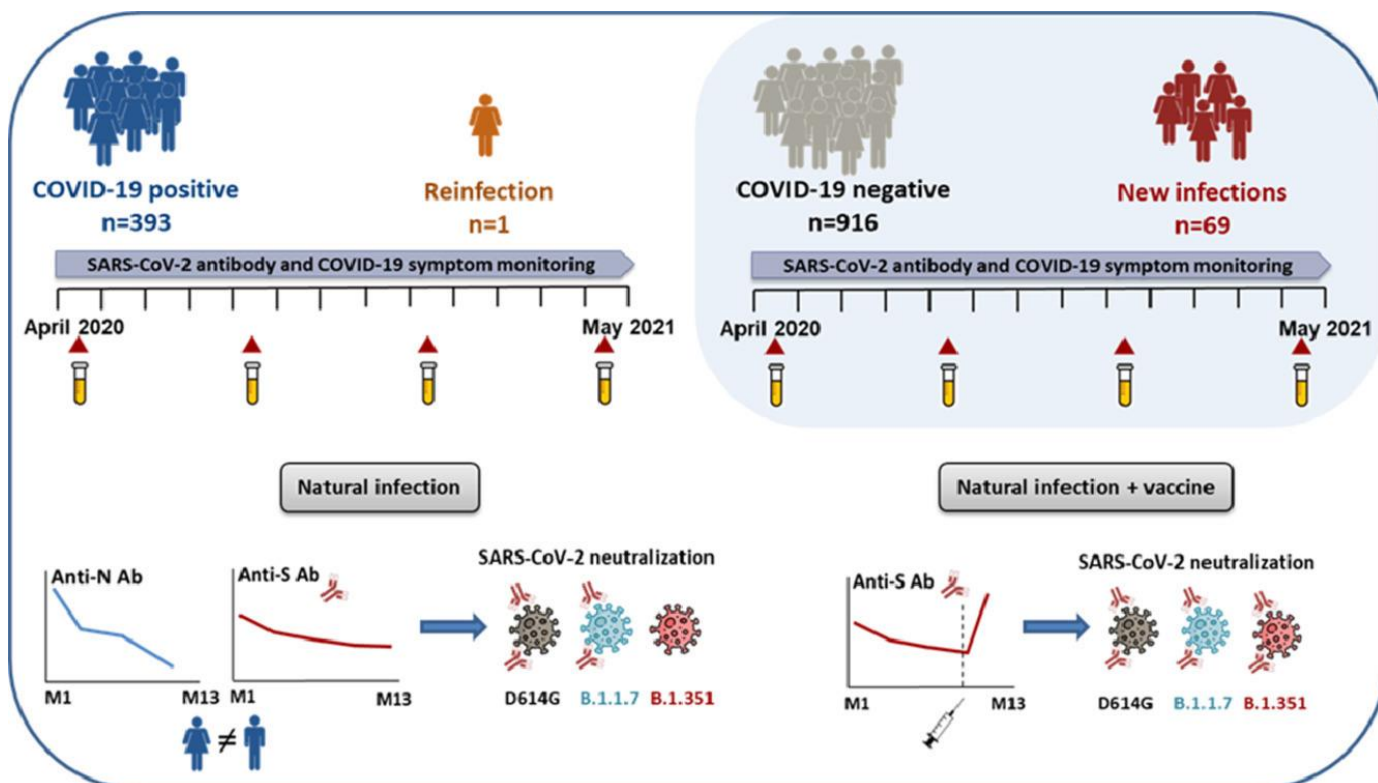
Supplementary material associated with this article can be found in the online version at doi:[10.1016/j.ebiom.2021.103561](https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103561).

References

- [1] Atyeo C, Fischinger S, Zohar T, Slein MD, Burke J, Loos C, et al. Distinct early serological signatures track with SARS-CoV-2 survival. *Immunity* 2020;53:524–32 e4.
- [2] Gaebler C, Wang Z, Lorenzi JCC, Muecksch F, Finkin S, Tokuyama M, et al. Evolution of antibody immunity to SARS-CoV-2. *Nature* 2021;591:639–44.
- [3] Isho B, Abe KT, Zuo M, Jamal AJ, Rathod B, Wang JH, et al. Persistence of serum and saliva antibody responses to SARS-CoV-2 spike antigens in COVID-19 patients. *Sci Immunol* 2020;5(52).
- [4] Iyer AS, Jones FK, Nodoushani A, Kelly M, Becker M, Slater D, et al. Persistence and decay of human antibody responses to the receptor binding domain of SARS-CoV-2 spike protein in COVID-19 patients. *Sci Immunol* 2020;5.
- [5] Ibarondo FJ, Fulcher JA, Goodman-Meza D, Elliott J, Hofmann C, Hausner MA, et al. Rapid decay of anti-SARS-CoV-2 antibodies in persons with mild COVID-19. *N Engl J Med* 2020;383:1085–7.
- [6] Anand SP, Prevost J, Nayrac M, Beaudoin-Bussières G, Benlarbi M, Gasser R, et al. Longitudinal analysis of humoral immunity against SARS-CoV-2 Spike in convalescent individuals up to eight months post-symptom onset. *Cell Rep Med* 2021;2:100290.
- [7] Wajnberg A, Amanat F, Firpo A, Altman DR, Bailey MJ, Mansour M, et al. Robust neutralizing antibodies to SARS-CoV-2 infection persist for months. *Science* 2020;370:1227–30.
- [8] Dan JM, Mateus J, Kato Y, Hastie KM, Yu ED, Faliti CE, et al. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science* 2021;371.
- [9] Hall VJ, Foulkes S, Charlett A, Atti A, Monk EJM, Simmons R, et al. SARS-CoV-2 infection rates of antibody-positive compared with antibody-negative healthcare workers in England: a large, multicenter, prospective cohort study (SIREN). *The Lancet* 2021;397:1459–69.
- [10] Hansen CH, Michlmayr D, Gubbels SM, Mølbak K, Ethelberg S. Assessment of protection against reinfection with SARS-CoV-2 among 4 million PCR-tested

- individuals in Denmark in 2020: a population-level observational study. *Lancet* 2021;397:1204–12.
- [11] Lumley SF, O'Donnell D, Stoesser NE, Matthews PC, Howarth A, Hatch SB, et al. Antibody status and incidence of SARS-CoV-2 infection in health care workers. *N Engl J Med* 2021;384:533–40.
 - [12] Andreano E, Rappuoli R. SARS-CoV-2 escaped natural immunity, raising questions about vaccines and therapies. *Nat Med* 2021;27:759–61.
 - [13] Davies NG, Abbott S, Barnard RC, Jarvis CI, Kucharski AJ, Munday JD, et al. Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. *Science* 2021:372.
 - [14] Hu J, Peng P, Wang K, Fang L, Luo FY, Jin AS, et al. Emerging SARS-CoV-2 variants reduce neutralization sensitivity to convalescent sera and monoclonal antibodies. *Cell Mol Immunol* 2021;18:1061–3.
 - [15] Sabino EC, Buss LF, Carvalho MPS, Prete CA, Crispim MAE, Fraiji NA, et al. Resurgence of COVID-19 in Manaus, Brazil, despite high seroprevalence. *Lancet* 2021;397:452–5.
 - [16] Tegally H, Wilkinson E, Giovanetti M, Iranzadeh A, Fonseca V, Giandhari J, et al. Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa. *Nature* 2021;592:438–43.
 - [17] Predecki M, Clarke C, Brown J, Cox A, Gleeson S, Guckian M, et al. Effect of previous SARS-CoV-2 infection on humoral and T-cell responses to single-dose BNT162b2 vaccine. *Lancet* 2021;397:1178–81.
 - [18] Velay A, Gallais F, Benotmane I, Wendling MJ, Danion F, Collange O, et al. Evaluation of the performance of SARS-CoV-2 serological tools and their positioning in COVID-19 diagnostic strategies. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2020;98:115181.
 - [19] Fafi-Kremer S, Bruel T, Madec Y, Grant R, Tondeur L, Grzelak L, et al. Serologic responses to SARS-CoV-2 infection among hospital staff with mild disease in eastern France. *EBioMedicine* 2020;59.
 - [20] Planas D, Bruel T, Grzelak L, Guivel-Benhassine F, Staropoli I, Porrot F, et al. Sensitivity of infectious SARS-CoV-2 B.1.1.7 and B.1.351 variants to neutralizing antibodies. *Nat Med* 2021;27:917–24.
 - [21] McKay PF, Hu K, Blakney AK, Samnuan K, Brown JC, Penn R, et al. Self-amplifying RNA SARS-CoV-2 lipid nanoparticle vaccine candidate induces high neutralizing antibody titers in mice. *Nat Commun* 2020;11:3523.
 - [22] Mickey RM, Greenland S. The impact of confounder selection criteria on effect estimation. *Am J Epidemiol* 1989;129:125–37.
 - [23] Capetti AF, Borgonovo F, Mileto D, Gagliardi G, Mariani C, Lupo A, et al. One-year durability of anti-spike IgG to SARS-CoV-2: preliminary data from the anticrown prospective observational study one year durability of COVID-19 anti-spike IgG. *J Infect* 2021;83:237–79.
 - [24] Choe PG, Kang CK, Kim KH, Yi J, Kim EU, Park SW, et al. Persistence of neutralizing antibody response up to one year after asymptomatic or symptomatic SARS-CoV-2 infection. *J Infect Dis* 2021;339. Published online June 24;jab.
 - [25] Masiá M, Fernández-González M, Telenti G, Agulló V, García JA, Padilla S, et al. Durable antibody response one year after hospitalization for COVID-19: a longitudinal cohort study. *J Autoimmun* 2021;123:102703.
 - [26] Li C, Yu D, Wu X, Liang H, Zhou Z, Xie Y, et al. Twelve-month specific IgG response to SARS-CoV-2 receptor-binding domain among COVID-19 convalescent plasma donors in Wuhan. *Nat Commun* 2021;12:4144.
 - [27] Dobaño C, Ramírez-Morros A, Alonso S, Vidal-Alaball J, Ruiz-Olalla G, Vidal M, et al. Persistence and baseline determinants of seropositivity and reinfection rates in health care workers up to 12.5 months after COVID-19. *BMC Med* 2021;19:155.
 - [28] Wang Z, Muecksch F, Schaefer-Babajew D, Finkin S, Viant C, Gaebler C, et al. Naturally enhanced neutralizing breadth against SARS-CoV-2 one year after infection. *Nature* 2021;595:426–31.
 - [29] Huang AT, García-Carreras B, Hitchings MDT, Yang B, Katzelnick LC, Rattigan SM, et al. A systematic review of antibody mediated immunity to coronaviruses: kinetics, correlates of protection, and association with severity. *Nat Commun* 2020;11:4704.
 - [30] Muecksch F, Wise H, Batchelor B, Squires M, Semple E, Richardson C, et al. Longitudinal serological analysis and neutralizing antibody levels in coronavirus disease 2019 convalescent patients. *J Infect Dis* 2021;223:389–98.
 - [31] Takahashi T, Ellingson MK, Wong P, Israelow B, Lucas C, Klein J, et al. Sex differences in immune responses that underlie COVID-19 disease outcomes. *Nature* 2020;588:315–20.
 - [32] Fischinger S, Boudreau CM, Butler AL, Streeck H, Alter G. Sex differences in vaccine-induced humoral immunity. *Semin Immunopathol* 2019;41:239–49.
 - [33] Scully EP, Haverfield J, Ursin RL, Tannenbaum C, Klein SL. Considering how biological sex impacts immune responses and COVID-19 outcomes. *Nat Rev Immunol* 2020;20:442–7.

Graphical abstract:



Supplementary Table 1. Univariable analysis of anti-RBD and anti-N IgG slopes between M3-6 and M7-9.

Categories	Anti-RBD IgG	p value	Anti-N IgG	p value
Age, 10 years	R=-0.110	0.0486	R=-0.165	0.0028
BMI	R=-0.099	0.0756	R=-0.114	0.0447
Sex				
Male (reference)	-0.06657	1	-0.01500	1
Female	-0.04230	0.0003	-0.02400	0.1474
Blood group				
O (reference)	-0.04386	1	-0.02800	1
A	-0.05013	0.1542	-0.02500	0.2943
B	-0.05757	0.2556	0.006000	0.1435
Rhesus				
+ (reference)	-0.04398	1	-0.02100	1
-	-0.05937	0.0726	-0.03300	0.1279
SARS-CoV-2 RT-PCR Ct	R=0.057	0.1630	R=-0.067	0.1494
COVID-19 symptoms				
Yes (reference)	-0.04080	1	-0.02400	1
No	-0.04661	0.2303	0.003000	0.2524
Hospitalization				
No (reference)	-0.04121	1	-0.02463	1
Yes	-0.04497	0.2569	-0.02100	0.4091
DSO at M3-6	R=0.114	0.0447	R=0.010	0.1554
Value at M3-6	R=-0.089	0.1085	R=-0.579	<0.0001

BMI: body mass index; RT-PCR: Real-time reverse transcriptase PCR. Data are presented as median slopes for group comparisons (anti-RBD decay in log BAU/mL per month or anti-N decay in S/CO per month, parameter in blue lines) or Spearman's R for continuous variables (green lines). P values were calculated with Mann-Whitney (group comparison) or Spearman correlation (continuous parameters).

D. Discussion

Cette étude longitudinale menée sur une large cohorte de soignants a fourni des informations cruciales et précoces au sujet de la dynamique et de la persistance des anticorps dirigés contre le SARS-CoV-2 jusqu'à plus d'un an après l'infection. Des anticorps dirigés contre la région RBD de la protéine S ont été détectés chez 97 % des sujets infectés jusqu'à 422 jours après le début des symptômes, en accord avec les résultats d'autres études similaires qui décrivent une relative stabilisation à partir de 6 mois (336,449–453). En accord avec la littérature, une étroite corrélation a été observée entre les concentrations en IgG anti-RBD et le pouvoir neutralisant des anticorps (454). La demi-vie élevée de ces anticorps calculée en fin de suivi suggérait qu'ils persistent bien plus longtemps encore après l'infection, même en l'absence de nouvelle stimulation antigénique. Ceci s'est en effet vérifié par la suite : une étude rapporte la détection d'anticorps neutralisants encore chez 89 % des individus un an et demi après une primo-infection (455), et une seconde étude plus récente a montré la présence d'IgG anti-RBD jusqu'à 20 mois suivant l'infection (456).

La première phase de décroissance des anticorps circulants que nous avons observée au cours des premiers mois après la COVID-19 est principalement due à l'élimination progressive des plasmocytes de courte durée de vie produits suite à l'infection. La persistance des IgG anti-RBD constatée jusqu'à plus d'un an de l'infection dans notre étude s'explique quant à elle par une production basale d'anticorps par les plasmocytes de longue durée de vie localisés dans la moelle osseuse (328). Une maturation d'affinité de ces anticorps s'opère au cours du temps, limitant l'impact fonctionnel de la lente décroissance des anticorps constatée à distance de l'infection en augmentant leur pouvoir neutralisant et leur spectre antigénique (267,335,457).

En parallèle, nous avons observé une cinétique différente des IgG anti-N avec chute importante survenue après une phase de stabilisation apparente, aboutissant à seulement 20 % de séropositivité à un an de l'infection. Ceci pourrait s'expliquer par ce même mécanisme

de maturation d'affinité avec modification des épitopes reconnus au cours du temps. La chute plus rapide des IgG anti-N a également été observée par d'autres équipes et limite la fiabilité des études de séroprévalence se basant sur la détection d'anticorps ciblant cet antigène (336,458). Cependant, l'évaluation de la persistance d'anticorps anti-N détectables dépend beaucoup du kit sérologique employé, plusieurs études rapportant à l'inverse une persistance de ces anticorps chez plus de 80 % des sujets convalescents un an après infection (449,451,455,459). Quoi qu'il en soit, dans le contexte actuel de couverture vaccinale élevée, la mise en évidence de ces anticorps garde un intérêt pour faire la distinction entre une immunité vaccinale simple ou une immunité post-infectieuse ou hybride, à condition que l'épisode d'infection suspecté ne soit pas trop ancien.

L'autre volet de l'immunité humorale également crucial contre les réinfections porte sur les lymphocytes B mémoires, qui ne produisent pas d'anticorps mais ont la capacité de s'activer rapidement en cas de nouvelle stimulation antigénique. Plusieurs équipes rapportent qu'une réponse B mémoire robuste et durable est instaurée contre le SARS-CoV-2, qui persiste et même augmente au cours des huit premiers mois après infection (267,460–462). Les lymphocytes B mémoires continuent de mûrir plusieurs mois après l'infection aiguë par le processus d'hypermutation somatique, ce qui suggère que l'activité des centres germinatifs se poursuit à distance de l'infection (267). Cette maturation favorise la sélection clonale des lymphocytes B mémoires reconnaissant leur antigène avec une affinité accrue, une moindre sensibilité aux mutations d'éventuels variants et associés à un fort pouvoir neutralisant en cas de réactivation (336). Ainsi, dans notre étude, la vaccination des sujets COVID+ près d'un an après l'infection s'est accompagnée d'un rapide rebond du taux d'anticorps et de leur pouvoir neutralisant dès le 6^e jour, grâce à une restimulation des populations B mémoires. Des concentrations élevées d'IgG anti-RBD ont été atteintes indépendamment des titres pré-vaccinaux. Ceci peut s'expliquer par la corrélation étroite existante entre la réponse post-vaccinale des sujets convalescents et la fréquence des lymphocytes B mémoires initiale, cette dernière étant indépendante de la concentration de base en anticorps (463). Grâce à

l'élargissement du spectre des lymphocytes B mémoires et des anticorps au cours du temps, cette réponse anamnétique induite par la vaccination a permis d'atteindre des titres neutralisants élevés contre le variant beta qui porte des mutations d'échappement au système immunitaire, contrairement aux sujets convalescents non vaccinés. La vaccination des sujets précédemment infectés permet donc d'accroître la force de la réponse immunitaire humorale, son spectre mais aussi sa persistance qui est plus durable que chez les sujets naïfs vaccinés (464). Enfin, nos résultats soulignent l'inutilité de l'administration d'une seconde dose de vaccin chez les sujets convalescents, une dose unique étant suffisante pour mobiliser l'essentiel des lymphocytes B mémoires et développer une concentration d'anticorps maximale (463).

Par ailleurs, la dynamique de la réponse humorale post-infectieuse dépend de plusieurs paramètres. Notre analyse a révélé une différence de cinétique en fonction du sexe, avec une diminution plus lente des IgG anti-RBD chez les femmes et à l'inverse une meilleure persistance des IgG anti-N chez les hommes. Ces résultats sont concordants avec les conclusions d'autres travaux, qui rapportent également une décroissance plus lente des anticorps dirigés contre la protéine S chez les femmes (459,465). Cette observation est à interpréter au regard du pic plus élevé de ces anticorps décrit chez les hommes tôt après l'infection (330,332,466,467). En effet, leur chute accélérée gomme cette différence avec le temps, conduisant à des titres équivalents entre les deux sexes un an après l'infection. Des différences en fonction du sexe ont été décrites concernant d'autres versants de la réponse immunitaire en phase aiguë de l'infection par le SARS-CoV-2, à savoir une production plus importante de cytokines pro-inflammatoires chez les hommes et une activation plus robuste de la réponse cellulaire T chez les femmes (468). L'ensemble de ces observations révèle une physiopathologie différente de la réponse immunitaire anti-SARS-CoV-2 en fonction du sexe, probablement impliquée en partie dans la part plus importante de formes sévères de COVID-19 chez les hommes (191). Par ailleurs, l'analyse multivariée conduite dans notre étude a également mis en évidence une décroissance plus rapide des IgG anti-RBD chez les

sujets de rhésus négatif. Cette observation reste à vérifier sur d'autres cohortes de sujets convalescents de COVID-19. En effet, plusieurs autres études rapportent que le rhésus négatif serait un facteur protecteur contre l'infection par le SARS-CoV-2 et contre les formes graves de COVID-19, mais aucune d'entre elles ne porte à ce jour sur l'influence de ce facteur sur la cinétique des anticorps développés après l'infection (469–471).

D'autres facteurs jouant potentiellement sur la persistance des anticorps développés après infection n'ont pas été explorés dans notre étude. En effet, celle-ci a été conduite sur une cohorte de personnels soignants qui ne comprend donc pas d'enfants ni de personnes très âgées, tandis que l'âge est un facteur important influant sur la réponse humorale après infection. Bien que nous ayons observé une perte plus lente des IgG anti-N avec l'âge, ce biais de sélection peut expliquer l'absence de différence observable sur la chute des anticorps anti-S en fonction de ce facteur. La littérature rapporte en effet que les personnes âgées développent davantage d'anticorps anti-SARS-CoV-2 en phase aiguë de l'infection, ce qui pourrait également jouer sur leur persistance sur le long terme (330,465–467). De plus, notre étude portait principalement sur des sujets COVID+ ayant développé une forme légère de la maladie. Toutefois, l'intensité de la réponse humorale initiale est corrélée avec la sévérité de l'infection. Ainsi les cas sévères sont associés à des concentrations initiales plus élevées d'anticorps, probablement du fait d'une répllication virale prolongée (199), tandis que les cas asymptomatiques développent une réponse humorale plus faible, et ces différences persistent sur le long terme (472). Notre observation de persistance des anticorps jusqu'à au moins 13 mois post-infection ne peut donc pas être transposée aux cas asymptomatiques, pour lesquels plusieurs études rapportent une perte plus rapide des anticorps circulants (451,473).

Enfin, la persistance des anticorps circulants anti-RBD observée dans notre étude jusqu'à plus d'un an a été associée à un pouvoir protecteur contre les réinfections de 96,7 % au cours de la période de suivi. Cette réduction du risque a été observée jusqu'en avril 2021, correspondant aux périodes de circulation de la souche virale ancestrale portant la mutation D614G et du variant alpha. Ce niveau de protection très élevé est cohérent avec celui décrit

dans la littérature jusqu'à l'apparition du variant delta, avec des taux rapportés de réinfections de 80,5 à 100 % selon les études et très peu de formes sévères (474). La question de la durée de cette protection est cruciale, et nos résultats montrant une relative stabilisation des concentrations d'anticorps anti-RBD après infection et leur corrélation à la capacité de neutralisation étaient alors encourageants. Certains auteurs ont ainsi estimé la durée de protection à 50 % contre les réinfections entre un an et demi et près de trois ans après l'infection, par extrapolation sur la base des titres d'anticorps circulants et de leur cinétique (465,472). Cette durée est proche de celle observée avec les coronavirus endémiques saisonniers (475). Cependant, notre étude portait principalement sur des infections impliquant les variants D614G et alpha qui ont une antigénicité proche avec peu de mutations d'échappement au système immunitaire. Or il faut garder à l'esprit que la réduction du risque de réinfection dépend de la proximité antigénique entre le variant initialement impliqué lors de la primo-infection et les souches en circulation à un instant donné. Le risque de réinfection actuel est donc en réalité plus important, dans le contexte de primo-infections possiblement plus anciennes et de circulation quasi exclusive du variant omicron. En effet, une étude décrit une protection au cours de la première année post-infection à 56 % contre les réinfections par le variant omicron (vs. 90,2 % contre le variant alpha) (164). Ainsi, parmi les plus de 400 000 cas possibles recensés en France entre le 2 mars 2021 et le 27 janvier 2022, 92 % sont survenues à partir du 1^{er} décembre 2021 soit après l'émergence de ce variant (476). La vaccination des sujets convalescents permet cependant de réduire encore le risque de réinfection, en induisant une immunité appelée « hybride » avec l'augmentation des titres en anticorps neutralisants contre l'ensemble des variants, à l'instar des résultats de notre étude qui montrent une neutralisation efficace du variant beta après vaccination. Une étude suédoise menée jusqu'en octobre 2021 rapporte ainsi une protection supplémentaire conférée par la vaccination des sujets convalescents pendant au moins neuf mois (477), en concordance avec autre étude américaine qui révèle un risque réduit de 2,3 fois après vaccination (478).

Bien que la protection contre les réinfections soit étroitement corrélée aux concentrations circulantes en anticorps anti-S et à leur pouvoir neutralisant, les anticorps associés aux muqueuses développés après la primo-infection jouent très probablement aussi un rôle majeur dans cette protection (479). Ceux-ci n'ont pas été explorés dans notre étude, mais il a été décrit qu'ils persistent localement jusqu'à au moins neuf mois suivant l'infection. Enfin, malgré une protection plus faible contre les réinfections au-delà de 2 ans, les réponses cellulaires B et T mémoires persistent dans le temps et participent probablement à une réduction du risque de formes sévères sur le plus long terme (472).

III. Caractérisation de l'immunité cellulaire post-infectieuse

A. Contexte et objectifs de l'étude

Parmi l'ensemble des soignants inclus dans l'étude longitudinale précédente qui explore l'immunité humorale, une partie a été volontaire pour participer à une étude ancillaire, qui elle portait sur le volet de l'immunité cellulaire anti-SARS-CoV-2. Ainsi, des échantillons sanguins supplémentaires ont été récoltés chez 396 de ces participants dont 165 avec une infection préalable à l'inclusion (groupe COVID+), concomitamment à la sérologie réalisée de trois à six mois à distance de l'infection (M3-6). Ceci nous a permis d'isoler les cellules mononucléées du sang périphériques (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) à partir de ces échantillons et de les congeler à très basse température (-150°C), en vue de l'exploration de l'immunité cellulaire anti-SARS-CoV-2.

La présente étude réalisée dans le cadre de ce travail de thèse visait à caractériser le spectre et la fréquence de la réactivité cellulaire chez les sujets convalescents de COVID-19 et à déterminer si celle-ci était corrélée ou non avec la force de la réponse humorale spécifique développée suite à l'infection. Dans cet objectif, nous avons analysé les échantillons de 60 sujets COVID+ par ELISPOT IFN- γ après décongélation des PBMCs, en caractérisant leur réactivité dirigée contre les fractions N- et C-terminales de la protéine S (S1 et S2), contre les autres protéines structurales et contre certaines protéines accessoires (ORF3a, ORF6, ORF7a et ORF8) du SARS-CoV-2. En parallèle, nous avons collecté les résultats de sérologie quantitative dosant les IgG anti-RBD (test Abbott Architect IgG Quant II) réalisée sur les sérums prélevés au même temps (M3-6) chez ces 60 sujets. Enfin, nous avons évalué le pouvoir neutralisant des anticorps sur pseudo-particules virales représentant la souche ancestrale D614G du SARS-CoV-2. L'ensemble de ces résultats ont été analysés via le calcul de coefficients de corrélation de Spearman. Nous avons en particulier comparé les réponses humorales et cellulaires dirigées contre la même cible antigénique à savoir la fraction protéique S1 qui contient le RBD.

B. Résultats

La cohorte de sujets COVID+ inclus dans cette étude ancillaire comprend 45 femmes et 15 hommes, d'un âge médian de 38 ans (interquartile (IQR) : 30,6-46,9). La grande majorité avait été atteinte d'une forme légère de COVID-19, et 3 étaient restés asymptomatiques.

1. Réponse cellulaire

Une réactivité cellulaire contre au moins les trois protéines structurales S (S1 et/ou S2), N et M a été mise en évidence chez 58 des 60 participants (96,7 %) (Figure 41). Les deux derniers présentaient quant à eux une réponse uniquement contre la protéine N pour l'un, et contre S et N sans la protéine M pour l'autre. La fréquence la plus élevée de cellules réactives a été observée contre la protéine N (médiane : 95,0 *spot forming units* (SFU)/million de PBMCs, IQR : 46,3-160,5), supérieure à la réactivité contre S1 (médiane : 79,0 SFU/10⁶ PBMCs, IQR : 32,5-120,0, $p = 0,020$) et contre S2 (médiane : 72,5 SFU/10⁶ PBMCs, IQR : 45,8-115,8, $p = 0,030$), sans différence significative entre ces deux fractions de la protéine S. Une réponse significative contre la protéine d'enveloppe (E) n'a été trouvée que chez trois sujets, avec des fréquences juste au-dessus de la limite de positivité pour deux d'entre eux. Enfin, parmi les protéines accessoires, la protéine ORF3a a été la plus immunogène avec une réponse positive montrée chez 40 (67 %) des participants, mais avec une fréquence bien plus faible que vis-à-vis des protéines structurales (médiane : 16 SFU/10⁶ PBMCs, IQR : 0-42,5). La protéine ORF8 a elle aussi stimulé une réponse cellulaire chez plus de la moitié des participants ($n=38$, 63,3 %) tandis qu'une réactivité contre les protéines ORF6 et ORF7a a été plus rarement mise en évidence, respectivement chez 3 et 14 sujets.

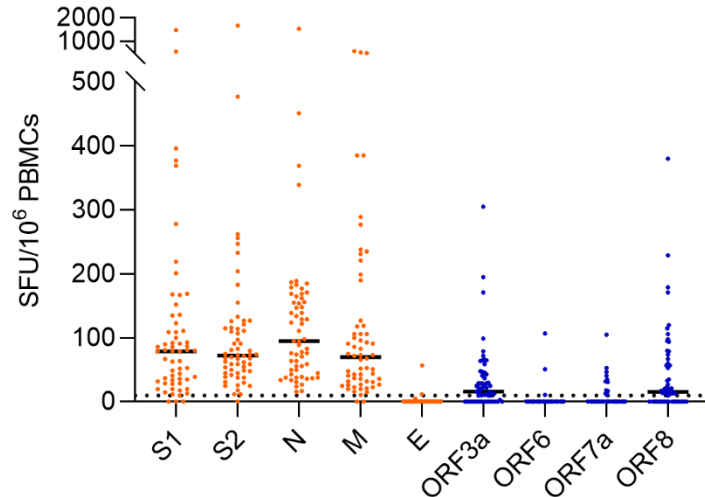


Figure 41 : Réponse cellulaire par ELISPOT IFN- γ contre les protéines structurales et accessoires du SARS-CoV-2.

Les réponses dirigées contre les protéines structurales sont représentées en orange (S1 et S2 : fractions N- et C-terminales de la protéine S ; N : protéine de nucléocapside ; M : protéine de membrane ; E : protéine d'enveloppe) et celles contre les protéines accessoires en bleu. La médiane est symbolisée par une barre horizontale. Après soustraction du signal moyen des puits de témoin négatifs, le seuil de positivité a été fixé à trois fois l'écart type de ces derniers, avec un seuil minimum de 10 *spot forming units* (SFU)/millions de cellules mononucléées du sang périphérique (PBMCs) symbolisé par la ligne en pointillés.

Par ailleurs, nous avons mis en évidence une corrélation entre les fréquences de cellules réactives dirigées contre chacune des protéines structurales du SARS-CoV-2 (à l'exception de la protéine E), ainsi qu'entre les fractions S1 et S2 de la protéine S (Figure 42).

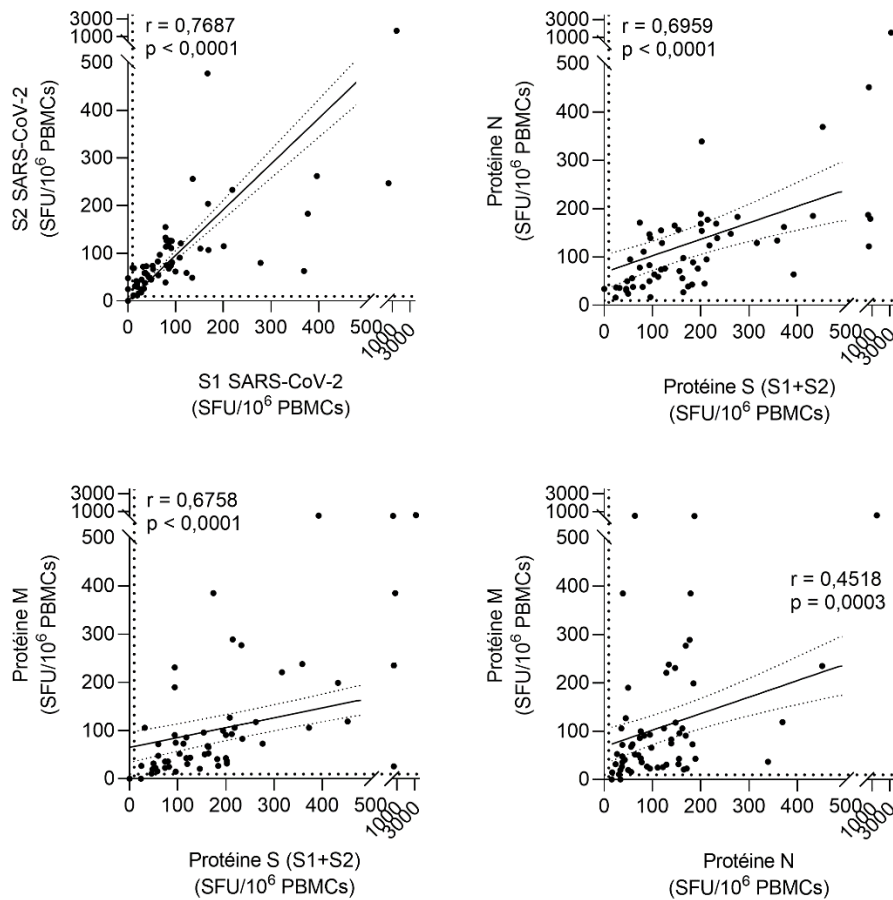


Figure 42 : Corrélation entre les réponses cellulaires dirigées contre les protéines S (fractions N- et C-terminales, S1 et S2), N et M.

Les coefficients de corrélation de Spearman sont indiqués sur chaque graphique. La droite de régression linéaire ainsi que son intervalle de confiance à 95 % sont représentées.

2. Réponse humorale

L'ensemble des 60 sujets inclus dans cette étude ancillaire étaient encore séropositifs en IgG anti-RBD à M3-6 de l'infection, à une médiane de 67,4 BAU/mL (IQR : 33,6-188,1). La concentration en anticorps augmentait légèrement avec l'âge (gain de 0,148 \log_{10} BAU/mL par incrément de 10 ans d'âge, $r = 0,2643$, $p = 0,0413$) (Figure 43).

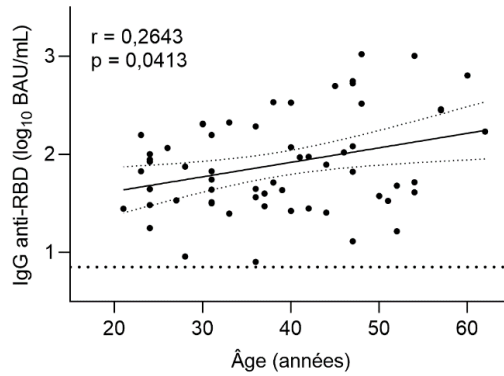


Figure 43 : Résultats de sérologie quantitative en IgG anti-RBD en fonction de l'âge.

Le coefficient de corrélation de Spearman est indiqué, et la droite de régression linéaire ainsi que son intervalle de confiance à 95 % sont représentées. Le seuil de positivité du test sérologique est représenté en pointillés (7,1 BAU/mL soit 0,85 \log_{10} BAU/mL).

L'étude du pouvoir neutralisant sur pseudo-particules D614G n'a pas montré de différence en fonction de l'âge sur cette cohorte de 60 individus. Les titres en anticorps neutralisants étaient corrélés aux concentrations en IgG anti-RBD ($r = 0,5900$, $p < 0,0001$) (Figure 44). Ainsi, un titre neutralisant d'au moins $1/40^e$ a été mis en évidence chez tous les participants avec plus de 75 BAU/mL, à l'exception de deux d'entre eux (avec 212 et 1012 BAU/mL sans pouvoir neutralisant détecté).

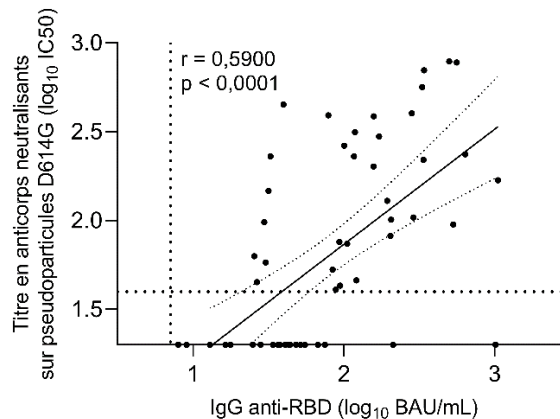


Figure 44 : Corrélation entre les titres en anticorps neutralisants et les concentrations en IgG anti-RBD.

Le coefficient de corrélation de Spearman est indiqué, et la droite de régression linéaire ainsi que son intervalle de confiance à 95 % sont représentées. Les droites en pointillés représentent les seuils de positivité du test sérologique (7,1 BAU/mL soit 0,85 \log_{10} BAU/mL) et du test de neutralisation (dilution au $1/40^e$, soit 1,6 \log_{10} IC50).

3. Corrélation entre les réponses humorale et cellulaire

Nous avons recherché une corrélation entre d'une part la réponse cellulaire dirigée contre la fraction N-terminale de la protéine S (S1), et d'autre part la réponse humorale dirigée contre le RBD contenu dans cette même fraction protéique. Une faible corrélation a été mise en évidence entre la fréquence des PBMCs sécrétant de l'IFN- γ au contact de S1 et la concentration en IgG anti-RBD ($r = 0,3103$, $p = 0,0158$). La corrélation n'était cependant pas significative entre cette réponse cellulaire et le pouvoir neutralisant des anticorps, malgré une tendance similaire observée ($p = 0,0546$) (Figure 45).

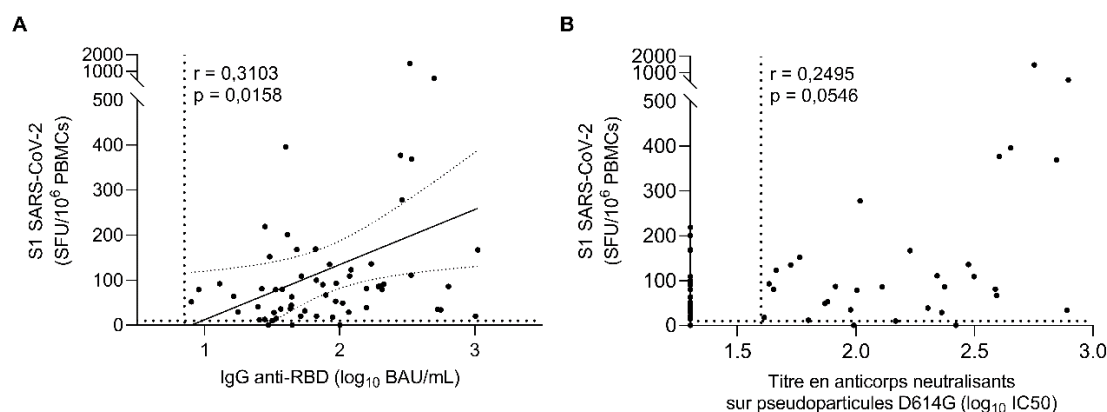


Figure 45 : Corrélation de la réponse cellulaire anti-S1 avec la concentration en IgG anti-RBD (A) et le titre en anticorps neutralisants (B).

C. Discussion

Cette étude ancillaire a permis de caractériser le spectre de réactivité cellulaire et sa persistance de trois à six mois après un épisode de COVID-19, essentiellement de forme légère, ainsi que de comparer son intensité avec la réponse humorale spécifique du SARS-CoV-2. Tous les participants avaient une réactivité détectable contre au moins une protéine et 97 % contre au moins trois protéines du SARS-CoV-2. Ces résultats soulignent qu'une réponse cellulaire se développe dans la grande majorité des cas après une COVID-19 et qu'elle persiste au moins jusqu'à 6 mois. La littérature rapporte qu'une réponse T mémoire serait encore détectables au-delà d'un an après infection (452,480,481).

La majorité des PBMCs spécifiques mis en évidence ciblaient les antigènes S, N et M, tous correspondant à des protéines structurales. Cette observation est conforme aux résultats décrits dans la littérature (267–270,290,291,297,482). La protéine N était la plus immunogène dans notre étude, ce qui peut s'expliquer par sa forte abondance dans les particules virales (environ 1000 protéines N par virion vs. une centaine de trimères de la protéines S) (483). À l'inverse, la protéine E n'a généralement pas généré de réponse cellulaire spécifique après infection, vraisemblablement du fait de sa petite taille (75 acides aminés) et de sa faible représentation dans les particules virales (environ 20 copies par virion) (483). Parmi les protéines accessoires, les protéines ORF3a et ORF8 étaient les plus fréquemment ciblées par la réponse T. Nous n'avons cependant pas exploré l'immunité dirigée contre les protéines non structurales au sein de l'ORF1a/b, qui représentent elles aussi une part importante des protéines ciblées par la réponse cellulaire anti-SARS-CoV-2 (290).

L'étude de l'immunité humorale à M3-6 chez ces 60 sujets convalescents a montré que la production d'anticorps développés après infection augmentait avec l'âge, indépendamment de la forme clinique de COVID-19, rejoignant les observations d'autres équipes (330,465–467). De même, nous avons confirmé la corrélation des titres d'IgG anti-RBD avec les titres en anticorps neutralisants sur pseudo-particules, déjà observée sur une part plus importante de la cohorte à M11-13 par un test différent sur virus entier.

Enfin, nous avons pu mettre en évidence une faible corrélation entre les titres d'IgG anti-RBD et la réponse cellulaire anti-S1 avec production d'IFN- γ chez les sujets convalescents. Celle-ci peut s'expliquer par la région protéique commune ciblée par ces deux versants de la réponse adaptative et par l'implication de la réponse cellulaire dans l'activation des lymphocytes B. La corrélation observée entre la réponse humorale et la réponse cellulaire n'a cependant pas été retrouvée en considérant le titre en anticorps neutralisants. Un manque d'effectif pourrait être à l'origine de ce défaut de corrélation statistique, en particulier au vu de la tendance observée avec une valeur de p proche de la significativité. De plus, la technique employée de l'ELISPOT IFN- γ pourrait aussi expliquer ce résultat. En effet, celle-ci ne différenciait pas les LT CD4+ et

CD8+, et n'explorait que la réactivité cellulaire se traduisant par la sécrétion d'IFN- γ suite à la stimulation par les peptides antigéniques. Cependant, cette cytokine est essentiellement produite par une partie des LT CD4+ de polarisation Th1 et des LT CD8+. Sa sécrétion n'est donc pas représentative de la totalité des lymphocytes T effecteurs, en particulier des LTfh qui ne produisent que très peu d'IFN- γ et qui sont les principaux acteurs impliqués dans la coopération avec les lymphocytes B pour entraîner leur activation et leur différenciation en plasmocytes. À titre de comparaison, la littérature rapporte des conclusions hétérogènes quant à la corrélation entre la réponse humorale et cellulaire après infection. Ainsi, plusieurs travaux décrivent une corrélation de la réponse cellulaire anti-S avec les titres d'IgG anti-S ou anti-RBD (270,303,480), ou encore avec le titre en anticorps neutralisants (480). D'autres études rapportent des résultats similaires mais avec une corrélation relativement plus faible (291,447). À l'inverse, une étude menée sur 76 patients infectés depuis une période de 22 jours à 15 mois n'a mis en évidence aucune corrélation entre la réponse cellulaire et la concentration en anticorps anti-RBD (481). Enfin, une étude a spécifiquement montré la corrélation des LTfh circulants et lymphocytes effecteurs CD4+ IL-2+ reconnaissant la protéine S avec le pouvoir neutralisant des anticorps et la concentration en IgA anti-RBD, avec une tendance similaire mais non significative observée pour les IgG anti-RBD (304).

Nos résultats viennent corroborer l'hypothèse d'une réponse cellulaire forte associée aux titres d'anticorps anti-RBD élevés. Ils confirment qu'une réponse T mémoire se développe chez les sujets convalescents d'une COVID-19 et persiste plusieurs mois après l'infection, jouant probablement un rôle dans la protection contre les réinfections en association avec l'immunité humorale.

Partie II : Réponse vaccinale chez les patients immunodéprimés

La vaccination contre le SARS-CoV-2 possible dès le début de l'année 2021 a permis de protéger une part importante de la population contre la COVID-19, et de renforcer l'immunité des personnes déjà infectées. Bien que priorisées pour l'accès à cette vaccination, les personnes sévèrement immunodéprimées développent une réponse vaccinale plus faible, laissant certaines d'entre elles vulnérables devant cette maladie. Dans ce contexte, nous avons exploré la réponse vaccinale à un schéma de primo-vaccination comportant 3 doses chez deux catégories de personnes sévèrement immunodéprimées : d'une part les patients traités par rituximab, et d'autre part les transplantés pulmonaires qui reçoivent de fortes doses d'immunosuppresseurs pour limiter le risque de rejet du greffon.

I. Réponse vaccinale chez les patients traités par rituximab

A. Contexte et objectifs de l'étude

Le rituximab est un anticorps monoclonal chimérique anti-CD20 utilisé comme agent déplétant des lymphocytes B. Autorisé en 1997 dans le traitement des lymphomes B, il est aujourd'hui aussi employé dans le traitement de maladies auto-immunes en particulier de la polyarthrite rhumatoïde, avec des cures généralement espacées d'au moins six mois dans cette indication (484). Le rituximab cible le CD20, une protéine transmembranaire exprimée à la surface des lymphocytes B naïfs et des lymphocytes B mémoires, mais absente de celle des plasmocytes (485). Ce traitement altère donc l'immunité humorale de manière globale en induisant la lyse de ces lymphocytes B, ce qui freine le développement d'anticorps suite à la COVID-19 (486–490) ou à la vaccination contre le SARS-CoV-2 (491–496). De plus, les patients traités par rituximab ont un risque accru d'hospitalisation et de forme sévère de COVID-19 en

comparaison de la population générale, faisant de leur protection un enjeu d'autant plus important (497–501). Devant ce constat, la question de l'intérêt de doses vaccinales supplémentaires s'est rapidement posée. La complétion de la primo-vaccination par une troisième dose a été recommandée en France chez les personnes sévèrement immunodéprimées dont font partie les patients traités par rituximab, malgré un défaut de données alors disponibles sur l'efficacité de cette dose supplémentaire (402). Dans ce contexte, la présente étude visait à évaluer le bénéfice conféré par l'administration d'une troisième dose de vaccin à base d'ARNm sur la réponse humorale et cellulaire des patients sous rituximab. Dans cet objectif, nous avons quantifié les IgG anti-RBD juste avant et 1 mois après l'administration de cette troisième dose chez un groupe de 10 patients traités. Le pouvoir neutralisant des anticorps a également été évalué aux même temps sur pseudo-particules virales de la souche ancestrale D614G et du variant beta, de même que la réponse cellulaire anti-S caractérisée par ELISPOT IFN- γ contre les variants D614G, beta et delta. Enfin, la réponse vaccinale a été analysée en fonction de la numération des sous-populations lymphocytaires circulantes au moment de l'administration de cette troisième dose.

B. Principaux résultats

Suite à la seconde dose vaccinale, sept des dix patients inclus traités par rituximab (70 %) avaient séroconverti en IgG anti-RBD, mais sans pouvoir neutralisant mis en évidence à l'exception d'un patient. Ces sept patients sont ceux qui ont reçu leur première dose au moins six mois après la dernière administration de rituximab, tandis que les trois autres ont été vaccinés après un délai plus court de 6, 84 et 158 jours. Neuf patients (90 %) avaient développé une réponse cellulaire anti-S détectable après la seconde dose vaccinale, de fréquence similaire contre les différents variants testés. Une dissociation entre ces deux versants de la réponse immunitaire a été observée. En effet, 5 patients séropositifs avaient une réponse cellulaire faible ou négative, tandis que 2 patients séronégatifs avaient une réponse cellulaire détectable, très intense (>1000 SFU/mL) pour l'un d'entre eux (patient n°6).

L'administration de la troisième dose vaccinale n'a pas permis d'entraîner de nouvelles séroconversions, les trois patients restés séronégatifs présentant tous une déplétion complète en lymphocytes B circulants. De plus, le gain observé sur la réponse cellulaire chez ces trois patients n'était que de faible amplitude. Cependant, cette troisième dose a induit la production d'anticorps neutralisants chez trois patients déjà séropositifs après la seconde dose, ainsi qu'une réponse T anti-S chez le seul patient sans immunité cellulaire détectable après la seconde dose.

C. Article n°3

Cellular and humoral immunity after the third dose of SARS-CoV-2 vaccine in patients treated with rituximab.

Renaud Felten*, **Floriane Gallais***, Cédric Schleiss, Emmanuel Chatelus, Rose-Marie Javier, Luc Pijnenburg, Christelle Sordet, Jean Sibilia, Laurent Arnaud, Samira Fafi-Kremer, Jacques-Eric Gottenberg.

* Co-authors with equal contribution

The Lancet Rheumatology. 2022 Jan;4(1):e13-e16.

with rheumatoid arthritis who did not have an anti-S1 response to a previous standard two-dose vaccination regimen. Increase in disease activity during DMARD discontinuation was observed in almost half of the patients. Studies with larger patient cohorts will allow analysis of the effect of different DMARD regimens on the kinetics of anti-S1 titres and whether and how long treatment discontinuation is necessary to optimise vaccine-induced anti-S1 responses.

KS contributed to project administration, investigation, formal analysis, visualisation, and review and editing of the report. NV and SP were involved in investigation, formal analysis, and development of methodology. BL contributed to conceptualisation, investigation, and formal analysis. WCA was involved in investigation and development of methodology. JvK contributed to conceptualisation, investigation, and review and editing of the report. AR-R was the project lead, and was involved in conceptualisation, writing the original draft of the report, investigation, and formal analysis. KS reports support for travel or meeting attendance from AbbVie Germany. WCA reports grants from the Gottfried & Julia Bangerter-Rhyner Stiftung, FUNGINOS, and the Swiss National Science Foundation; an internal grant from Kantonsspital St Gallen; honoraria from Pfizer and Medscape; and compensation for participation on a data safety monitoring board from Merck Sharp & Dohme and Sanofi. JvK reports honoraria from AbbVie, Bristol Myers Squibb (BMS), Boehringer-Ingelheim, GlaxoSmithKline, Menarini, Novartis, Pfizer, and Sanofi. AR-R reports consulting fees from AbbVie, Gilead, Lilly, BMS, and Sanofi; honoraria from AbbVie, Pfizer, Sanofi, UCB, BMS, Lilly, Gilead, and Roche; payment for expert testimony from AbbVie and Gilead; support for travel or meeting attendance from Sanofi, Roche, and AbbVie; and compensation for participation on a data safety monitoring board from R-Pharm. All other authors declare no competing interests.

Kristin Schmiedebeg, Nicolas Vuilleumier, Sabrina Pagano, Werner C Albrich, Burkhard Ludewig, Johannes von Kempis, *Andrea Rubbert-Roth
andrea.rubbert-roth@kssg.ch

Division of Rheumatology (KS, JvK, AR-R), Division of Infectious Diseases and Hospital Epidemiology (WCA), and Institute of Immunobiology (BL), Kantonsspital St Gallen, 9007 St Gallen, Switzerland (KS); Laboratory Medicine Division, Geneva University Hospitals, Geneva, Switzerland (NV, SP); Institute of Experimental Immunology, University of Zurich, Zurich, Switzerland (BL)

- 1 Shrotri M, Navaratnam AMD, Nguyen V, et al. Spike-antibody waning after second dose of BNT162b2 or ChAdOx1. *Lancet* 2021; **398**: 385–87.
- 2 Bar-On YM, Goldberg Y, Mandel M et al. Protection of BNT162b2 vaccine booster against COVID-19 in Israel. *N Engl J Med* 2021; **385**: 1393–1400.
- 3 Kamar N, Abravanel F, Marion O et al. Three doses of an mRNA Covid-19 vaccine in solid-organ transplant recipients. *N Engl J Med* 2021; **385**: 661–62.
- 4 Connolly CM, Teles M, Frey S, et al. Booster-dose SARS-CoV-2 vaccination in patients with autoimmune disease: a case series. *Ann Rheum Dis* 2021; published online Sept 7. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2021-221206>.
- 5 Rubbert-Roth A, Vuilleumier N, Ludewig B et al. Anti-SARS-CoV-2 mRNA vaccine in patients with rheumatoid arthritis. *Lancet Rheumatol* 2021; **3**: e470–72.
- 6 Furer V, Eviatar T, Zisman D et al. Immunogenicity and safety of the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine in adult patients with autoimmune inflammatory rheumatic diseases and in the general population: a multicentre study. *Ann Rheum Dis* 2021; **80**: 1330–38.
- 7 Resman Rus K, Korva M, Knap N, et al. Performance of the rapid high-throughput automated electrochemiluminescence immunoassay targeting total antibodies to the SARS-CoV-2 spike protein receptor binding domain in comparison to the neutralization assay. *J Clin Virol* 2021; **139**: 104820.
- 8 Park JK, Lee YJ, Shin K, et al. Impact of temporary methotrexate discontinuation for 2 weeks on immunogenicity of seasonal influenza vaccination in patients with rheumatoid arthritis: a randomised clinical trial. *Ann Rheum Dis* 2018; **77**: 898–904.
- 9 Bergwerk M, Gonen T, Lustig Y, et al. Covid-19 breakthrough infections in vaccinated health care workers. *N Engl J Med* 2021; **385**: 1474–84.
- 10 Krause PR, Fleming TR, Peto R et al. Considerations in boosting COVID-19 vaccine immune responses. *Lancet* 2021; **398**: 1377–80.

Cellular and humoral immunity after the third dose of SARS-CoV-2 vaccine in patients treated with rituximab



Humoral and cell-mediated immune responses are blunted after SARS-CoV-2 vaccination in patients with a history of CD20 B-cell-depleting treatment.¹ However, vaccination induces SARS-CoV-2-specific antibodies in patients treated with rituximab once peripheral B cells at least partially repopulate.² Moreover, SARS-CoV-2-specific T cells, which have been found in 58% of patients who have had two doses of SARS-CoV-2 vaccine (either mRNA-1273 [Moderna] or BNT162b2 [tozinameran; Pfizer–BioNTech]),³ might exert protective effects independent of antibody responses. The question of repeat vaccine doses for serological non-responders to induce more robust immunological responses has been raised.³ However, little is known to

date regarding response to a third dose of vaccine in patients treated with rituximab, who are particularly prone to develop severe COVID-19.⁴

In France, a systematic third dose of vaccine with mRNA-1273, BNT162b2, or ChAdOx1 nCoV-19 (Oxford–AstraZeneca) was recommended in highly immunocompromised patients (including patients treated with rituximab, mycophenolate mofetil, or cyclophosphamide) at least 1 month after the second dose, with no requirement for assessing serological response before the third dose. Given the uncertainties about the effectiveness of this measure in patients in whom B lymphocytes are not repopulated at the time of the third dose, we investigated the course of

Published Online
November 8, 2021
[https://doi.org/10.1016/S2665-9913\(21\)00351-9](https://doi.org/10.1016/S2665-9913(21)00351-9)

Comment

	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6	Patient 7	Patient 8	Patient 9	Patient 10
Sex	Female	Male	Female	Female	Female	Female	Female	Female	Female	Male
Age, years	82	74	73	77	82	71	70	39	70	64
Biologic treatment	Rituximab	Rituximab	Rituximab	Rituximab	Rituximab	Rituximab	Rituximab	Rituximab	Rituximab	Rituximab
Dose of last rituximab therapy	500 mg	500 mg	500 mg (x2)	1000 mg	1000 mg	500 mg (x2)	500 mg	500 mg (x2)	500 mg	1000 mg
Associated conventional synthetic DMARDs	NA	Oral methotrexate 20 mg per week	Subcutaneous methotrexate 15 mg per week	NA	NA	NA	NA	Subcutaneous methotrexate 25 mg per week	Subcutaneous methotrexate 12.5 mg per week	Subcutaneous methotrexate 25 mg per week
Corticosteroids	Prednisone 10 mg per day	Prednisone 10 mg per day	NA	NA	NA	NA	NA	Prednisone 20 mg per day	NA	NA
Condition	Rheumatoid arthritis	Rheumatoid arthritis	Rheumatoid arthritis	Rheumatoid arthritis	Rheumatoid arthritis	Stiff-person syndrome	Rheumatoid arthritis	Rheumatoid arthritis	Rheumatoid arthritis	Rheumatoid arthritis
Number of anterior rituximab therapy cycles	5	5	6	11	4	2	14	2	12	3
Vaccine administered for first two doses	mRNA-1273 (Moderna)	mRNA-1273 (Moderna)	mRNA-1273 (Moderna)	mRNA-1273 (Moderna)	BNT162b2 (Pfizer-BioNTech)	BNT162b2 (Pfizer-BioNTech)	BNT162b2 (Pfizer-BioNTech)	BNT162b2 (Pfizer-BioNTech)	BNT162b2 (Pfizer-BioNTech)	ChAdOx1 nCoV-19 (Oxford-AstraZeneca)
Vaccine administered as third dose	mRNA-1273 (Moderna)	mRNA-1273 (Moderna)	mRNA-1273 (Moderna)	mRNA-1273 (Moderna)	BNT162b2 (Pfizer-BioNTech)	BNT162b2 (Pfizer-BioNTech)	BNT162b2 (Pfizer-BioNTech)	BNT162b2 (Pfizer-BioNTech)	BNT162b2 (Pfizer-BioNTech)	BNT162b2 (Pfizer-BioNTech)
Time between last infusion and first dose of vaccine (days)	218	6	384	183	277	84	235	158	279	277
Time between second and third dose of vaccine (days)	110	105	98	98	91	91	74	74	94	81
At the time of third dose										
IgG concentration, g/L	7.8	10.5	6.0	13.1	15.3	11.5	6.8	7.5	4.6	17.5
B lymphocyte, cells per μ L	36	0	20	0	1	0	86	1	81	95
T lymphocyte, cells per μ L	1917	740	906	1310	573	1227	1195	1253	677	581
CD4 T lymphocyte, cells per μ L	1054	551	847	740	354	866	936	868	562	504
CD8 T lymphocyte, cells per μ L	792	172	50	525	210	337	244	393	84	86
Anti-SARS-CoV-2 serology										
Day of third dose	Positive	Negative	Positive	Positive	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Positive
1 month after third dose	Positive	Negative	Positive	Positive	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Positive
Neutralising antibodies										
Day of third dose	Negative	Negative	Negative	Positive	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
1 month after third dose	Positive	Negative	Negative	Positive	Negative	Negative	Positive	Negative	Positive*	Positive

DMARDs=disease-modifying antirheumatic drugs. NA=not applicable. *Only for D614G strain and negative for B.1.351.

Table: Patients' characteristics and laboratory results

humoral and cellular immunity against SARS-CoV-2 in ten patients treated with rituximab after two and three vaccine doses. These patients were recruited from our

day hospital, and the only inclusion criterion was that they had not received a third dose of vaccine. Blood samples were taken from patients twice: just before

the third vaccine dose (reflecting their immunity after two doses) and 1 month after the third dose. Samples were stored at -150°C . Analyses of all samples from the same patients were done at the virology laboratory of the University Hospital of Strasbourg at the same time by virologists (FG and SF-K) who were masked to the patients' characteristics and to the date of sampling. To explore the SARS-CoV-2-specific T-cell response, IFN- γ enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay was performed (appendix p 3).⁵ For each sample tested, we had a negative control sample against which T-cell response was determined. Positivity was defined as a T-cell response at least 3 SDs larger than that of the negative control against which it was tested. Serology was done using the SARS-CoV-2 IgG II Quant (Spike) commercial assay (Abbott Architect, Chicago IL, USA) that quantifies anti-RBD IgG with 7.1 binding arbitrary units per mL (50 arbitrary units per mL) as a positive cutoff (appendix p 3). Neutralising antibody titres were measured for each serum sample using an in-house viral pseudoparticle-based assay. Results were expressed as the log₁₀ of the sample dilutions that yielded 50% inhibition of pseudoparticle infectivity (log₁₀ IC₅₀). Serum samples were considered neutralising if the 1/40 dilution (1.60 log₁₀) mediated at least a 50% luminometric signal reduction relative to the control condition without serum sample. B-cell depletion was assessed in each patient by phenotyping lymphocyte subpopulations just before the third vaccine dose using routine flow cytometry. Verbal informed consent was obtained from patients. The study was approved by the ethics review board of Strasbourg medical faculty (number CE-2021-103).

Between May 10 and June 22, 2021, we recruited ten patients, of whom eight (80%) were women and two (20%) were men, with a median age of 72.0 years (IQR 68.5-78.0). All patients were treated with rituximab for rheumatoid arthritis except one, who was treated for stiff-person syndrome. Five (50%) had concomitant methotrexate and three (30%) had concomitant steroids. No patient had a change in concomitant disease modifying antirheumatic drug (DMARD) or corticosteroid treatment between the first and third dose of vaccine. Patients had previously received a median of 5 cycles (IQR 3-11) of rituximab. Median time between last rituximab infusion and first dose of vaccine was 227 days (IQR 140-278).

Median time between second and third dose of vaccine was 65 days (IQR 56-70). For their two first doses, five patients were vaccinated with BNT162b2, four with mRNA-1273, and one with ChAdOx1 nCoV-19. All received a third dose of either mRNA-1273 or BNT162b2. Patients' demographic and clinical characteristics are shown in the table and virological results are in the appendix (p 2).

After two doses of vaccine, three (30%) of ten patients were seronegative (patients 2, 6, and 8), and one had no detectable T-cell response (patient 10; appendix p 1). Only one patient had detectable neutralising antibodies (patient 4; table). As previously reported,² humoral and cellular responses were dissociated, with two seronegative patients (patients 2 and 6) having a detectable T-cell response, of whom one had more than 1000 spot forming units per million peripheral blood mononuclear cells (patient 6). Conversely, five seropositive patients (patients 3, 5, 7, 9, and 10) had a quite weak T-cell responses; although no protective T-cell protective threshold could be defined (appendix p 1).

After the third vaccine dose, all three previously seronegative patients (patients 2, 6, and 8) remained seronegative and had only a slightly increased T-cell response after three doses compared with before the third dose (table; appendix pp 1-2). All three non-responders to the third dose had complete B cell depletion at the time of this dose. The only patient (patient 10) who was previously seropositive but did not have a detectable T-cell response developed a T-cell response after the third dose. After the third dose, a neutralising antibody response developed in three additional patients who were previously seropositive but without detectable neutralising antibodies after two doses (table; appendix p 2).

We found that some patients who have been treated with rituximab can develop anti-SARS-CoV-2 humoral response after two vaccine doses. The third dose might help some of these patients to acquire a neutralising antibody response or to develop a T-cell response, or both. All seronegative patients and those with B-cell depletion after two doses remained seronegative after the third dose. The seven patients who were seropositive after three doses generally had more circulating B cells at the time of the third dose than the three seronegative patients (median of 36 cells per μL [IQR 1-86] vs 0 cells per μL [0-1]; Wilcoxon test $p=0.064$). We found a

See Online for appendix

significant correlation between B-cell count at the time of the third dose of vaccine and neutralising antibody concentrations 1 month after the third dose (Spearman's r^2 0.81; $p=0.0009$). We found no statistical correlation between T-cell count or T-cell subsets in terms of humoral or cellular response (appendix p 4).

Our results, which must still be confirmed in ongoing larger studies due to the small sample size of the present study, support delaying the third dose of SARS-CoV-2 vaccine until B-cell repopulation. In seronegative patients, assessment of T-cell responses might be useful to identify patients with neither humoral nor cellular immunity. In seronegative patients treated with rituximab, the crucial questions to be further assessed concern the protection conferred by isolated cellular responses and the optimal strategy between waiting for B-cell repopulation, prophylactic anti-SARS-CoV-2 monoclonal antibody therapy in those who are highly immunocompromised (currently recommended in France⁶), or curative anti-SARS-CoV-2 monoclonal antibody therapy in cases of SARS-CoV-2 infection.

There was no funding for this study. LA declares consulting fees from AstraZeneca, Janssen, and BMS, unrelated to the current work. All other authors declare no competing interests. RF and FG contributed equally and have directly accessed and verified the underlying data. All authors contributed to the concept, design and drafting of the study and have approved the final version.

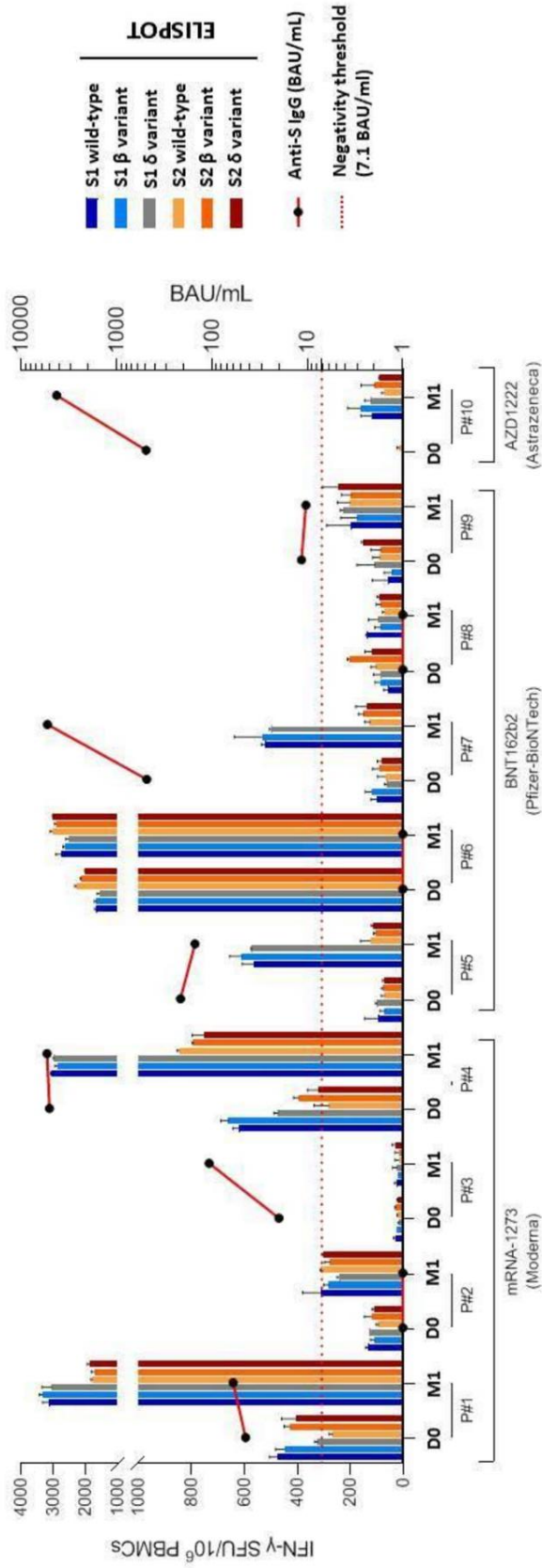
*Renaud Felten, Floriane Gallais, Cédric Schleiss, Emmanuel Chatelus, Rose-Marie Javier, Luc Pijenburg, Christelle Sordet, Jean Sibilia, Laurent Arnaud, Samira Fafi-Kremer, *Jacques-Eric Gottenberg*
jacques-eric.gottenberg@chru-strasbourg.fr

Service de Rhumatologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France, CNR RESO, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France (RF, EC, R-MJ, LP, CS, JS, LA, J-EG); Laboratoire d'Immunopathologie et de Chimie Thérapeutique, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IBMC), CNRS UPR3572, Strasbourg, France (RF, CS, J-EG); Virology Laboratory, Strasbourg University Hospital, Strasbourg, France (FG, SF-K)

- 1 Moor MB, Suter-Riniker F, Horn MP, et al. Humoral and cellular responses to mRNA vaccines against SARS-CoV-2 in patients with a history of CD20 B-cell-depleting therapy (RituxiVac): an investigator-initiated, single-centre, open-label study. *Lancet Rheumatol* 2021; **3**: e789-97.
- 2 Mrak D, Tobudic S, Koblischke M, et al. SARS-CoV-2 vaccination in rituximab-treated patients: B cells promote humoral immune responses in the presence of T-cell-mediated immunity. *Ann Rheum Dis* 2021; **80**: 1345-50.
- 3 Predecki M, Clarke C, Edwards H, et al. Humoral and T-cell responses to SARS-CoV-2 vaccination in patients receiving immunosuppression. *Ann Rheum Dis* 2021; **80**: 1322-29.
- 4 Felten R, Duret P-M, Bauer E, et al. B-cell targeted therapy is associated with severe COVID-19 among patients with inflammatory arthritides: a 1-year multicentre study in 1116 successive patients receiving intravenous biologics. *Ann Rheum Dis* 2021; published online Sept 23. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2021-220549>.
- 5 Gallais F, Velay A, Nazon C, et al. Intrafamilial exposure to SARS-CoV-2 associated with cellular immune response without seroconversion, France. *Emerg Infect Dis* 2021; **27**: 113-21.
- 6 Haute Autorité de Santé. COVID-19: early access authorization granted to prophylactic treatment. Aug 6, 2021. https://www.has-sante.fr/jcms/p_3281999/fr/covid-19-autorisation-d-acces-precoce-accordee-a-un-traitement-prophylactique (accessed Oct 29, 2021; in French).

APPENDIX

Appendix Figure 1. Humoral and cellular response before and one month after a third vaccine dose



BAU: binding antibody units; IFN: Interferon; IgG: immunoglobulin G; D0: day of third of vaccine; M1: one month after third dose of vaccine;

P#1: Patient #1; PBMCs: peripheral blood mononuclear cells.

Appendix Table 1. Detailed ELISPOT, serology and neutralization results

Visit	#1		#2		#3		#4		#5		#6		#7		#8		#9		#10		
	D0	M1	D0	M1	D0	M1	D0	M1	D0	M1	D0	M1	D0	M1	D0	M1	D0	M1	D0	M1	
Mean SFU/mL	ELISPOT ¹																				
	S1 wild-type	474,0	3148,0	134,0	312,0	28,7	26,0	621,3	3046,0	96,0	562,7	1682,7	2738,0	101,3	522,0	59,3	139,3	58,0	198,7	58,0	118,0
	S2 wild-type	268,0	1796,0	94,0	310,0	20,7	18,0	281,3	846,0	72,0	124,7	2294,7	3042,0	69,3	126,0	103,3	73,3	90,0	202,7	90,0	74,0
	S1 variant β	448,0	3334,0	110,0	282,0	26,7	20,0	661,3	2878,0	72,0	610,7	1648,7	2646,0	119,3	534,0	87,3	85,3	42,0	174,7	42,0	162,0
	S2 variant β	430,0	1710,0	120,0	278,0	28,7	18,0	395,3	792,0	76,0	106,7	2140,7	2920,0	93,3	150,0	205,3	85,3	84,0	196,7	84,0	108,0
	S1 variant δ	324,0	3056,0	128,0	242,0	14,7	24,0	475,3	2990,0	100,0	572,7	1564,7	2538,0	63,3	500,0	87,3	97,3	108,0	226,7	108,0	124,0
	S2 variant δ	406,0	1868,0	110,0	300,0	18,7	32,0	319,3	752,0	70,0	112,7	2010,7	3012,0	81,3	138,0	117,3	91,3	150,0	246,7	150,0	90,0
	SD S1 wild-type	31,1	186,7	8,5	67,9	8,5	8,5	22,6	36,8	50,9	45,3	33,9	178,2	22,6	14,1	14,1	2,8	59,4	90,5	59,4	42,4
SD S2 wild-type	11,3	33,9	8,5	2,8	2,8	14,1	56,6	8,5	11,3	36,8	39,6	59,4	28,3	19,8	19,8	5,7	25,5	45,3	25,5	8,5	
SD S1 variant β	33,9	99,0	14,1	19,8	0,0	0,0	28,3	76,4	17,0	45,3	76,4	48,1	25,5	104,7	19,8	22,6	31,1	62,2	31,1	48,1	
SD S2 variant β	19,8	110,3	28,3	19,8	2,8	14,1	19,8	5,7	5,7	5,7	19,8	39,6	22,6	19,8	5,7	17,0	39,6	36,8	39,6	50,9	
SD S1 variant δ	11,3	294,2	0,0	8,5	5,7	17,0	14,1	8,5	5,7	2,8	70,7	70,7	8,5	5,7	25,5	33,9	67,9	11,3	67,9	22,6	
SD S2 variant δ	53,7	79,2	8,5	5,7	5,7	11,3	42,4	45,3	8,5	8,5	11,3	11,3	17,0	42,4	28,3	8,5	8,5	56,6	8,5	2,8	
Anti-S IgG (BAU/mL)	Serology ²																				
	44,6	60,3	1,0	1,0	20,0	107,5	5057,8	5383,5	214,4	150,7	1,0	1,0	484,3	5305,9	1,0	1,0	11,6	10,4	11,6	4256,1	
Neutralization	Neutralization ³																				
	D614G Strain	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Pos
B.1.351	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos

BAU: binding antibody units; IgG: immunoglobulin G; D0: day of third of vaccine; M1: one month after third dose of vaccine; #1: Patient #1;

Neg: negative; Pos: positive.

¹ Positivity was defined as a T-cell response ≥ 3 times the standard deviation of the negative controls.

² Serology evaluation was performed using the SARS-CoV-2 IgG II Quant (Spike) commercial assay (Abbott Architect) that quantifies anti-RBD IgG with 7.1 BAU/mL (50 AU/mL) as a positive cut-off.

³ Sera were considered neutralizing if the 1:40 dilution did mediate at least a 50% luminometric signal reduction relative to the control condition without serum.

Appendix Methods

The study was approved by the ethic review board of Strasbourg medical faculty (#CE-2021-103).

To explore the SARS-CoV-2-specific T-cell response, interferon gamma (IFN- γ) enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay was performed in duplicate analyses with 250,000 peripheral blood mononuclear cells seeded per well.⁵ Reactivity was tested towards the N-terminal part (referred to S1, containing the RBD region) and the C-terminal part (referred to S2) of the spike protein for the wild-type strain and the variants carrying immune escape mutations (i.e. the B.1.351 [beta] and B.1.617.2 [delta] variants). Results were expressed as mean number of spot-forming units/ 10^6 PBMCs after subtraction of the background value. Positivity was defined as a T-cell response ≥ 3 times the standard deviation of the negative controls. Serology evaluation was performed using the SARS-CoV-2 IgG II Quant (Spike) commercial assay (Abbott Architect) that quantifies anti-RBD IgG with 7.1 BAU/mL (50 AU/mL) as a positive cut-off. Neutralizing antibody titers were measured for each serum using a viral pseudoparticle-based assay. Briefly, we used SARS-CoV-2 spike pseudotyped viruses produced using a packaging vector encoding murine leukemia virus (MLV) gag/pol and a defective MLV vector genome encoding firefly luciferase as reporter. These Pseudoparticles pseudoparticles harboring the S protein of D614G strain or beta variant (D614G, N501Y, K417N and E484K mutations) on their surface and encoding for a luciferase reporter gene were preincubated for 1 hour at +37°C with serial serum dilutions. The mix were added to 293T-ACE2 target cells plated in 96-well plates with 30,000 cells per well. The luciferase signal was measured after 72h incubation at 37°C. Results were expressed as the log₁₀ of the sample dilutions that yielded 50% inhibition of pseudoparticle infectivity (log₁₀ IC₅₀). Sera were considered neutralizing if the 1:40 dilution (1.60 log₁₀) did mediate at least a 50% luminometric signal reduction relative to the control condition without serum. B-cell depletion was assessed in each patient by phenotyping lymphocyte subpopulations at the time of the 3rd vaccine dose.

Appendix Results

We found no statistical correlation between T-cell count or T-cell subsets in terms of humoral or cellular response:

- T-cell count at the time of the third dose of vaccine and neutralising antibodies levels 1 month after the third dose (Spearman's r^2 0.068; $p=0.47$)
- CD4⁺ T cell count at the time of the third dose of vaccine and neutralising antibodies levels 1 month after the third dose (Spearman's r^2 0.025; $p=0.66$)
- CD8⁺ T cell count at the time of the third dose of vaccine and neutralising antibodies levels 1 month after the third dose (Spearman's r^2 0.08; $p=0.43$)
- T-cell count at the time of the third dose of vaccine and Anti-S IgG levels (BAU/mL) 1 month after the third dose (Spearman's r^2 0.0012; $p=0.92$)
- CD4⁺ T cell count at the time of the third dose of vaccine and Anti-S IgG levels (BAU/mL) 1 month after the third dose (Spearman's r^2 0.0015; $p=0.91$)
- CD8⁺ T cell count at the time of the third dose of vaccine and Anti-S IgG levels (BAU/mL) 1 month after the third dose (Spearman's r^2 0.00094; $p=0.93$)
- T-cell count at the time of the third dose of vaccine and ELISPOT (mean SFU/mL) 1 month after the third dose (Spearman's r^2 0.32; $p=0.088$)
- CD4⁺ T cell count at the time of the third dose of vaccine and ELISPOT (mean SFU/mL) 1 month after the third dose (Spearman's r^2 0.20; $p=0.20$)
- CD8⁺ T cell count at the time of the third dose of vaccine and ELISPOT (mean SFU/mL) 1 month after the third dose (Spearman's r^2 0.30; $p=0.10$)

D. Discussion

Une réponse humorale a été mise en évidence dès la seconde dose vaccinale chez la majorité des patients traités par rituximab inclus dans cette étude, et tous sauf un avaient développé une réponse cellulaire. Cette fréquence de réponse vaccinale est relativement élevée au regard des données de la littérature. En effet, une étude menée sur une centaine de patients sous rituximab a décrit une séroconversion chez 49 % d'entre eux et une réponse cellulaire dans 32 % des cas après l'administration de deux doses de vaccin à ARNm (493). Une seconde étude rapporte un taux de séroconversion plus faible (39 %), avec seulement 1 répondeur parmi les 36 patients sans lymphocytes B périphériques détectables tandis qu'un taux de réponse de 74 % a été observé chez les 38 patients avec des lymphocytes B détectables (494). Une réponse cellulaire a été mise en évidence dans 58 % des cas dans cette seconde étude, indépendamment de la réponse humorale, avec 29 % des patients ne présentant aucune réponse humorale ni cellulaire. Enfin, une étude décrit quant à elle une réponse humorale chez 89 % des patients traités par anticorps anti-CD20 bien que retardée et de plus faible intensité, et une réponse cellulaire constante et conservée en comparaison des donneurs sains (495). Une méta-analyse récente fait le bilan d'un taux de séroconversion global de 40 % et de 71 % réponse cellulaire après la seconde dose (502). La fréquence plus élevée de réponse humorale (70 %) et cellulaire (90 %) observée après deux doses dans notre étude est possiblement liée au faible effectif de patient inclus, ainsi qu'à l'écart d'au moins 6 mois séparant la dernière dose de rituximab et la vaccination chez la majorité (7/10) des individus, ces derniers ayant tous développé des anticorps détectables. En effet, plusieurs équipes ont identifié le délai écoulé depuis la dernière dose de rituximab comme l'un des éléments déterminants pour la réponse vaccinale sous rituximab (493,502–504). La présence de lymphocytes B circulants détectables est un autre facteur clé associé au développement d'une réponse humorale (486,494,502). Ce paramètre n'a pas été évalué lors de l'administration de la première dose chez les patients inclus dans notre étude, mais sa mesure lors de la troisième dose en est probablement un reflet fidèle. Ainsi, les trois patients restés

séronégatifs après deux doses avaient une déplétion profonde en lymphocytes B ($\leq 1/\mu\text{L}$), tandis que tous ceux avec une concentration supérieure à $1/\mu\text{L}$ ont produit des anticorps détectables.

Les tests de neutralisation réalisés dans notre étude ont révélé que la réponse humorale n'était que peu fonctionnelle chez les patients séropositifs en IgG anti-RBD après deux doses, avec un pouvoir neutralisant des variants D614G et beta mis en évidence uniquement chez le patient avec plus de 1000 BAU/mL. De même, une étude similaire portant sur 20 patients sous rituximab décrit une réponse humorale anti-S dans 50 % des cas, mais une neutralisation du variant alpha chez seulement l'un d'entre eux (5 %), et ce sans neutralisation du variant delta (505). Ce défaut de neutralisation chez les répondeurs à la vaccination sous rituximab est la conséquence directe de titres d'anticorps trop faibles. Il pourrait aussi être lié à un défaut de sélection des lymphocytes B les plus affins pour les épitopes cibles de la neutralisation au sein de la protéine S, mais cette hypothèse reste à vérifier (505).

À l'inverse de la réponse humorale, une réponse cellulaire dirigée contre la protéine S a été mise en évidence chez l'essentiel des sujets (9/10) dans notre étude après deux doses, d'intensité relativement importante et comparable à celle mesurée chez des sujets sains après infection lors de notre précédente étude. Cette réponse cellulaire était équivalente entre tous les variants testés, à l'instar de la population générale vaccinée (413), et totalement dissociée de la réponse humorale. Cette absence de corrélation entre ces deux pans de la réponse immunitaire a également été rapportée dans la littérature dans ce contexte (494,505,506). Elle s'explique par une polarisation conservée des lymphocytes T vers une polarisation Th1 sous rituximab, ainsi que par une réponse T CD8 robuste, malgré un impact délétère du traitement sur la concentration des LTfh circulants. Une étude rapporte même une activation plus importante des LT CD8+ après vaccination des personnes traitées par rituximab en comparaison des sujets sains, en particulier en l'absence de séroconversion (495). Ceci pourrait expliquer la réactivité cellulaire importante observée chez le patient n°6 dans notre

étude, avec plus de 1000 SFU/millions de PBMCs déjà après la seconde dose vaccinale malgré l'absence d'anticorps détectables.

L'administration d'une troisième dose après un délai d'environ 3 mois n'a pas permis d'entraîner de nouvelles séroconversions dans notre étude. Cependant, elle a renforcé le pouvoir neutralisant des anticorps des patients séropositifs et la fréquence des lymphocytes T anti-S chez la majorité des patients, et a induit une immunité cellulaire chez le seul patient sans réactivité détectable après deux doses. Ces résultats sont concordants avec ceux de Jyssum et al., qui décrivent le développement d'une réponse T après trois doses chez l'ensemble des 19 patients inclus traités par rituximab, dont cinq patients sans réactivité mise en évidence après deux doses (507). L'absence de séroconversion constatée dans notre étude suite à la troisième dose est également en accord avec les travaux de cette équipe, qui rapporte seulement 16 % de séroconversions parmi 49 participants sous rituximab séronégatifs après deux doses. De même, un taux de séroconversion de 27 % a été rapporté par Bonelli et al. suite à la troisième dose, avec un taux bien plus important observé chez les patients avec des lymphocytes B périphériques détectables au moment de la troisième dose qu'en l'absence de ces derniers (67 % vs. 8 %) (508). En ligne avec cette observation, les trois patients sans séroconversion dans notre étude n'avaient pas ou que très peu ($1/\mu\text{L}$) de lymphocytes B détectés dans le sang au moment de la troisième dose.

Au vu de l'ensemble de ces résultats, il paraît souhaitable de retarder l'administration d'une troisième dose de vaccin en cas de déplétion profonde en lymphocytes B chez les patients sous rituximab, afin de laisser le temps nécessaire à la reconstitution des lymphocytes B. Toutefois, cette reconstitution peut prendre plus d'un an chez certains patients, et la stratégie de protection est à évaluer au cas par cas, notamment en envisageant l'option d'une prophylaxie par anticorps monoclonaux (486). Ce choix devrait notamment prendre en compte le délai écoulé depuis la dernière dose de rituximab, le risque d'infection et de forme sévère, et éventuellement le niveau de la réponse cellulaire au vaccin. Le niveau de protection conféré par une réponse cellulaire isolée chez ces patients reste cependant à déterminer, avec des

premiers résultats encourageants chez les patients d'oncohématologie traités par rituximab (509). Enfin, d'autres études sont nécessaires pour établir si les patients vaccinés sous rituximab présentent un risque accru de forme sévère en comparaison de la population générale.

II. Réponse vaccinale chez les patients transplantés pulmonaires

A. Contexte et objectifs de l'étude

De même que les patients traités par rituximab, les patients transplantés pulmonaires (TP) présentent un risque accru de forme sévère à la COVID-19 (510,511), et ne répondent que faiblement à la vaccination contre le SARS-CoV-2 du fait des fortes doses d'immunosuppresseurs qu'ils reçoivent pour prévenir le rejet du greffon. Ainsi, leur taux de séroconversion après l'administration de deux doses de vaccin à ARNm varie de 0 à 40 % selon les études, ce qui est plus faible que chez les autres populations de transplantés d'organe solide (34 à 54 %) (424). L'administration d'une troisième dose vaccinale a été recommandée au cours de la primo-vaccination de ces patients, comme pour tous les patients sévèrement immunodéprimés, au moins quatre semaines après la deuxième dose ou dès que possible pour les personnes ayant dépassé ce délai (402). Devant le manque de données disponibles quant au bénéfice de cette dose supplémentaire chez les patients TP, nous avons mené une étude rétrospective sur la réponse vaccinale des patients suivis en pneumologie aux Hôpitaux Universitaires de Strasbourg. Dans le cadre de cette étude, un suivi sérologique a été réalisé en quantifiant les IgG anti-RBD à partir des échantillons sanguins disponibles prélevés avant vaccination et après chacune des trois doses de vaccin à ARNm chez une cohorte de 126 patients TP naïfs d'infection et 10 patients avec un antécédent de COVID-19 avant vaccination. La fonctionnalité de la réponse humorale a également été évaluée chez les patients séropositifs après la 3^e dose (répondeurs) via le titrage des anticorps neutralisants sur pseudo-particules virales de la souche ancestrale D614G et des variants delta et omicron. Enfin, nous avons recherché des facteurs cliniques et biologiques prédictifs de la réponse vaccinale humorale chez les patients non infectés, en s'intéressant en particulier à la charge virale du Torque teno virus (TTV). Ce petit virus non enveloppé à ADN, très répandu dans la population générale et sans pathogénicité connue, représente le constituant majoritaire du

virome dans le compartiment sanguin (512). Près de la moitié des sujets sains présentent une virémie persistante de TTV, avec des charges virales généralement inférieures à $4 \log_{10}$ cp/mL (513,514). La réplication du TTV s'intensifie sous traitement immunosuppresseur, ce qui en fait un marqueur potentiel de l'intensité globale d'immunosuppression, notamment chez les patients transplantés. Dans cette hypothèse, nous avons exploré l'intérêt de ce biomarqueur dans la prédiction de la réponse humorale développée par les patients TP après trois doses de vaccin à ARNm. Sa valeur prédictive a été évaluée d'une part dans le cas d'une mesure précoce de la charge virale avant toute vaccination, et d'autre part avec une mesure avant la troisième dose chez les patients restés séronégatifs après deux doses de vaccin.

B. Principaux résultats

Les 10 TP précédemment infectés étaient tous séropositifs avant vaccination, mais seul l'un d'entre eux présentait une sérologie avec plus de 264 BAU/mL. Ce titre actuellement considéré dans les recommandations françaises pour définir une réponse satisfaisante au vaccin a été atteint par huit des dix TP après l'administration de trois doses de vaccin, avec une persistance au-dessus de ce seuil jusqu'à au moins sept mois de suivi. L'ensemble de ces huit patients neutralisaient la souche D614G après la troisième dose et sept d'entre eux neutralisaient également les variants delta et omicron.

Parmi les 126 TP sans antécédent de COVID-19 lors de la vaccination, aucun des 47 patients prélevés après la première dose n'avait séroconverti. Une réponse en anticorps a été constatée chez 13 % (7/54) des TP après la seconde dose et 37,3 % (47/126) après la troisième dose (répondeurs), dont moins d'un tiers (29,8 %) avaient des titres en anticorps supérieurs à 264 BAU/mL. Un pouvoir neutralisant des anticorps a été mis en évidence chez près de la moitié (46,8 %) des répondeurs contre la souche D614G et chez près d'un tiers (31,9%) contre le variant delta, mais aucun d'entre eux ne neutralisait le variant omicron. Des IgG anti-RBD étaient encore détectables chez 76,2 % (16/21) des répondeurs qui ont été suivis jusqu'à six à huit mois après la troisième dose, mais avec des titres tous inférieurs à 264

BAU/mL. Trois cas sévères de COVID-19 ont été diagnostiqués au cours du suivi clinique plus de six mois après la troisième dose, touchant deux patients non répondeurs et un patient répondeur à la troisième dose mais ne neutralisant que faiblement le variant delta responsable de l'infection.

Chez les TP sans antécédent de COVID-19, l'analyse de la charge virale prévacinale de TTV comme potentiel biomarqueur prédictif de la réponse vaccinale a montré une réplication virale plus intense chez les TP non répondeurs en comparaison des répondeurs ($p = 0,004$). Un seuil discriminant de $6,2 \log_{10}$ cp/mL a été établi sur la base d'une courbe ROC (*Receiver Operating Characteristic*) : une séroconversion après trois doses a été mise en évidence dans 47,9 % (45/94) des cas de charge virale de TTV inférieure à ce seuil, et dans 6,5 % (2/31) des cas avec une charge virale supérieure ($p < 0,001$), correspondant à une valeur prédictive négative de séroconversion de 93,5 %. Une analyse multivariée portant sur les facteurs cliniques et biologiques prédictifs de la réponse vaccinale a confirmé que le risque de défaut de réponse était plus important en cas de charge virale de TTV supérieure à $6,2 \log_{10}$ cp/mL avant vaccination (Odds Ratio ajusté (OR) = 17,87, IC95 = 3,02-105,72), mais aussi avec le vaccin de Pfizer-BioNTech en comparaison du vaccin de Moderna (OR = 6,72, IC95 = 1,75-25,92) et sous traitement immunosuppresseur incluant le mycophénolate (OR = 4,73, CI95 = 1,46-15,34).

Enfin, parmi les 47 TP avec une sérologie négative après la seconde dose, l'administration de la troisième dose a entraîné une séroconversion dans 25,5 % (12/47) des cas, avec un titre d'au moins 264 BAU/mL atteint pour un seul patient. La charge virale de TTV mesurée juste avant la troisième dose avait une forte valeur prédictive de réponse chez ce sous-groupe de patients. En effet, aucun cas de séroconversion n'est survenu chez les 19 TP avec une charge virale supérieure au seuil péjoratif de $6,2 \log_{10}$ cp/mL, tandis que neuf des dix TP avec une charge virale inférieure à $3,2 \log_{10}$ cp/mL ont développé des IgG anti-RBD détectables après la troisième dose.

C. Article n°4

Torque teno virus DNA load as a predictive marker of antibody response to a three-dose regimen of COVID-19 mRNA-based vaccine in lung transplant recipients.

Floriane Gallais, Benjamin Renaud-Picard, Morgane Solis, Elodie Laugel, Eric Soulier, Sophie Caillard, Romain Kessler, Samira Fafi-Kremer.

Article soumis à la revue *The Journal of Heart and Lung Transplantation* le 6 mars 2022, actuellement en révision.

1 **Torque teno virus DNA load as a predictive marker of antibody response to a three-**
2 **dose regimen of COVID-19 mRNA-based vaccine in lung transplant recipients**

3
4 Floriane Gallais, PharmD,^{a,b} Benjamin Renaud-Picard, MD,^c Morgane Solis, PharmD, PhD,^{a,b}
5 Elodie Laugel, MD,^{a,b} Eric Soulier,^b Sophie Caillard, MD, PhD,^{b,d} Romain Kessler, MD, PhD,^c
6 Samira Fafi-Kremer, PharmD, PhD^{a,b}

7
8 ^aVirology Laboratory, Strasbourg University Hospital, Strasbourg, France;

9 ^bStrasbourg University, INSERM, IRM UMR-S 1109, Strasbourg, France;

10 ^cDepartment of Pneumology, Strasbourg Lung Transplant Program, Strasbourg University
11 Hospital, Strasbourg, France;

12 ^dDepartment of Nephrology and Transplantation, Strasbourg University Hospital, Strasbourg,
13 France.

14
15 **Corresponding author:** Prof. Samira Fafi-Kremer, Virology Laboratory and INSERM UMR_S
16 1109, Strasbourg University Hospital, 3 rue Koeberlé, F-67000 Strasbourg, France; phone:
17 (+33) 3 69 55 14 38; fax: (+33) 3 68 85 37 50; email: samira.fafi-kremer@unistra.fr, ORCID ID
18 #:0000-0003-3886-7833

19
20 **Running title:** TTV load predictive of COVID-19 vaccine response

21 **List of non-standard abbreviations:** BAU: Binding Antibody Unit; ED50: half-maximal
22 effective dilution; MMF/MPA: mycophenolate mofetil / mycophenolic acid, TTV: Torque teno
23 virus.

24 **Word count (manuscript):** 2999 words

25 **Abstract word count:** 237 words

26 **Abstract**

27 **BACKGROUND:** Previous studies have reported that lung transplant recipients (LTR) develop
28 a poor response to two doses of COVID-19 vaccine, but data regarding the third dose are
29 lacking. We investigated the antibody response after three doses of mRNA vaccine in LTR and
30 its predictive factors.

31 **METHODS:** A total of 136 LTR, including 10 LTR previously infected and 126 COVID-19-naive
32 LTR, were followed during and after three doses of mRNA vaccine. We retrospectively
33 measured anti-receptor-binding domain (RBD) IgG response and neutralizing antibodies. The
34 association between vaccine response and patient characteristics, including viral DNA load
35 (VL) of the ubiquitous Torque teno virus (TTV), which reflects the overall immunosuppression,
36 was investigated.

37 **RESULTS:** After three doses, 47/126 (37.3%) COVID-19-naive LTR had positive anti-RBD IgG
38 (responders) and 14/126 (11.1%) had antibody titers above 264 Binding Antibody Units/mL.
39 None neutralized the omicron variant vs. seven of the previously infected LTR. Non-response
40 was associated with TTV VL $\geq 6.2 \log_{10}$ copies (cp)/mL before vaccination (Odds Ratio
41 (OR)=17.87, 95% confidence interval (CI95)=3.02-105.72), mycophenolate treatment
42 (OR=4.73, CI95=1.46-15.34) and BNT162b2 (Pfizer BioNTech, n=34) (vs. mRNA-1273
43 (Moderna, n=101)) vaccine (OR=6.72, CI95=1.75-25.92). TTV VL ≥ 6.2 or $< 3.2 \log_{10}$ cp/mL
44 before the third dose were strongly predictive of low (0/19) and high (9/10) rates of
45 seroconversion in second dose non-responders, respectively.

46 **CONCLUSION:** COVID-19-naive LTR respond poorly to three doses of mRNA vaccine,
47 especially those with high TTV VL. Further studies should evaluate this biomarker as a guide
48 for vaccine strategies.

49

50 Introduction

51 Lung transplant recipients (LTR) are at high risk for severe COVID-19 due to their lung disease
52 and the high doses of immunosuppressive drug therapy they receive to prevent allograft
53 rejection.^{1,2} The highly transmissible omicron variant is resistant to several anti-SARS-CoV-2
54 monoclonal antibodies, and still represents a major issue in this population. Moreover, the
55 combination of protease inhibitors nirmatrelvir/ritonavir (Paxlovid®) is difficult to use in this
56 population due to significant drug interactions. In this context, the COVID vaccine remains the
57 safest strategy to protect LTR from severe disease.

58 By the end of 2020, solid organ transplant recipients were prioritized for COVID-19 mRNA
59 vaccination. However, they have been shown to only develop a poor antibody response (34-
60 54%) to a two-dose vaccine regimen compared to immunocompetent individuals,^{3,4} with lower
61 response observed in LTR (0-40%) than in kidney or liver transplant recipients since they
62 receive higher doses of immunosuppressive drugs.⁵⁻¹¹ Previous studies showed that around
63 half of solid organ recipients who were non-responders to the second dose seroconverted after
64 a third mRNA vaccine dose, given as booster.¹²⁻¹⁵ However, data as to the effectiveness of a
65 third vaccine dose in the population of LTR are still scarce, and markers predictive of vaccine
66 response are awaited. In order to quantify the impact of immunosuppression on vaccine
67 response and hopefully to predict response or nonresponse, one should be able to quantify
68 the level of immunosuppression. Previous studies have reported that the composition of the
69 virome in plasma is affected by immunosuppressant drugs and may therefore predict the state
70 of immunosuppression.¹⁶ In transplant recipients, the virome is mostly composed of
71 *Anelloviridae* (68%) and *Herpesviridae* (13%).¹⁶ Torque teno virus (TTV) accounts for 97% of
72 *Anelloviridae* fraction in the virome,¹⁶ and viral DNA loads (VL) in healthy individuals typically
73 remain below 4 log₁₀ cp/mL.¹⁷ In the case of immunosuppression, this virus replicates strongly,
74 and the level of its burden has made it possible to stratify rejecting and non-rejecting
75 recipients.¹⁶ This makes it a potential candidate for predicting vaccine response in transplant
76 recipients. Among the *Herpesviridae*, increased VL of Epstein-Barr virus and Cytomegalovirus
77 may also reflect immunosuppression status. However, antivirals used for prophylaxis after

78 transplantation significantly decrease the load of these viruses and may prevent their use as
79 effective markers of immunosuppression.

80 In this study, we characterized the antibody response in LTR after three doses of mRNA
81 vaccine, by longitudinally analyzing anti-Receptor Binding Domain (RBD) IgG titers and
82 neutralizing activity of sera against the ancestral strain D614G, B.1.617.2 (delta), and
83 B.1.1.529 (omicron) variants. We also investigated the influence of demographic and clinical
84 characteristics on vaccine response and whether the TTV VL could predict vaccine response,
85 and developed a multivariable predictive model.

86

87 **Methods**

88 *Study design*

89 We conducted a retrospective study on LTR followed in the outpatient lung transplantation
90 department of Strasbourg University Hospital. All LTR with serum samples available from 2
91 weeks to 2 months after the third booster dose of mRNA-based vaccine (administered between
92 1st April 2021 and 30th October 2021) were enrolled. To assess vaccine humoral responses
93 and predictors in LTR without biases due to intercurrent events, patients who had received
94 their first vaccine dose before lung transplantation and those infected between the first dose
95 and the third dose, were excluded. Data including age, sex, body mass index, blood group,
96 native lung disease, comorbidities, prior history of COVID-19, transplant type and date, and
97 immunosuppressive drugs were collected just before vaccination, as well as information about
98 SARS-CoV-2 vaccine types. The LTR cohort was divided into two groups according to previous
99 COVID-19 infection status, as determined by serology performed in all patients before
100 vaccination and by history of positive RT-PCR.

101 All patients provided informed written consent to the analysis of their samples included in the
102 registered biobank n°DC2014-2222 for research purposes. This study was approved by the
103 Institutional Review Board of the French learned Society for Respiratory Medicine: Société de
104 Pneumologie de Langue Française (CEPRO 2022-009).

105

106 *Antibody response*

107 All available sera sampled within the three-month interval (median: 7 days, interquartile range
108 [IQR]: 0-46) before vaccination and from 2 weeks to 2 months after each vaccine dose were
109 retrospectively analyzed with the Abbott Architect SARS-CoV-2 IgG II Quant assay to assess
110 the anti-receptor-binding domain (RBD) IgG response. All results were converted into Binding
111 Antibody Units (BAU)/mL adapted to the World Health Organization standard for SARS-CoV-
112 2 immunoglobulin by multiplication by a factor of 0.142 (quantification range: 1.0–11,360.0
113 BAU/mL, positivity threshold: 7.1 BAU/mL). Patients without history of COVID-19 who
114 displayed positive IgG titers after a third vaccine dose were categorized as responders (vs.
115 seronegative patients who were classified as non-responders). To exclude any humoral
116 response following unidentified infection, the first seropositive sample of each COVID-19-naive
117 vaccine responder was also examined for anti-nucleocapside (N) IgG with the Abbott Architect
118 SARS-CoV-2 IgG assay.

119

120 *Pseudotyped virus-based neutralization assay*

121 Neutralizing antibody titers were assessed by a pseudovirus-based assay in responders after
122 the third vaccine dose against D614G, delta, and omicron variants, as described previously
123 and in supplementary materials.¹⁸ The neutralization efficiency expressed as the \log_{10} of the
124 median half-maximal effective dilutions (ED_{50}) was calculated using Prism 9.3.1. Sera were
125 considered positive if they neutralized more than 50% SARS-CoV-2 pseudovirus at 1:40
126 dilution.

127

128 *Viral genome amplification by real-time PCR*

129 The TTV VL was retrospectively determined using the TTV R-GENE® kit (bioMérieux) in the
130 three months (median: 7 days, IQR: 0-46) preceding vaccination for all patients, as well as
131 between the second and third dose if a blood sample was available.

132

133

134 *Statistical analysis*

135 We compared demographic, clinical and biological baseline characteristics between
136 responders (patients displaying anti-RBD IgG ≥ 7.1 BAU/mL) and non-responder LTR to a
137 three-dose vaccine regimen using the Fisher exact test and χ^2 test for dichotomous variables
138 and the Mann-Whitney U-test for continuous variables. Correlation analyses between
139 continuous variables were performed using Spearman rank correlation test. Statistical tests
140 were 2-tailed and significance was set at $p < 0.05$. Post-hoc Receiver Operating Characteristic
141 (ROC) curves analyses were conducted, and values presenting sensitivity or specificity over
142 95% and the highest Youden index were selected as cut-offs. All analyses were performed
143 using Prism 9.3.1. Multivariable logistic regression analysis was performed to identify
144 independent predictors of antibody response after the third vaccine dose. Relevant parameters
145 associated with non-response with a p-value < 0.2 in the univariate analysis were included in
146 the model. Statistical analyses were performed using SPSS 28.0 (IBM Statistics), and results
147 were expressed as adjusted Odds Ratios (OR) with 95% confidence intervals (CI95).

148

149 **Results**

150 *Participants*

151 This study was conducted on 479 blood samples from 136 LTR, including 10 patients with and
152 126 without a history of COVID-19 (Figure 1, Table S1). Median age was 62.5 years (IQR:
153 51.0-67.0), with 39% women in the cohort. Most patients had cardiovascular comorbidities,
154 primarily hypertension (57.4%) and diabetes mellitus (49.3%). All received three doses of
155 either BNT162b2 (Pfizer-BioNTech) (n=34, 25.0%) or mRNA-1273 (Moderna) (n=101, 74.3%)
156 vaccines, except one patient who received a combination of both vaccines. The vaccination
157 was carried out at a median of 5.5 years (IQR: 2.6-9.0) after lung transplantation. The first two
158 doses were given four weeks apart, and the third dose was administered at a median interval
159 of 59.0 days (IQR: 35.3-73.0) after the second dose. The maintenance immunosuppression
160 regimen included glucocorticoids (94.1% of LTR), calcineurin inhibitors (97.0%) (tacrolimus
161 (86.0%) or cyclosporine (11.0%)), antimetabolites (91.9%) (mycophenolate

162 mofetil/mycophenolic acid (MMF/MPA) (80.1%) or azathioprine (11.8%)), and everolimus
163 (13.2%). Two patients received rituximab, 6.5 months before vaccination and three days after
164 the first vaccine dose, respectively.

165

166 *Antibody response to the three-dose vaccine regimen in LTR with prior COVID-19*

167 The 10 LTR with a history of COVID-19 before vaccination (proven by positive serology for
168 anti-RBD IgG: n=10/10 or by RT-PCR: 3/10) had asymptomatic (n=5/10), mild (4) or severe
169 (1) disease. All were seropositive before vaccination with anti-RBD IgG titers ranging from 10.5
170 to 554.8 BAU/mL (median: 68.2, IQR: 50.4-90.3). Unexpectedly, in one patient, anti-RBD IgG
171 titer decreased from 13.3 to 7.6 BAU/mL despite three-dose vaccination, whereas an antibody
172 rebound was observed in the nine other patients (median increase: 2,633.1 BAU/mL, IQR:
173 742.8-4,658.7) (Figure 2A). Among them, 8/10 patients harbored antibodies over 264 BAU/mL,
174 which is the threshold now considered in France as a decision-making tool for the choice
175 between prophylaxis with a fourth vaccine dose or with monoclonal antibodies therapy.^{19,20}
176 Sera from these eight patients neutralized the D614G pseudovirus (log ED₅₀: 2.07-3.76,
177 median 3.02), seven of them also neutralizing the delta (log ED₅₀: 2.17-3.23, median 2.55) and
178 the omicron (log ED₅₀: 1.69-3.06, median 2.06) variants (Figure 2B, Figure S1). Seven patients
179 were followed up to seven months after the third dose without intercurrent antigenic stimulation
180 or monoclonal antibody therapy, and all of them maintained anti-RBD IgG titers over 264
181 BAU/mL (Figure 2C).

182

183 *Antibody response to the three-dose vaccine regimen in COVID-19-naive LTR*

184 Anti-RBD IgG were available for 47, 54, and 126 COVID-19-naive LTR after the first, second,
185 and third doses of vaccine, respectively. None of the LTR seroconverted after the first dose,
186 and 13% (7/54) were anti-RBD IgG positive after the second dose, with titers ranging from 13.2
187 to 585.8 BAU/mL (median: 54.6, IQR: 34.1-383.5) (Figure 3A). After the third dose, 37.3%
188 (47/126) LTR were seropositive with anti-RBD IgG ranging from 7.7 to 5,249.7 BAU/mL

189 (median: 81.0, IQR: 32.0-274.1) including 14 patients with titers ≥ 264 BAU/mL (29.8% of
190 responders and 11.1% of the whole cohort). Considering the 47 patients who tested
191 seronegative after the second dose, the third dose led to a positive antibody response in 25.5%
192 (12/47) patients, including one patient (representing 8.3% of these responders) with a titer of
193 over 264 BAU/mL (Figure 3B).

194 Longitudinal serum samples collected from six to eight months after the third dose were
195 available for 21 responders. Anti-RBD IgG were still detectable for 16 of these responders
196 (76.2%), but all titers were lower than 264 BAU/mL (Figure 3C). None of them had intercurrent
197 infection, administration of a fourth vaccine dose, or monoclonal antibodies prophylaxis before
198 the last serology performed during follow-up. Sera were not available for the remaining 26
199 responders at that time because their follow-up period after the third dose was shorter.

200 Analysis of the neutralizing activity of seropositive sera, collected at a median of 34 days post-
201 third dose (IQR: 25.5-46.5 days), showed that 46.8% (22/47) neutralized the ancestral D614G
202 strain with titers up to $2.99 \log_{10} \text{ED}_{50}$ (median $2.14 \log_{10} \text{ED}_{50}$) (Figure 3D). Only 31.9% (15/47)
203 were able to neutralize the delta variant with $2.71 \log_{10} \text{ED}_{50}$ as a maximal neutralizing antibody
204 titer (median $2.06 \log_{10} \text{ED}_{50}$) (Figure 3D). Anti-RBD IgG titers over 132 BAU/mL and 748
205 BAU/mL were required to ensure neutralization of the D614G and the delta variants,
206 respectively (Figure 3E). No serum was able to neutralize the omicron variant (Figures 3D,
207 3E).

208 During follow-up, seven (5.6%) patients including five non-responders and two responders
209 developed COVID-19 from 6.1 to 8.4 months after the third dose. These infections resulted in
210 three asymptomatic, one mild and three severe diseases. The three severe cases were
211 infected by the delta variant and were hospitalized in an intensive care unit, but with a good
212 clinical outcome. Two of them were non-responders and the third one displayed an antibody
213 response lower than 264 BAU/mL 53 days after the third dose (132.5 BAU/mL), and a weak
214 neutralizing activity against the delta variant ($1.67 \log_{10} \text{ED}_{50}$).

215

216

217 *Predictors of vaccine response*

218 Baseline demographic and clinical characteristics of the 126 LTR without a history of COVID-
219 19 were compared between responders and non-responders in Table 1. Univariate analysis
220 revealed that the three-dose vaccine response is lower in LTR vaccinated with BNT162b2
221 (13.3%) compared to mRNA-1273 vaccine (44.2%, $p=0.004$) (Figure 4A), and that the vaccine
222 response rate increases with the time elapsed between transplantation and the first dose of
223 vaccine. Non-response to vaccine was also associated with MMF/MPA treatment ($p=0.033$),
224 with high trough levels of MMF ($p=0.022$) and tacrolimus ($p<0.001$), and with high prednisone
225 dosage ($p=0.039$) (Table 1, Table S2). Conversely, azathioprine treatment was associated with
226 better vaccine response ($p=0.004$). Of note, none of the two patients treated with rituximab
227 seroconverted after the third dose.

228 To determine whether TTV replication influences vaccine response, TTV plasma VL was
229 assessed before the first vaccine dose administration in 125 LTR without a history of COVID-
230 19. TTV VL ranged from 1.8 to 9.0 \log_{10} cp/mL, with 6 patients displaying undetectable TTV
231 DNA. Non-responders displayed higher prevaccine TTV VL ($n=78$, median: 4.9 \log_{10} cp/mL,
232 IQR: 3.4-7.7) than responders ($n=47$, median: 3.8 \log_{10} cp/mL, IQR: 2.5-5.4) ($p=0.004$) (Table
233 1, Figure 4B). A ROC curve enabled to define the threshold of 6.2 \log_{10} cp/mL as predictive of
234 overall lack of vaccine antibody response in our cohort, with a sensitivity of 95.7% and a
235 specificity of 37.2% ($p<0.001$) (Figure 4C). LTR displaying TTV VL below this threshold before
236 vaccination seroconverted in 47.9% of cases (45/94) after the third dose versus 6.5% (2/31)
237 of LTR with higher VL ($p<0.001$), corresponding to a negative predictive value (NPV) for
238 seroconversion of 93.5%. The combination of this biomarker with MMF/MPA treatment further
239 discriminated between responders and non-responders, with 1/26 (3.8%) responders among
240 LTR treated with MMF/MPA and harbouring TTV VL $\geq 6.2 \log_{10}$ cp/mL vs. 13/19 (68.4%) in the
241 opposite conditions of no MMF/MPA and TTV VL $< 6.2 \log_{10}$ cp/mL (Figure 4D, 4E). An adjusted
242 multivariable logistic regression analysis confirmed that LTR displaying TTV VL $\geq 6.2 \log_{10}$
243 cp/mL before vaccination (OR=17.87, CI95=3.02–105.72, $p=0.001$) or treated with MMF/MPA
244 (OR=4.73, CI95=1.46–15.34, $p=0.010$) have a reduced likelihood to generate a positive

245 antibody response, as well as patients vaccinated with BNT162b2 compared to mRNA-1273
246 vaccine (OR=6.72, CI95=1.75–25.92, p=0.006), (Figure 4F, Table 2, Table S3).
247 Longitudinal follow-up indicated that TTV VL could also be used as a predictive biomarker of
248 antibody response when measured before the vaccine booster (third dose). Considering LTR
249 who remained seronegative after two doses (n=47), none of the 19 patients with TTV VL ≥ 6.2
250 \log_{10} cp/mL before the third dose seroconverted after the booster (NPV of 100%), versus
251 42.9% (12/28) of LTR with VL lower than this cutoff (p<0.001) (Figure 5A and 5B). Conversely,
252 a TTV VL <3.2 \log_{10} cp/mL was highly predictive of vaccine response (9/10 responders, vs.
253 3/37 with TTV VL over this threshold, p<0.001). This lower threshold was associated with a
254 positive predictive value of 90.0% and a NPV of 91.9% for vaccine response in this cohort.

255

256 **Discussion**

257 This study revealed a substantially weak humoral immune response among COVID-19-naive
258 LTR after a three-dose regimen of COVID-19 mRNA-based vaccine. In contrast with the
259 correlation observed between anti-RBD IgG levels and neutralizing antibody titers for the
260 D614G mutant, and to a lesser extent for the delta variant, no patient displayed neutralizing
261 activity against the omicron variant in this cohort, including the few patients with high anti-RBD
262 titers over 1,000 BAU/mL. We showed that these anti-RBD IgG titers decreased over time but
263 persisted up to eight months after the third dose, and identified TTV VL as a potential predictive
264 marker of vaccine response in LTR.

265 Our results confirmed previous data observed in LTR and other types of solid organ transplant
266 recipients where vaccine non-response was associated with mycophenolate
267 treatment.^{4,6,9,12,13,21} This may be due to a greater impairment of both T and B-cell functions
268 with mycophenolate compared to azathioprine or no antimetabolites, which was already shown
269 to impair the humoral response to influenza vaccine.²²

270 A higher seroconversion rate was observed with mRNA-1273 compared to BNT162b2 vaccine
271 in our cohort, similarly to findings reported after one or two vaccine doses.^{4,5,7,21} Both vaccines
272 contain mRNA encoding the spike protein stabilized into the pre-fusion conformation, but the

273 higher dose of 100 µg in the mRNA-1273 versus 30 µg in the BNT162b2 preparation could
274 explain these differences in immunogenicity in LTR.²³ Alter's group recently confirmed the
275 superiority of mRNA-1273 vaccine over the BNT162b2 vaccine.²⁴ They showed that mRNA-
276 1273 vaccine elicits higher concentrations of RBD- and N-terminal domain-specific IgA and
277 higher levels of antibodies eliciting neutrophil phagocytosis and natural killer cell activation
278 than the BNT162b2 vaccine.

279 Our study revealed that vaccine response was strongly reduced in case of high pre-vaccination
280 TTV VL, highlighting the potential of this virological marker to predict antibody response in the
281 LTR population. This was particularly true when TTV VL was measured before the third dose
282 for non-responders to the second vaccine dose: no vaccine response was observed in patients
283 with VL $\geq 6.2 \log_{10}$ cp/mL, whereas TTV VL $< 3.2 \log_{10}$ cp/mL was highly predictive of
284 seroconversion. This virological marker varies with the strength of humoral and cellular
285 immunity and reflects the overall state of the immune system. TTV VL could therefore help to
286 identify patients who may not respond to three vaccine doses.

287 Limitations of our study include the absence of a control group of healthy vaccinated adults for
288 comparison and the lack of serological follow-up after the first and second vaccine doses for
289 some patients, which could limit the accuracy of vaccine response rates determined at these
290 timepoints. Furthermore, memory T-cell response could not be explored in this retrospective
291 study, whereas cases of T cell response without detectable antibodies have been reported in
292 vaccinated LTR.^{7,13,25} Finally, missing data about vaccine type and vaccination dates, and lack
293 of sera available after third vaccine dose led us to exclude many LTR followed-up in our
294 hospital. Despite these limitations, we have demonstrated that COVID-19-naïve LTR develop
295 only poor antibody responses to a three-dose regimen of COVID-19 mRNA-based vaccine,
296 contrary to patients infected before vaccination. This study also revealed a reduced likelihood
297 of seroconversion using BNT162b2 vaccine, and for patients treated with MMF/MPA or
298 displaying high TTV VL at the time of vaccination. This marker could help clinicians to decide
299 which patients require additional vaccine doses. A very recent study conducted on LTR
300 reported that prevaccine TTV VL over $6.5 \log_{10}$ cp/mL was predictive of poor vaccine response

301 to a second dose of mRNA-1273 vaccine, which strongly supports our findings.¹¹ Further
302 studies are needed to externally validate our predictive model on further patient cohorts, to
303 evaluate this virological marker as a guide for vaccine strategies, and to explore its potential
304 as a predictive tool of vaccine response in other types of transplanted and
305 immunocompromised patients, as well as against other pathogens.

306

307 **Author contributions:**

308 FG, BRP, RK and SFK conceived and designed the study. FG and BRP collected clinical and
309 biological data and organized the database. FG and ES performed the experiments. FG, BRP,
310 MS, EL, SC and SFK contributed to data analysis and interpretation. FG, MS and SFK wrote
311 the manuscript. SFK and RK supervised this study. All authors listed have critically reviewed
312 the manuscript for important intellectual content and approved it for publication.

313

314 **Acknowledgments:**

315 The authors are grateful to all participants of this study and would like to thank Olivier Schwartz
316 (Institut Pasteur, Paris, France) who provided HEK293T-ACE2 cells, Paola Rossolillo (IGBMC,
317 Strasbourg, France) who provided the plasmids for pseudovirus production, Eren Canpolat
318 (HUS) who performed TTV real-time PCR, and Dr Kate Dunning (HUS) who provided
319 manuscript edition and proofreading.

320

321 **Disclosure Statements:**

322 TTV real-time PCR kits were provided free of charge by BioMérieux (Marcy l'Etoile, France).
323 SFK lab received research grants from Biomérieux. MS received a travel grant from
324 Biomérieux. SC participated as an expert to a board for AstraZeneca and received support for
325 congress fees from Sanofi and Novartis. None of the other authors has any conflicts of interest
326 to disclose. SFK lab is supported by Strasbourg University Hospital (SeroCoV-HUS; PRI
327 7782), the Agence Nationale de la Recherche (ANR-18-CE17-0028), Laboratoire d'Excellence

328 TRANSPLANTEX (ANR-11-LABX-0070_TRANSPLANTEX), Strasbourg University and
329 Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (UMR_S 1109).
330

331 **References**

- 332 1. Messika J, Eloy P, Roux A, et al. COVID-19 in Lung Transplant Recipients.
333 *Transplantation*. 2021;105(1):177-186. doi:10.1097/TP.0000000000003508
- 334 2. Mohanka MR, Mahan LD, Joerns J, et al. Clinical characteristics, management
335 practices, and outcomes among lung transplant patients with COVID-19. *J Heart Lung*
336 *Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant*. 2021;40(9):936-947.
337 doi:10.1016/j.healun.2021.05.003
- 338 3. Marion O, Del Bello A, Abravanel F, et al. Predictive Factors for Humoral Response
339 After 2-dose SARS-CoV-2 Vaccine in Solid Organ Transplant Patients. *Transplant*
340 *Direct*. 2021;8(1):e1248. doi:10.1097/TXD.0000000000001248
- 341 4. Boyarsky BJ, Werbel WA, Avery RK, et al. Antibody Response to 2-Dose SARS-CoV-2
342 mRNA Vaccine Series in Solid Organ Transplant Recipients. *JAMA*.
343 2021;325(21):2204-2206. doi:10.1001/jama.2021.7489
- 344 5. Narasimhan M, Mahimainathan L, Clark AE, et al. Serological Response in Lung
345 Transplant Recipients after Two Doses of SARS-CoV-2 mRNA Vaccines. *Vaccines*.
346 2021;9(7):708. doi:10.3390/vaccines9070708
- 347 6. Hallett AM, Greenberg RS, Boyarsky BJ, et al. SARS-CoV-2 messenger RNA vaccine
348 antibody response and reactogenicity in heart and lung transplant recipients. *J Heart*
349 *Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant*. Published online August 8,
350 2021:S1053-2498(21)02445-1. doi:10.1016/j.healun.2021.07.026
- 351 7. Havlin J, Svorcova M, Dvorackova E, et al. Immunogenicity of BNT162b2 mRNA
352 COVID-19 vaccine and SARS-CoV-2 infection in lung transplant recipients. *J Heart Lung*
353 *Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant*. 2021;40(8):754-758.
354 doi:10.1016/j.healun.2021.05.004
- 355 8. Hoffman TW, Meek B, Rijkers GT, van Kessel DA. Poor Serologic Response to Two
356 Doses of an mRNA-Based SARS-CoV-2 Vaccine in Lung Transplant Recipients.
357 *Transplantation*. Published online October 1, 2021. doi:10.1097/TP.0000000000003966
- 358 9. Shostak Y, Shafran N, Heching M, et al. Early humoral response among lung transplant
359 recipients vaccinated with BNT162b2 vaccine. *Lancet Respir Med*. 2021;9(6):e52-e53.
360 doi:10.1016/S2213-2600(21)00184-3
- 361 10. Aslam S, Danziger-Isakov L, Mehra MR. COVID-19 vaccination immune paresis in heart
362 and lung transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2021;40(8):763-766.
363 doi:10.1016/j.healun.2021.04.018
- 364 11. Hoek RA, Verschuuren EA, de Vries RD, et al. High Torque tenovirus (TTV) load before
365 first vaccine dose is associated with poor serological response to COVID-19 vaccination
366 in lung transplant recipients. *J Heart Lung Transplant*. Published online March 16, 2022.
367 doi:10.1016/j.healun.2022.03.006
- 368 12. Benotmane I, Gautier G, Perrin P, et al. Antibody Response After a Third Dose of the
369 mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine in Kidney Transplant Recipients With Minimal
370 Serologic Response to 2 Doses. *JAMA*. 2021;326(11):1063-1065.
371 doi:10.1001/jama.2021.12339
- 372 13. Peled Y, Ram E, Lavee J, et al. Third dose of the BNT162b2 vaccine in heart transplant
373 recipients: Immunogenicity and clinical experience. *J Heart Lung Transplant*. Published
374 online August 28, 2021. doi:10.1016/j.healun.2021.08.010

- 375 14. Del Bello A, Abravanel F, Marion O, et al. Efficiency of a boost with a third dose of anti-
376 SARS-CoV-2 messenger RNA-based vaccines in solid organ transplant recipients. *Am*
377 *J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2022;22(1):322-323.
378 doi:10.1111/ajt.16775
- 379 15. Karaba AH, Zhu X, Liang T, et al. A third dose of SARS-CoV-2 vaccine increases
380 neutralizing antibodies against variants of concern in solid organ transplant recipients.
381 *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* Published online
382 December 24, 2021. doi:10.1111/ajt.16933
- 383 16. De Vlaminck I, Khush KK, Strehl C, et al. Temporal Response of the Human Virome to
384 Immunosuppression and Antiviral Therapy. *Cell.* 2013;155(5):1178-1187.
385 doi:10.1016/j.cell.2013.10.034
- 386 17. Kulifaj D, Durgueil-Lariviere B, Meynier F, et al. Development of a standardized real time
387 PCR for Torque teno viruses (TTV) viral load detection and quantification: A new tool
388 for immune monitoring. *J Clin Virol.* 2018;105:118-127. doi:10.1016/j.jcv.2018.06.010
- 389 18. Charmetant X, Espi M, Benotmane I, et al. Infection or a third dose of mRNA vaccine
390 elicit neutralizing antibody responses against SARS-CoV-2 in kidney transplant
391 recipients. *Sci Transl Med.* Published online February 1, 2022:eabl6141.
392 doi:10.1126/scitranslmed.abl6141
- 393 19. Feng C, Shi J, Fan Q, et al. Protective humoral and cellular immune responses to SARS-
394 CoV-2 persist up to 1 year after recovery. *Nat Commun.* 2021;12(1):4984.
395 doi:10.1038/s41467-021-25312-0
- 396 20. DGS-Urgent N°2022_16. Vaccination contre la COVID-19 des personnes sévèrement
397 immunodéprimées et de l'entourage des personnes à risque de forme grave de la
398 maladie. Published January 28, 2022. [https://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/dgs-
399 urgent_no2022-16_vaccins_personnes_immunodeprimes_.pdf](https://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/dgs-urgent_no2022-16_vaccins_personnes_immunodeprimes_.pdf)
- 400 21. Boyarsky BJ, Werbel WA, Avery RK, et al. Immunogenicity of a Single Dose of SARS-
401 CoV-2 Messenger RNA Vaccine in Solid Organ Transplant Recipients. *JAMA.*
402 2021;325(17):1784-1786. doi:10.1001/jama.2021.4385
- 403 22. Natori Y, Shiotsuka M, Slomovic J, et al. A Double-Blind, Randomized Trial of High-
404 Dose vs Standard-Dose Influenza Vaccine in Adult Solid-Organ Transplant Recipients.
405 *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2018;66(11):1698-1704.
406 doi:10.1093/cid/cix1082
- 407 23. Heinz FX, Stiasny K. Distinguishing features of current COVID-19 vaccines: knowns and
408 unknowns of antigen presentation and modes of action. *Npj Vaccines.* 2021;6(1):1-13.
409 doi:10.1038/s41541-021-00369-6
- 410 24. Kaplonek P, Cizmeci D, Fischinger S, et al. mRNA-1273 and BNT162b2 COVID-19
411 vaccines elicit antibodies with differences in Fc-mediated effector functions. *Sci Transl*
412 *Med.* Published online March 29, 2022:eabm2311. doi:10.1126/scitranslmed.abm2311
- 413 25. Schramm R, Costard-Jäckle A, Rivinius R, et al. Poor humoral and T-cell response to
414 two-dose SARS-CoV-2 messenger RNA vaccine BNT162b2 in cardiothoracic transplant
415 recipients. *Clin Res Cardiol Off J Ger Card Soc.* 2021;110(8):1142-1149.
416 doi:10.1007/s00392-021-01880-5

417

418

419 **Figure legends.**

420 **Figure 1: Flow chart of lung transplant recipients (LTR) recruitment and antibody**
421 **response to SARS-CoV-2 mRNA-based vaccination.** The study was conducted on 136 LTR,
422 including 10 and 126 patients with and without history of COVID-19 before vaccination,
423 respectively. Sera sampled after each vaccine dose in COVID-19-naive patients were
424 analyzed to assess the anti-receptor-binding domain (RBD) IgG response, with seropositive
425 patents defined as responders.

426

427 **Figure 2: Antibody response after three vaccine doses in lung transplant recipients with**
428 **history of COVID-19 (n=10).** **A.** Anti-RBD IgG titers expressed in BAU/mL before vaccination
429 and from two weeks to two months after the third dose. **B.** Neutralizing antibody titers assessed
430 by pseudovirus-based assay against D614G, delta and omicron variants. The dotted horizontal
431 black line indicates the cutoff for positivity (1:40 dilution). **C.** Dynamics of anti-RBD IgG titers
432 expressed in BAU/mL over time after the third vaccine dose (n= 11 additional samples
433 collected from 9 patients during follow-up). **A** and **C.** The dotted lines indicate the positivity
434 threshold (7.1 BAU/mL) and the threshold of 264 BAU/mL used in French recommendations
435 to guide prophylactic strategy in immunosuppressed patients.

436 BAU: Binding Antibody Units; ED50: half-maximal effective dilution; RBD: receptor-binding
437 domain.

438

439 **Figure 3: Antibody response after three vaccine doses in COVID-19-naive lung**
440 **transplant recipients (n=126).** **A.** Anti-RBD IgG titers expressed in BAU/mL before
441 vaccination (n=126) and from two weeks to two months after the first (n=47), the second (n=54)
442 and the third (n=126) vaccine doses. **B.** Anti-RBD IgG titers before and after the third vaccine
443 doses in the 54 patients with sera available after the second dose. **C.** Dynamics of anti-RBD
444 IgG titers expressed in BAU/mL over time after the third vaccine dose (n= 95 additional
445 samples collected from 47 patients during follow-up). **A, B** and **C:** The dotted lines indicate the
446 positivity threshold (7.1 BAU/mL) and the threshold of 264 BAU/mL used in French

447 recommendations to guide prophylactic strategy in immunosuppressed patients. **D.**
448 Neutralizing antibody titers assessed by pseudovirus-based assay against D614G, delta and
449 omicron variants in the 47 patients seropositive after the third dose (responders). 22 (46.8%)
450 and 15 (31.9%) sera neutralized the D614G and the delta variants, respectively, but none
451 neutralized the omicron variant. The dotted horizontal black line indicates the cutoff for
452 positivity (1:40 dilution). **E.** Spearman correlation between anti-RBD IgG titers and neutralizing
453 antibody titers against D614G (green dots), delta (blue dots) and omicron (orange dots)
454 variants. The dotted horizontal and vertical black lines correspond to the positivity thresholds
455 of neutralizing antibody titers and anti-RBD IgG titers, respectively. The linear regressions,
456 computed using the Graphpad Prism version 9.3.1. software, are depicted with calculated
457 correlation coefficients (r_s) and p-values.

458 BAU: Binding Antibody Units; ED50: half-maximal effective dilution; RBD: receptor-binding
459 domain. ***p value <0.001.

460

461 **Figure 4: Investigation of predictors of vaccine response in COVID-19-naive lung**
462 **transplant recipients (n=125).** **A.** Vaccine response rates after each vaccine dose according
463 to mRNA vaccine type. The number of responders to each vaccine dose is detailed below the
464 bar chart. **B.** Prevaccine TTV viral load in non-responders (n=78) and responders (n=47) to a
465 three-dose regimen of COVID-19 mRNA-based vaccine, with medians represented as solid
466 horizontal lines. The dotted line indicates the predictive threshold of 6.2 log₁₀ cp/mL.
467 Comparison was computed with Mann-Whitney test using Graphpad Prism version 9.3.1.
468 software **C.** Receiver operating characteristics (ROC) curve for prediction of vaccine response
469 based on prevaccine TTV viral load. Area under the curve (AUC): 0.6533. The threshold of 6.2
470 log cp/mL is associated with a negative predictive value of 93.5% (in case of high TTV viral
471 load) and a positive predictive value of 47.9% (in case of low TTV viral load) for vaccine
472 response in this cohort. **D.** Bar charts representing the percentage of responders after three
473 vaccine doses according to the prevaccine TTV viral load and to MMF/MPA treatment at the
474 time of the first vaccination. The number of LTR in each category of patients is mentioned

475 above bars. **E.** Spearman correlation between TTV viral load and MPA trough level measured
476 at the same time before vaccination in responders (black dots) and non-responders (grey dots)
477 to three vaccine doses. The dotted line indicates the TTV viral load predictive threshold of 6.2
478 \log_{10} cp/mL. Correlation coefficient (r_s) was calculated using the Graphpad Prism version 9.3.1.
479 software. **F.** Forest plot showing Odds Ratios (OR) estimates (indicated by black dots) and
480 95% confidence intervals (indicated by whiskers) of association between patient
481 characteristics and lack of vaccine response to a three-dose regimen of COVID-19 mRNA-
482 based vaccine. Multivariable logistic regression analysis was performed using SPSS 28.0 (IBM
483 Statistics). Factors independently associated with poor vaccine response are in bold.
484 MMF/MPA: mycophenolate mofetil/mycophenolic acid; OR: Odds ratio; TTV: Torque teno
485 virus; VL: viral load. ** p value <0.01 , ns: not significant.

486

487 **Figure 5: Investigation of TTV viral load as potential predictive biomarker of response**
488 **to a third SARS-CoV-2 vaccine dose in COVID-19-naive lung transplant recipients**
489 **determined as non-responders to the second dose. A.** TTV viral load measured after the
490 second vaccine dose in non-responders ($n=35$) and responders ($n=12$) to the third vaccine
491 dose, with medians represented as solid horizontal lines. The dotted lines indicate the
492 predictive thresholds of 6.2 \log_{10} cp/mL and 3.2 \log_{10} cp/mL associated with low and high rates
493 of vaccine response, respectively. Comparison was computed with Mann-Whitney test using
494 Graphpad Prism version 9.3.1. software. **B.** Receiver operating characteristics (ROC) curve
495 for prediction of vaccine response to the third dose based on TTV viral load measured in
496 seronegative LTR after the second vaccine dose. Area under the curve (AUC): 0.9190. The
497 upper threshold of 6.2 log copies/mL is associated with a negative predictive value of 100%
498 (in case of high TTV viral load) and a positive predictive value of 40.0% (in case of low TTV
499 viral load) for vaccine response. Conversely, the lower threshold of 3.2 log copies/mL is
500 associated with a negative predictive value of 91.9% (in case of high TTV viral load) and a
501 positive predictive value of 90.0% (in case of low TTV viral load) for vaccine response in this
502 cohort. TTV: Torque teno virus. **** p value <0.0001 .

Table 1: Lung transplant recipient characteristics stratified by antibody response to a three-dose regimen of COVID-19 vaccine.

Variable	Non-responders to three-dose vaccine regimen <i>n</i> = 79	Responders to three-dose vaccine regimen <i>n</i> = 47	p-value
Age, years, median (IQR)	62.6 (53.7–65.9)	63.0 (47.3–67.4)	0.901
Female, n (%)	26 (32.9)	21 (44.7)	0.253
Blood group			0.788
O, n (%)	35 (44.3)	22 (46.8)	
A, n (%)	30 (38.0)	18 (38.3)	
B, n (%)	10 (12.7)	3 (6.4)	
AB, n (%)	3 (3.8)	3 (6.4)	
Unknown, n (%)	1 (1.3)	1 (2.1)	
Primary disease			0.609
Chronic obstructive pulmonary disease, n (%)	40 (50.6)	20 (42.6)	
Cystic fibrosis, n (%)	10 (12.7)	8 (17.0)	
Interstitial lung disease, n (%)	8 (10.1)	3 (6.4)	
Other, n (%)	21 (26.6)	16 (34.0)	
BMI, kg/m ² , median (IQR)	23.5 (20.3–26.7)	23.9 (20.9–28.5)	0.448
Cardiovascular comorbidities			
Hypertension, n (%)	46 (58.2)	26 (55.3)	0.853
Diabetes mellitus, n (%)	42 (53.2)	22 (46.8)	0.581
Obesity, n (%)	8 (10.1)	6 (12.8)	0.771
Chronic heart failure, n (%)	2 (2.5)	2 (4.3)	0.629
History of transient ischemic attack or stroke, n (%)	9 (11.4)	5 (10.6)	>0.999
History of heart attack, n (%)	6 (7.6)	6 (12.8)	0.361
Transplant type			0.111
Double lung transplant, n (%)	65 (82.3)	39 (83.0)	
Single lung transplant, n (%)	6 (7.6)	0 (0.0)	
Cardiopulmonary transplant, n (%)	6 (7.6)	3 (6.4)	
Lung and liver transplant, n (%)	0 (0.0)	1 (2.1)	
Lung and kidney transplant, n (%)	2 (2.5)	2 (4.3)	
Lung and islet transplant, n (%)	0 (0.0)	2 (4.3)	
History of treated allograft acute rejection, n (%)	25 (31.6)	9 (19.1)	0.150
Chronic lung allograft dysfunction, n (%)	17 (21.5)	14 (29.8)	0.393
Maintenance immunosuppression			
Tacrolimus, n (%)	71 (89.9)	38 (80.9)	0.182
Dose, mg, median (IQR)	4.0 (3.0–7.0)	4.0 (3.0–4.6)	0.086
Trough level, µg/L, median (IQR)	7.5 (6.4–8.8)	6.1 (5.6–7.4)	<0.001
Cyclosporine, n (%)	8 (10.1)	6 (12.8)	0.771

MMF/MPA, n (%)	69 (87.3)	33 (70.2)	0.033
Dose, mg, median (IQR)	1750 (1000–2000)	1080 (1000–2000)	0.031
Trough level, mg/L, median (IQR)	2.8 (2.0–4.9)	2.2 (1.7–2.9)	0.022
Azathioprine, n (%)	3 (3.8)	10 (21.3)	0.004
Prednisone, n (%)	77 (97.4)	43 (91.4)	0.195
Dose, mg, median (IQR, range)	10 (10–10, 0–10)	10 (10–10, 0–40)	0.039
Everolimus, n (%)	9 (11.4)	8 (17.0)	0.424
SARS-CoV-2 vaccine			0.004
mRNA-1273, n (%)	53 (67.1)	42 (89.4)	
BNT162b2, n (%)	26 (32.9)	4 (8.5)	
mRNA-1273 + BNT162b2, n (%)	0 (0.0)	1 (2.1)	
Biology			
Creatinine, $\mu\text{mol/L}$, median (IQR)	102.9 (80.2–136.4)	109.9 (84.2–133.0)	0.732
Leucocytes, G/L, median (IQR)	6.0 (4.7–8.3)	6.5 (5.4–7.7)	0.578
Lymphocytes, G/L, median (IQR)	1.4 (0.9–1.7)	1.5 (1.1–1.9)	0.506
Monocytes, G/L, median (IQR)	0.6 (0.5–0.8)	0.6 (0.5–0.8)	0.453
CRP, mg/L, median (IQR)	<4.0 (<4.0–5.8)	<4.0 (<4.0–7.0)	0.965
Prevaccine TTV viral load, \log_{10} cp/mL, median (IQR)	4.9 (3.4–7.7)	3.8 (2.5–5.4)	0.004
Time between transplantation and first vaccination, years, median (IQR)	4.9 (1.7–8.3)	5.9 (4.2–9.3)	0.022
Time of 2nd vaccine from 1st vaccine, days, median (IQR)	28.0 (28.0–30.0)	28.0 (28.0–28.0)	0.145
Time of 3rd vaccine from 2nd vaccine, days, median (IQR)	56.0 (34.0–74.0)	62.0 (39.0–71.0)	0.945
Time of 3rd vaccine to antibody testing, days, median (IQR)	35.0 (24.0–47.0)	32.0 (25.0–42.0)	0.137
Maximum anti-RBD IgG concentration after third dose, BAU/mL, median (IQR)	<1.0 (<1.0–1.2)	108.0 (34.1–326.3)	<0.001

Age, biological parameters, and medication data (including dose and trough levels) were assessed just before the first vaccine dose. Patient characteristics were compared between responders (patients displaying anti-RBD IgG ≥ 7.1 BAU/mL) and non-responders using the Fisher exact test and χ^2 test for dichotomous variables and the Mann-Whitney U-test for continuous variables with Graphpad Prism version 9.3.1. software. Statistical significance was set at $p < 0.05$ (shown in bold).

BAU: Binding Antibody Units; BMI: body mass index; CRP: C-reactive protein,; IQR: interquartile range; MMF/MPA: mycophenolate mofetil/mycophenolic acid; TTV: Torque teno virus.

Table 2: Multivariable analysis on antibody response in LTR to a three-dose regimen of COVID-19 mRNA vaccine.

Variable	Adjusted odds ratio (risk to be a non-responder)	95% CI	p-value
History of treated allograft acute rejection	1.627	0.550–4.808	0.379
Time between lung transplantation and vaccination (per 1 year increment)	1.039	0.939–1.150	0.463
BNT162b2 vaccine (vs. mRNA-1273)	6.724	1.745–25.916	0.006
Time between first and second doses (per 1 day increment)	1.131	0.998–1.283	0.055
Time between third dose and antibody testing (per 1 day increment)	0.989	0.957–1.022	0.516
Prevaccine TTV viral load $\geq 6.2 \log_{10}$ cp/mL	17.866	3.019–105.716	0.001
MMF/MPA	4.730	1.458–15.343	0.010
Tacrolimus	1.354	0.391–4.684	0.632
Steroids	2.157	0.303–15.335	0.442

Multivariable logistic regression analysis was performed using SPSS 28.0 (IBM Statistics). Factors independently associated with poor vaccine response ($p < 0.05$) are in bold. CI: confidence interval; MMF/MPA: mycophenolate mofetil/mycophenolic acid; TTV: Torque teno virus.

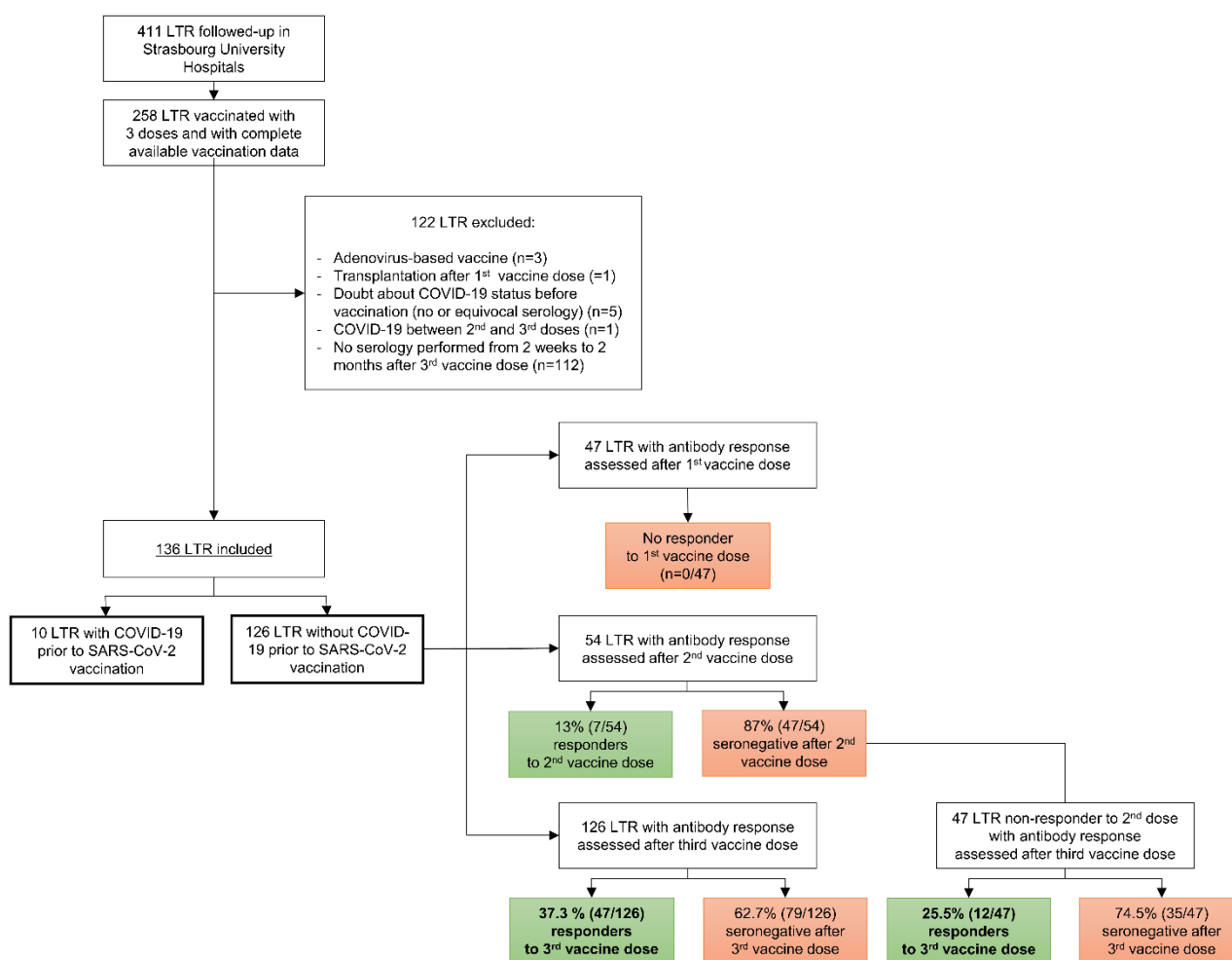


Figure 1: Flow chart of lung transplant recipients (LTR) recruitment and antibody response to SARS-CoV-2 mRNA-based vaccination. The study was conducted on 136 LTR, including 10 and 126 patients with and without history of COVID-19 before vaccination, respectively. Sera sampled after each vaccine dose in COVID-19-naive patients were analyzed to assess the anti-receptor-binding domain (RBD) IgG response, with seropositive patients defined as responders.

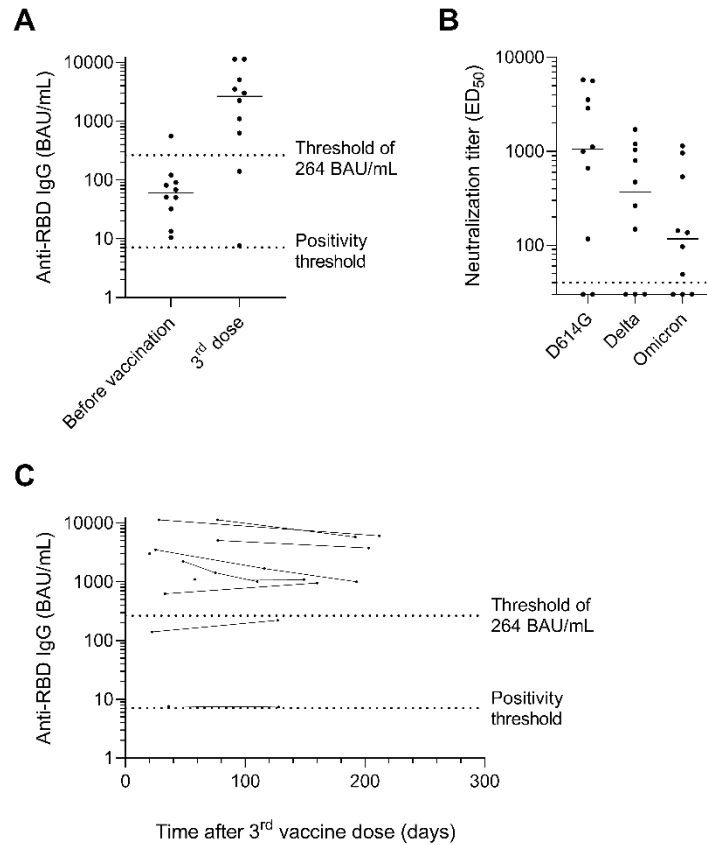


Figure 2: Antibody response after three vaccine doses in lung transplant recipients with history of COVID-19 (n=10). **A.** Anti-RBD IgG titers expressed in BAU/mL before vaccination and from two weeks to two months after the third dose. **B.** Neutralizing antibody titers assessed by pseudovirus-based assay against D614G, delta and omicron variants. The dotted horizontal black line indicates the cutoff for positivity (1:40 dilution). **C.** Dynamics of anti-RBD IgG titers expressed in BAU/mL over time after the third vaccine dose (n= 11 additional samples collected from 9 patients during follow-up). **A** and **C.** The dotted lines indicate the positivity threshold (7.1 BAU/mL) and the threshold of 264 BAU/mL used in French recommendations to guide prophylactic strategy in immunosuppressed patients. BAU: Binding Antibody Units; ED50: half-maximal effective dilution; RBD: receptor-binding domain.

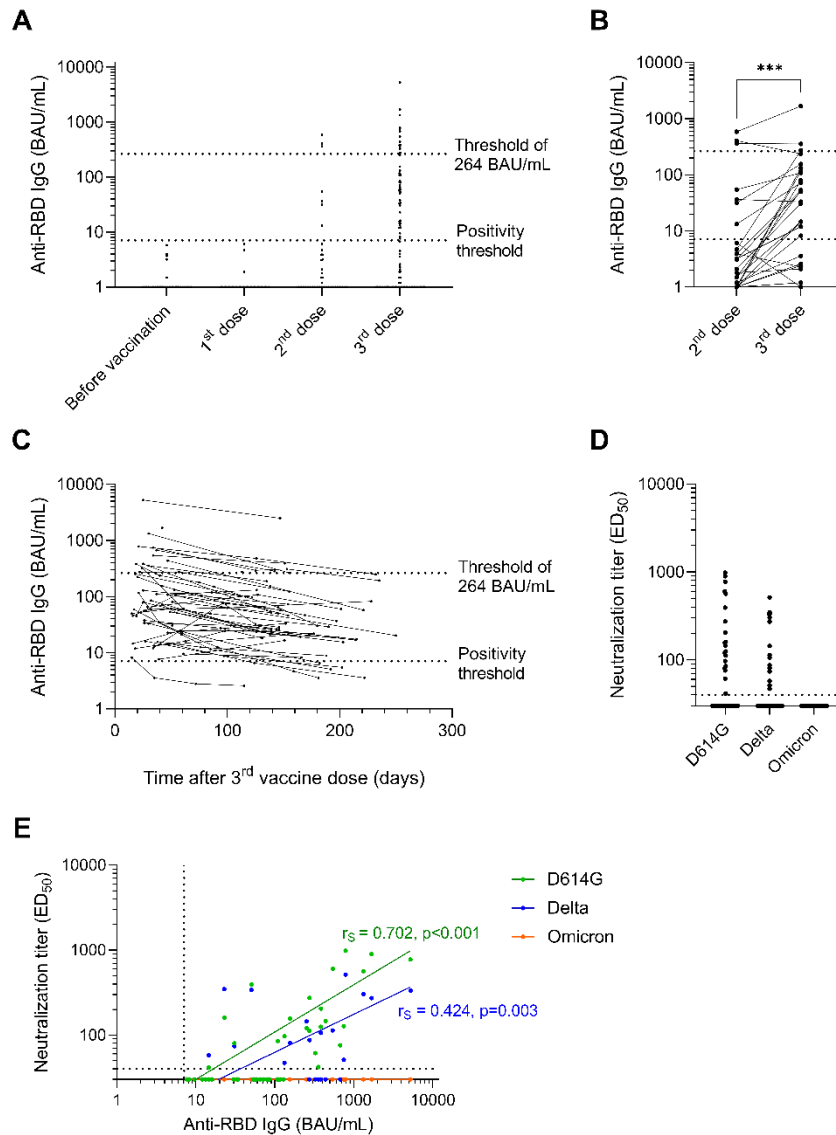


Figure 3: Antibody response after three vaccine doses in COVID-19-naive lung transplant recipients (n=126). **A.** Anti-RBD IgG titers expressed in BAU/mL before vaccination (n=126) and from two weeks to two months after the first (n=47), the second (n=54) and the third (n=126) vaccine doses. **B.** Anti-RBD IgG titers before and after the third vaccine doses in the 54 patients with sera available after the second dose. **C.** Dynamics of anti-RBD IgG titers expressed in BAU/mL over time after the third vaccine dose (n= 95 additional samples collected from 47 patients during follow-up). **A, B** and **C:** The dotted lines indicate the positivity threshold (7.1 BAU/mL) and the threshold of 264 BAU/mL used in French recommendations to guide prophylactic strategy in immunosuppressed patients. **D.** Neutralizing antibody titers assessed by pseudovirus-based assay against D614G, delta and omicron variants in the 47 patients seropositive after the third dose (responders). 22 (46.8%) and 15 (31.9%) sera neutralized the D614G and the delta variants, respectively, but none neutralized the omicron variant. The dotted horizontal black line indicates the cutoff for positivity (1:40 dilution). **E.** Spearman correlation between anti-RBD IgG titers and neutralizing antibody titers against D614G (green dots), delta (blue dots) and omicron (orange dots) variants. The dotted horizontal and vertical black lines correspond to the positivity thresholds of neutralizing antibody titers and anti-RBD IgG titers, respectively. The linear regressions, computed using the Graphpad Prism version 9.3.1. software, are depicted with calculated correlation coefficients (r_s) and p-values. BAU: Binding Antibody Units; ED50: half-maximal effective dilution; RBD: receptor-binding domain. ***p value <0.001.

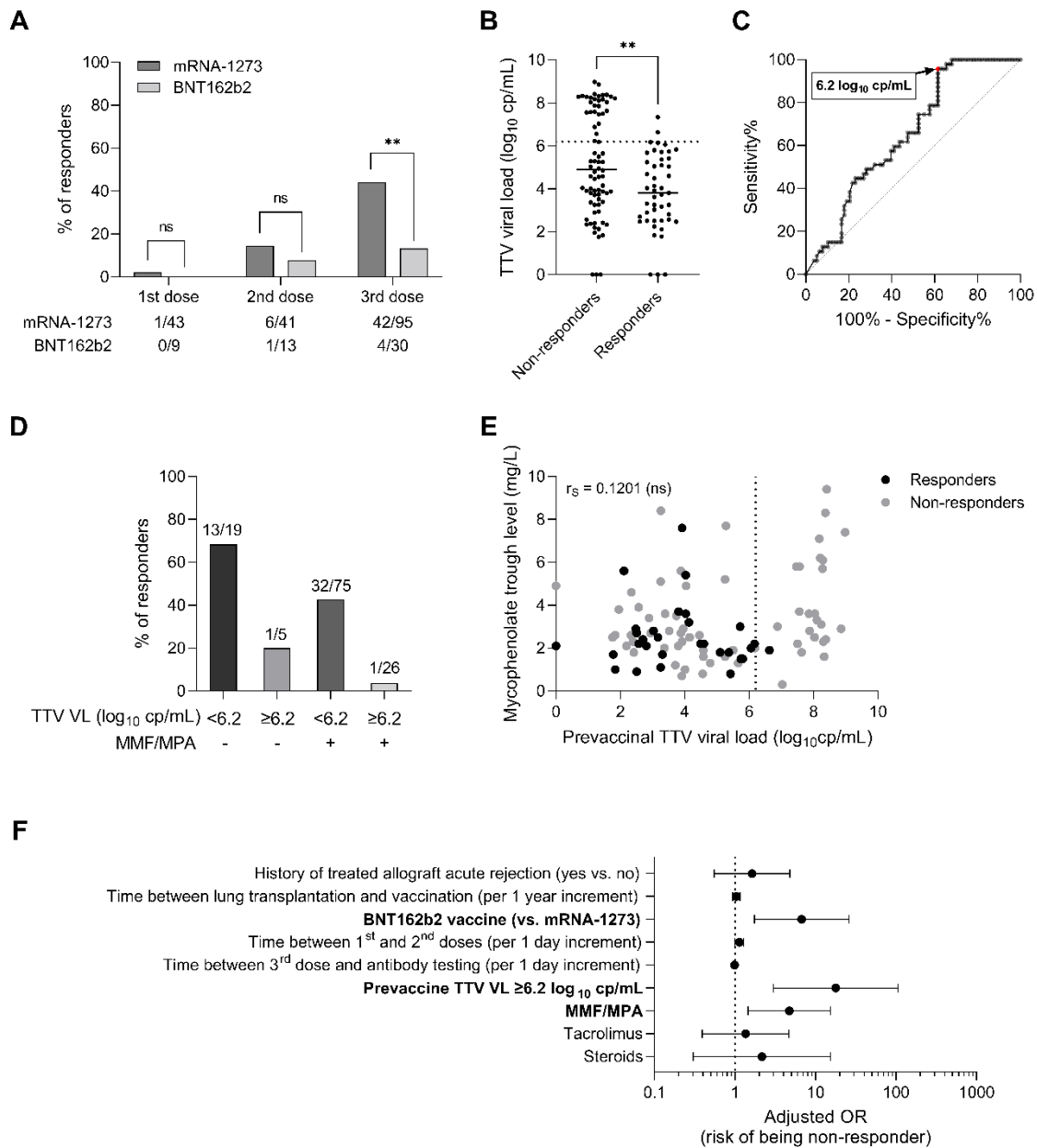


Figure 4: Investigation of predictors of vaccine response in COVID-19-naive lung transplant recipients (n=125). **A.** Vaccine response rates after each vaccine dose according to mRNA vaccine type. The number of responders to each vaccine dose is detailed below the bar chart. **B.** Prevaccine TTV viral load in non-responders (n=78) and responders (n=47) to a three-dose regimen of COVID-19 mRNA-based vaccine, with medians represented as solid horizontal lines. The dotted line indicates the predictive threshold of 6.2 log₁₀ cp/mL. Comparison was computed with Mann-Whitney test using Graphpad Prism version 9.3.1. software **C.** Receiver operating characteristics (ROC) curve for prediction of vaccine response based on prevaccine TTV viral load. Area under the curve (AUC): 0.6533. The threshold of 6.2 log cp/mL is associated with a negative predictive value of 93.5% (in case of high TTV viral load) and a positive predictive value of 47.9% (in case of low TTV viral load) for vaccine response in this cohort. **D.** Bar charts representing the percentage of responders after three vaccine doses according to the prevaccine TTV viral load and to MMF/MPA treatment at the time of the first vaccination. The number of LTR in each category of patients is mentioned above bars. **E.** Spearman correlation between TTV viral load and MPA trough level measured at the same time before vaccination in responders (black dots) and non-responders (grey dots) to three vaccine doses. The dotted line indicates the TTV viral load predictive threshold of 6.2

\log_{10} cp/mL. Correlation coefficient (r_s) was calculated using the Graphpad Prism version 9.3.1. software. **F.** Forest plot showing Odds Ratios (OR) estimates (indicated by black dots) and 95% confidence intervals (indicated by whiskers) of association between patient characteristics and lack of vaccine response to a three-dose regimen of COVID-19 mRNA-based vaccine. Multivariable logistic regression analysis was performed using SPSS 28.0 (IBM Statistics). Factors independently associated with poor vaccine response are in bold. MMF/MPA: mycophenolate mofetil/mycophenolic acid; OR: Odds ratio; TTV: Torque teno virus; VL: viral load. ** p value <0.01, ns: not significant.

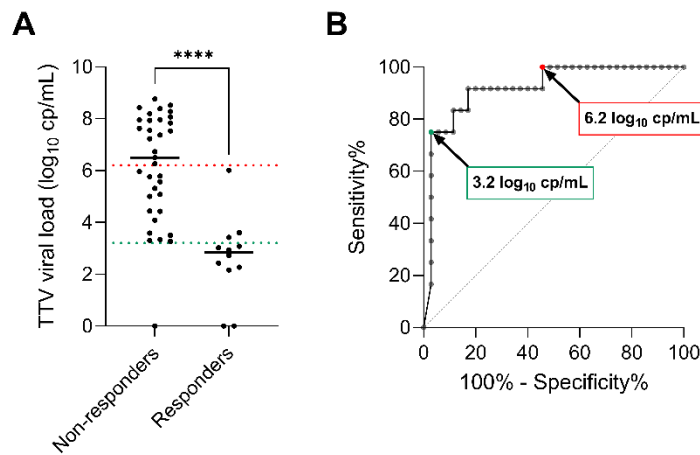


Figure 5: Investigation of TTV viral load as potential predictive biomarker of response to a third SARS-CoV-2 vaccine dose in COVID-19-naive lung transplant recipients determined as non-responders to the second dose. **A.** TTV viral load measured after the second vaccine dose in non-responders (n=35) and responders (n=12) to the third vaccine dose, with medians represented as solid horizontal lines. The dotted lines indicate the predictive thresholds of 6.2 log₁₀ cp/mL and 3.2 log₁₀ cp/mL associated with low and high rates of vaccine response, respectively. Comparison was computed with Mann-Whitney test using Graphpad Prism version 9.3.1. software. **B.** Receiver operating characteristics (ROC) curve for prediction of vaccine response to the third dose based on TTV viral load measured in seronegative LTR after the second vaccine dose. Area under the curve (AUC): 0.9190. The upper threshold of 6.2 log copies/mL is associated with a negative predictive value of 100% (in case of high TTV viral load) and a positive predictive value of 40.0% (in case of low TTV viral load) for vaccine response. Conversely, the lower threshold of 3.2 log copies/mL is associated with a negative predictive value of 91.9% (in case of high TTV viral load) and a positive predictive value of 90.0% (in case of low TTV viral load) for vaccine response in this cohort.

TTV: Torque teno virus. *****p* value <0.0001.

Torque teno virus DNA load as predictive marker of antibody response to a three-dose regimen of COVID-19 mRNA-based vaccine in lung transplant recipients

Floriane Gallais, PharmD,^{a,b} Benjamin Renaud-Picard, MD,^c Morgane Solis, PharmD, PhD,^{a,b} Elodie Laugel, MD,^{a,b} Eric Soulier,^b Sophie Caillard, MD, PhD,^{b,d} Romain Kessler, MD, PhD,^c Samira Fafi-Kremer, PharmD, PhD^{a,b}

^aVirology Laboratory, Strasbourg University Hospital, Strasbourg, France;

^bStrasbourg University, INSERM, IRM UMR-S 1109, Strasbourg, France;

^cDepartment of Pneumology, Strasbourg Lung Transplant Program, Strasbourg University Hospital, Strasbourg, France;

^dDepartment of Nephrology and Transplantation, Strasbourg University Hospital, Strasbourg, France.

Supplementary methods:

Pseudotyped virus-based neutralization assay

Neutralizing antibody titers were assessed by a pseudovirus-based assay in responders after the third vaccine dose against D614G, B.1.617.2 (delta), and B.1.1.529 (omicron) variants. Briefly, sera 2-fold serial dilutions (from 1:40 to 1:1,280) of sera in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) containing 10% fetal bovine serum were incubated with pseudotyped lentivirus particles of each variant at 37 °C for 1 h. Subsequently, 100 µL of this solution was added to 60%–80% confluent HEK293T-ACE2 cells (provided by O. Schwartz Laboratory, Institut Pasteur) seeded in 96-well plates. After 72h, the Bright-Glo luciferase assay substrate (Promega) was added to each well and the luminescence was measured by a MicroBetaTriLux 1450LSC luminescence counter (Perkin Elmer). The neutralization efficiency expressed as the log₁₀ of the median half-maximal effective dilutions (ED50) was calculated using Prism 9.3.1. Sera were considered positive if they neutralized more than 50% SARS-CoV-2 pseudovirus at 1:40 dilution.

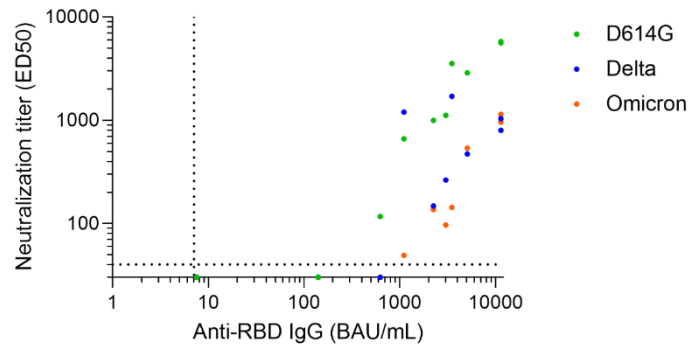


Figure S1: Neutralization of SARS-CoV-2 variants after three vaccine doses in LTR with a history of COVID-19 (n=10). Neutralizing antibody titers assessed by pseudovirus-based assay against D614G (green dots), delta (blue dots) and omicron (orange dots) variants are plotted against anti-RBD IgG titers. The dotted horizontal and vertical black lines correspond to the positivity thresholds of neutralizing antibody titer (1:40 dilution) and anti-RBD IgG titer (7.1 BAU/mL), respectively.

BAU: Binding Antibody Units; ED50: half-maximal effective dilution; RBD: receptor-binding domain.

Table S1: Demographic and clinical characteristics of the lung transplant recipients cohort

Variable	Total cohort n = 136	COVID-19 naïve LTR n = 126	LTR infected before vaccination n = 10
Age, years, median (IQR)	62.5 (51.0–67.0)	62.6 (51.1–66.8)	61.8 (30.3–67.7)
Female, n (%)	53 (39.0)	47 (37.3)	6 (60.0)
BMI, kg/m ² , median (IQR)	23.7 (20.5–27.0)	23.7 (20.5–27.0)	23.5 (20.6–26.9)
Cardiovascular comorbidities			
Hypertension, n (%)	78 (57.4)	72 (57.1)	6 (60.0)
Diabetes mellitus, n (%)	67 (49.3)	64 (50.8)	3 (30.0)
Maintenance immunosuppression			
Tacrolimus, n (%)	117 (86.0)	109 (86.5)	8 (80.0)
Cyclosporine, n (%)	15 (11.0)	14 (11.1)	1 (10.0)
MMF/MPA, n (%)	109 (80.1)	102 (81.0)	7 (70.0)
Azathioprine, n (%)	16 (11.8)	13 (10.3)	3 (30.0)
Prednisone, n (%)	128 (94.1)	120 (95.2)	8 (80.0)
Everolimus, n (%)	18 (13.2)	17 (13.5)	1 (10.0)
SARS-CoV-2 vaccine			
mRNA-1273, n (%)	101 (74.3)	95 (75.4)	6 (60.0)
BNT162b2, n (%)	34 (25.0)	30 (23.8)	4 (40.0)
mRNA-1273 + BNT162b2, n (%)	1 (0.7)	1 (0.8)	0 (0.0)
Time between transplantation and first vaccination, years, median (IQR)	5.5 (2.6–9.0)	5.6 (2.6–9.0)	4.7 (3.1–8.9)
Time of 2nd vaccine from 1st vaccine, days, median (IQR)	28.0 (28.0–28.0)	28.0 (28.0–28.0)	28.0 (28.0–30.3)
Time of 3rd vaccine from 2nd vaccine, days, median (IQR)	59.0 (35.3–73.0)	59.0 (34.8–72.3)	51.5 (34.8–79.8)
Time of 3rd vaccine to antibody testing, days, median (IQR)	34.0 (25.0–47.0)	34.0 (24.8–47.0)	34.5 (24.3–62.8)

BMI: body mass index, IQR: interquartile range, MMF/MPA: mycophenolate mofetil/mycophenolic acid, TTV: Torque teno virus.

Table S2: Immunosuppressive therapy in COVID-19 naive LTR

	LTR non-responders to three-dose vaccine regimen <i>n</i> = 79	LTR responders to three-dose vaccine regimen <i>n</i> = 47	p-value
Maintenance immunosuppression combination, n (%)			0.022
Tacrolimus, mycophenolate, prednisone	60 (75.9)	22 (46.8)	
Ciclosporine, mycophenolate, prednisone	6 (7.6)	5 (10.6)	
Tacrolimus, everolimus, prednisone	6 (7.6)	3 (6.4)	
Tacrolimus, azathioprine, prednisone	3 (3.8)	7 (14.9)	
Tacrolimus, everolimus, mycophenolate, prednisone	2 (2.5)	2 (4.3)	
Tacrolimus, prednisone	0	1 (2.1)	
Tacrolimus, mycophenolate	0	2 (4.3)	
Ciclosporine, everolimus, mycophenolate, prednisone	1 (1.3)	0	
Ciclosporine, prednisone	1 (1.3)	0	
Tacrolimus, azathioprine	0	1 (2.1)	
Ciclosporine, mycophenolate	0	1 (2.1)	
Everolimus, mycophenolate, prednisone	0	1 (2.1)	
Everolimus, azathioprine, prednisone	0	2 (4.3)	

Maintenance immunosuppression combinations identified just before vaccination were compared between responders and non-responders using the Fisher exact test with Graphpad Prism version 9.3.1. software.

Table S3: Final model statistics for prediction of non-response to a three-dose regimen of COVID-19 vaccine in lung transplant recipients

Variable	Adjusted odds ratio (risk to be a non-responder)	95% CI	p-value
BNT162b2 vaccine (vs. mRNA-1273)	7.151	1.939– 26.364	0.003
Time between first and second doses (per 1 day increment)	1.122	0.994– 1.266	0.063
Prevaccine TTV viral load $\geq 6.2 \log_{10}$ cp/mL	22.103	3.828– 127.621	<0.001
MMF/MPA	5.110	1.584– 16.492	0.006

Multivariable logistic regression analysis was performed using SPSS 28.0 (IBM Statistics). Variables associated with p-values below 0.1 were implemented in this final model. Factors independently associated with poor vaccine response are in bold.

CI: confidence interval, MMF/MPA: mycophenolate mofetil/mycophenolic acid, TTV: Torque teno virus.

D. Discussion

Au cours de cette étude, nous avons mis en évidence un faible taux de séroconversion de 37 % après l'administration de trois doses de vaccin à ARNm chez les TP sans antécédent de COVID-19. Il n'y a pour le moment pas d'autres données figurant dans la littérature quant à la réponse à la troisième dose vaccinale développée au sein de la population spécifique des TP. Des études menées chez d'autres types de transplantés d'organe solide ont décrit une séroconversion suite à la troisième dose chez environ la moitié des patients non répondeurs à la deuxième dose (515–517), tandis que ce gain n'était que de 25 % dans notre cohorte, probablement du fait d'une immunosuppression plus intense chez les TP. De plus, la réponse humorale était globalement peu fonctionnelle chez les patients répondeurs dans notre étude, avec de faibles titres d'anticorps et sans mise en évidence d'un pouvoir neutralisant contre le variant omicron. En ligne avec nos résultats, une étude portant sur des patients transplantés d'organe de plusieurs types rapporte une neutralisation du variant omicron chez seulement l'un des onze TP inclus après vaccination par trois doses de Moderna, avec une concentration médiane en IgG anti-RBD très élevée de près de 10 000 BAU/mL observée chez l'ensemble des patients transplantés d'organe solide qui neutralisaient ce variant (518).

À l'inverse, les TP avec antécédent de COVID-19 inclus dans notre étude avaient tous développé une immunité humorale après l'infection, dont la force a été potentialisée par la vaccination avec une neutralisation du variant omicron observée chez la majorité des patients. La meilleure réponse induite par l'infection en comparaison de celle induite par la vaccination a été décrite dans la littérature chez les patients transplantés d'organe solide (519), avec une immunité humorale et cellulaire comparable à celle développée par les sujets immunocompétents suite à l'infection (520,521). L'administration d'une seule dose vaccinale est suffisante chez les patients transplantés convalescents pour accroître la réponse vaccinale à un niveau équivalent à celui des sujets immunocompétents infectés puis vaccinés, sans bénéfice démontré de l'administration de doses supplémentaires (522). Nous ne disposions toutefois pas d'échantillons sanguins prélevés après la première dose vaccinale chez les TP

convalescents inclus dans notre étude pour objectiver cette absence de bénéfice des deuxième et troisième doses chez ces patients.

Plusieurs facteurs prédictifs de la réponse vaccinale ont été identifiés chez les TP non infectés au cours de cette étude. L'un d'eux correspond au type de vaccin à ARNm administré, avec une meilleure réponse obtenue avec le vaccin de Moderna. Cette différence d'immunogénicité s'explique probablement en majeure partie par la différence de quantité d'ARNm incluse dans chaque dose vaccinale, plus importante pour le vaccin de Moderna (100 µg/dose) que le vaccin de BioNTech (30 µg). D'autres différences existent entre ces deux vaccins, à savoir de rares différences dans la séquence exacte de l'ARNm, la composition lipidique des nanoparticules qui peut éventuellement influencer sur l'efficacité de l'entrée de l'ARNm dans les cellules de l'hôte, et enfin le délai optimal recommandé entre les deux premières doses vaccinales, de 4 semaines pour le vaccin de Moderna et de 3 semaines pour le vaccin de Pfizer-BioNTech (68). Une différence d'immunogénicité entre ces deux vaccins a été décrite dans d'autres études conduites chez des TP et d'autres populations de patients immunodéprimés, qui rapportent davantage de séroconversions et des pics d'anticorps plus élevés obtenus avec le vaccin de Moderna (523–529). Une étude récente a par ailleurs démontré une supériorité du vaccin de Moderna sur les fonctions effectrices non neutralisantes des anticorps, avec davantage d'activation des cellules NK et d'activité phagocytaire par les polynucléaires neutrophiles induites par les anticorps produits en réponse à ce vaccin en comparaison de celui de Pfizer-BioNTech (530). L'ensemble de ces données tendraient donc à faire privilégier la vaccination des immunodéprimés par le vaccin de Moderna, mais ceci ne figure pour le moment pas dans les recommandations actuelles et ce vaccin est à éviter chez les personnes de moins de 30 ans du fait du risque accru de myocardite chez cette population.

Un autre facteur identifié dans notre étude comme indépendamment associé à un défaut de réponse humorale au vaccin chez les TP était le traitement par mycophénolate. Cette observation est concordante avec les conclusions d'études indépendantes, qui décrivent également une réponse humorale plus faible au vaccin anti-SARS-CoV-2 sous mycophénolate

(516,517,524,531–533). Cet immunosuppresseur est un antimétabolite qui empêche la prolifération des lymphocytes B et T en inhibant la synthèse *de novo* de bases puriques (519). De plus, les résultats d'une étude réalisée dans le cadre d'une collaboration avec une équipe de Lyon et portant sur des patients transplantés rénaux suggèrent que le mycophénolate altère la physiologie des centres germinatifs au sein des organes lymphoïdes secondaires, d'où son effet délétère sur la réponse humorale après vaccination (519). Devant ces observations, il pourrait être tentant de diminuer la posologie ou de suspendre temporairement le traitement par mycophénolate avant vaccination pour augmenter les chances de réponse. Cependant, aucune étude prospective n'a évalué cette stratégie pour le moment, et cette intervention thérapeutique pourrait être délétère en déséquilibrant le traitement immunosuppresseur et augmentant ainsi le risque de rejet du greffon. De plus, 32,7 % des TP non infectés inclus dans notre étude et traités par mycophénolate ont développé une réponse positive en anticorps après trois doses de vaccin anti-SARS-CoV-2 (vs. 58,3 % des TP sans traitement par mycophénolate), montrant bien que la prise de ce traitement ne suffit pas à expliquer un défaut de séroconversion.

En vue de prédire plus finement la réponse vaccinale des TP, nous avons évalué la valeur prédictive de la charge virale sanguine de TTV qui reflète l'état d'immunosuppression global des patients. L'intérêt de ce marqueur a déjà été montré par ailleurs chez les TP pour prédire d'autres événements cliniques, à savoir un risque accru de rejet chronique sous la forme de dysfonction chronique du greffon (*Chronic Lung Allongraft Dysfunction*, CLAD) en cas de charge virale faible, et à l'inverse un risque de survenue d'infections opportunistes en cas de charge virale très élevée (534,535). Nos résultats révèlent une association étroite entre ce biomarqueur et la réponse vaccinale anti-SARS-CoV-2. En effet, une charge virale de TTV de plus de $6,2 \log_{10}$ cp/mL avant vaccination, traduisant une immunité humorale et cellulaire très affaiblie, était presque systématiquement associée à un défaut de réponse humorale. La valeur prédictive de ce marqueur était encore plus forte en cas de mesure juste avant la troisième dose chez les TP non répondeurs à la seconde dose. Chez cette sous-population

de patients, deux seuils de charge virale de TTV ont pu être définis, l'un associé à un très bon pronostic pour la réponse vaccinale ($<3,2 \log_{10}$ cp/mL) et le second à l'inverse très péjoratif ($\geq 6,2 \log_{10}$ cp/mL). Le seuil de $3,2 \log_{10}$ cp/mL ne doit pas être considéré comme une cible à atteindre avant vaccination via un allègement du traitement immunosuppresseur, car ceci favoriserait la survenue de rejet du greffon. Toutefois, les résultats de cette étude révèlent que la charge virale de TTV a une forte valeur indicative des chances de réponse vaccinale. À ce titre, ce marqueur pourrait être utilisé par les cliniciens pour guider la décision quant à la stratégie à adopter pour la prophylaxie contre la COVID-19 en cas de défaut de séroconversion après les premières doses vaccinales, en aidant au choix à opérer entre l'administration de doses vaccinales supplémentaires ou d'anticorps monoclonaux. De plus, nos résultats ont très récemment été appuyés par ceux d'une étude indépendante menée sur des TP vaccinés par deux doses du vaccin de Moderna. Cette étude décrit également un intérêt de la charge virale de TTV mesurée avant la vaccination pour prédire la réponse après deux doses, avec 8 % de répondeurs en cas de charge virale supérieure à $6,5 \log_{10}$ cp/mL et 54 % en dessous de $3,8 \log_{10}$ cp/mL (536). Ces seuils sont très proches de ceux déterminés dans notre étude et confortent nos conclusions. À présent, d'autres études sont nécessaires pour évaluer l'utilisation de ce marqueur comme outil décisionnel de stratégie vaccinale. De plus, nos résultats ouvrent la voie à d'autres études similaires conduites sur des cohortes d'autres types de patients immunodéprimés, et plus largement sur la valeur prédictive de la charge virale de TTV pour prédire la réponse à la vaccination contre d'autres pathogènes tels que l'hépatite B ou encore le virus de la grippe.

Partie III : Caractérisation de l'immunité anamnétique dans deux cas d'infection post-vaccinale

I. Contexte et objectifs de l'étude

Malgré la forte efficacité de la vaccination anti-SARS-CoV-2 chez les sujets immunocompétents contre l'infection et *a fortiori* contre les formes graves de COVID-19, les premiers cas d'infection post-vaccinale ont rapidement été décrits, de sévérité moindre en comparaison des sujets non vaccinés en restant généralement asymptomatiques ou restreints à de légers symptômes (537). Ces infections post-vaccinales touchaient initialement davantage les personnes âgées ou immunodéprimées, bien qu'une diminution de l'âge moyen des personnes concernées ait été observée avec l'évolution de la pandémie (538,539). L'efficacité vaccinale contre les infections dépend également du type de vaccin administré, avec une meilleure protection conférée par les vaccins à base d'ARNm. Par ailleurs, le risque d'infection post-vaccinale augmente à distance des deux doses de la primo-vaccination, du fait de la chute de l'immunité et en particulier des anticorps neutralisants, d'où la préconisation d'une dose de rappel (540). Néanmoins, des cas d'infection post-vaccinale ont également été rapportés quelques semaines suivant la seconde dose, au moment où l'immunité humorale et cellulaire induite par la vaccination est censée être maximale, sans que les déterminants de ce défaut de protection ne soient bien établis lors de la description des premiers cas. Ainsi, deux cas d'infection post-vaccinale symptomatique ont été portés à notre connaissance au mois de mars 2021, qui étaient alors peu fréquentes étant donné que les premières vaccinations ont débuté en janvier de la même année. Ces infections de forme légère sont survenues chez deux femmes de moins de 50 ans sans immunosuppression, environ un mois après la seconde dose du vaccin de Pfizer-BioNTech. En l'absence de cause évidente de défaut de protection vaccinale chez ces patientes, nous avons entrepris de caractériser leur immunité dirigée contre le SARS-CoV-2 très tôt après le début de l'infection, reflet de

l'immunité vaccinale ayant permis ces infections, et à distance après trois mois. Pour cela, nous avons étudié leur immunité humorale via la détermination de la concentration en anticorps et de leur pouvoir neutralisant contre trois variants (D614G, alpha et beta). Nous avons également exploré leur réactivité cellulaire en analysant l'expression de marqueurs d'activation et la production de cytokines suite à la stimulation des lymphocytes T par des peptides de la protéine S de la souche sauvage et des variants alpha et beta. Cette étude visait ainsi à mieux comprendre la physiopathologie des infections post-vaccinales, au cours d'une période où le variant omicron n'avait pas encore émergé.

II. Principaux résultats

La première patiente (P1) de 46 ans, atteinte d'obésité et sans autre comorbidité, a été infectée 28 jours après la seconde dose vaccinale par un variant alpha du SARS-CoV-2. Celui-ci était détectable sur frottis nasopharyngés pendant plus de deux semaines, et responsable de symptômes légers mais prolongés s'étendant sur une période d'un mois, avec une fatigue et des arthralgies persistantes encore jusqu'à trois mois. Un prélèvement sanguin réalisé trois jours après le début des symptômes était associé à une sérologie positive en IgG anti-RBD à une concentration relativement faible (70 BAU/mL), sans aucun pouvoir neutralisant contre l'ensemble des variants du SARS-CoV-2 testés y compris le variant alpha. Au même moment, aucune immunité humorale muqueuse anti-S n'était détectable sur frottis nasopharyngé, que ce soit en IgG ou en IgA. L'immunité cellulaire spécifique de la protéine S développée suite à la vaccination était elle aussi déficiente chez cette patiente, avec une faible réactivité en lymphocytes T CD4+ produisant de l'IL-2 et en lymphocytes T CD8+ produisant de l'IFN- γ contre tous les variants.

Le cas de la seconde patiente (P2) était différent. Celle-ci, âgée de 25 ans et sans aucune comorbidité, a présenté de légers symptômes de COVID-19 suite à une infection par le variant beta du SARS-CoV-2 45 jours après la complétion de sa primo-vaccination, mais avec une réplication virale de plus courte durée (RT-PCR négative à 10 jours) et une guérison complète en deux semaines. Sa sérologie réalisée 4 jours après le début des symptômes a révélé une forte réponse humorale à la vaccination, avec une concentration en IgG anti-RBD de 1220 BAU/mL. Toutefois, celle-ci était associée à un défaut de neutralisation du variant beta en comparaison des autres variants testés. L'immunité cellulaire évaluée le même jour était robuste avec une fréquence élevée de lymphocytes T anti-S producteurs de cytokines.

Suite à l'infection, un gain en neutralisation et en réponse cellulaire a été observé contre l'ensemble des variants chez les deux patientes, maintenu lors du suivi réalisé à trois mois. De plus, l'infection a induit l'établissement d'une immunité muqueuse au niveau du tractus respiratoire avec des IgG et des IgA anti-S encore localement détectables après trois mois.

III. Article n°5

Case report: Evolution of humoral and cellular immunity in two COVID-19 breakthrough infections after BNT162b2 vaccine.

Floriane Gallais, Pierre Gantner, Delphine Planas, Morgane Solis, Timothée Buel, Florian Pierre, Eric Soulier, Paola Rossolillo, Slim Fourati, Jean Sibilia, Olivier Schwartz, Samira Fafi-Kremer.

Frontiers in Immunology. 2022 Feb 23;13:790212.



Case Report: Evolution of Humoral and Cellular Immunity in Two COVID-19 Breakthrough Infections After BNT162b2 Vaccine

Floriane Gallais^{1,2†}, Pierre Gantner^{1,2†}, Delphine Planas^{3,4,5}, Morgane Solis^{1,2},
Timothée Bruel^{3,4,5}, Florian Pierre^{1,2}, Eric Soulier^{1,2}, Paola Rossolillo⁶, Slim Fourati^{7,8},
Jean Sibilia⁹, Olivier Schwartz^{3,4,5} and Samira Fafi-Kremer^{1,2*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Julia G. Prado,
IrsiCaixa, Spain

Reviewed by:

Megan K. L. MacLeod,
University of Glasgow,
United Kingdom

Vainav Patel,
National Institute for Research in
Reproductive Health (ICMR), India

*Correspondence:

Samira Fafi-Kremer
samira.fafi-kremer@unistra.fr

†These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Viral Immunology,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 06 October 2021

Accepted: 31 January 2022

Published: 23 February 2022

Citation:

Gallais F, Gantner P, Planas D,
Solis M, Bruel T, Pierre F, Soulier E,
Rossolillo P, Fourati S, Sibilia J,
Schwartz O and Fafi-Kremer S (2022)

Case Report: Evolution of
Humoral and Cellular Immunity in
Two COVID-19 Breakthrough
Infections After BNT162b2 Vaccine.
Front. Immunol. 13:790212.
doi: 10.3389/fimmu.2022.790212

¹ CHU de Strasbourg, Laboratoire de Virologie, Strasbourg, France, ² Strasbourg University, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Unité Mixte de Recherche Scientifique Immuno-Rhumatologie Moléculaire (IRM UMR-S) 1109, Strasbourg, France, ³ Virus & Immunity Unit, Department of Virology, Institut Pasteur, Paris, France, ⁴ Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Unité Mixte de Recherche (UMR) 3569, Paris, France, ⁵ Vaccine Research Institute, Creteil, France, ⁶ Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche (UMR) 7104, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Université de Strasbourg, Illkirch, France, ⁷ Department of Virology, Hôpital Henri Mondor, Créteil, France, ⁸ Mondor Institute for Biomedical Research (IMRB), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Unité Mixte de Recherche (UMR) 955, Créteil, France, ⁹ CHU de Strasbourg, Département de Rhumatologie, Strasbourg, France

Background: SARS-CoV-2 breakthrough infections after complete vaccination are increasing whereas their determinants remain uncharacterized.

Methods: We analyzed two cases of post-vaccination SARS-CoV-2 infections by α and β variants, respectively. For each participant both humoral (binding and neutralizing antibodies) and cellular (activation markers and cytokine expression) immune responses were characterized longitudinally.

Results: The first participant (P1) was infected by an α variant and displayed an extended and short period of viral excretion and symptom. Analysis of cellular and humoral response 72 h post-symptom onset revealed that P1 failed at developing neutralizing antibodies and a potent CD4 memory response (lack of SARS-CoV-2 specific CD4⁺IL-2⁺ cells) and CD8 effector response (CD8⁺IFN γ ⁺ cells). The second participant (P2) developed post-vaccination SARS-CoV-2 infection by a β variant, associated with a short period of viral excretion and symptoms. Despite displaying initially high levels and polyfunctional T cell responses, P2 lacked initial β -directed neutralizing antibodies. Both participants developed and/or increased their neutralization activity and cellular responses against all variants, namely, β and δ variants that lasts up to 3 months after breakthrough infection.

Conclusions: An analysis of cellular and humoral response suggests two possible mechanisms of breakthrough infection: a poor immune response to vaccine and viral evasion to neutralizing antibodies.

Keywords: SARS-CoV-2, variant of concern, vaccine, immune evasion, breakthrough infection

INTRODUCTION

Since the end of the last year, multiple effective vaccines against the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) have been developed in record time to address the COVID-19 pandemic. The BNT162b2 vaccine (Comirnaty, Pfizer-BioNTech) was the first one authorized across the European Union in December and represents today one of the largest supplies of COVID-19 vaccines worldwide. The phase III clinical trial on this mRNA vaccine concluded to an efficacy of 95% of the two-dose regimen against COVID-19, and further observational studies also found efficacy over 90%. According to recent reports, this vaccine keeps its effectiveness against severe COVID-19 linked to escape variants B.1.351 and B.1.617.2 despite a slightly reduced effectiveness against infection. SARS-CoV-2 breakthrough infections after two-dose vaccination are increasing and mainly involve variants of concern (1–3). People of older age or immunocompromised individuals are particularly at risk, especially in the current context of circulation of delta variant (4). However, the mean age of breakthrough cases is now lowering, as younger age groups are now vaccinated.

Here we thoroughly analyzed two cases of mild COVID-19 breakthrough infections diagnosed by reverse transcriptase polymerase-chain-reaction (RT-PCR) on nasopharyngeal swabs at least four weeks after second dose of BNT162b2 vaccine in two women under 50 years of age. Both infecting strains were identified as SARS-CoV-2 variants of concern. Specific humoral and cellular immune responses were characterized early in acute phase of infection to determine in which post-vaccinal immune conditions these infections occurred. These responses were also monitored during the infection course and three months later. Altogether, these observations on multiple virological and immunological aspects would help to better understand physiopathology of breakthrough infections subsequent to complete vaccination.

METHODS

Patient Disease Histories

Patient 1 (P1) was a 46-year-old woman with obesity (body-mass index = 30.5) despite bypass surgery three years earlier. She received the first dose of BNT162b2 vaccine (Comirnaty®) on January 31, 2021 and the second dose on February 21. On March 22 (28 days later), she developed fever, chills, rhinorrhea, sore throat and later muscular pain and cough. She tested positive for SARS-CoV-2 RNA the next day. All symptoms resolved after four weeks except muscle weakness and arthralgia which persisted for three months.

Patient 2 (P2) was a healthy 25-year-old woman. She received the first dose of Comirnaty® on January 8, 2021 and the second dose on January 29. On March 15 (45 days after the second dose), she developed headache, rhinorrhea, loss of smell and night sweats and tested positive for SARS-CoV-2 RNA the same day. A severe fatigue and a slight shortness of breath caused by effort developed in the following days. She completely recovered after two weeks.

Samples and Data Collection

Nasopharyngeal swabs were sampled at 3, 9, 16, and 85 days after symptom onset (DSO) in P1 and at 0, 10, and 91 DSO in P2. Blood samples were collected at 3–4, 9–10, 16–24, and 85–91 DSO in P1 and P2, respectively. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from the first and the last blood sample collected in each patient and cryo-preserved at -150°C until use. The study was approved by the Ethics Committee of the University Hospital of Strasbourg (N°CE-2020-51). Written informed consent was provided by both participants.

SARS-CoV-2 RT-PCR Assay

All nasopharyngeal swabs, except the sample collected at diagnosis in P2, were analyzed in our laboratory with SARS-CoV-2 specific primers and probes targeting two regions on the viral RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) gene, namely IP2 and IP4 (Institut Pasteur, Paris, France; WHO technical guidance). Cycle thresholds (Ct) values obtained with IP2 target were considered for analyses.

SARS-CoV-2 Genome Sequencing

Full-length SARS-CoV-2 genome sequencing were performed for both patients on a NextSeq 500 device (Illumina) as previously described (5) (see **Supplementary Methods**). Lineages and clades were interpreted using Pangolin and NextClade, before being submitted to the GISAID database.

Serological Assays

IgG directed against the SARS-CoV-2 nucleocapsid (N) and the Receptor Binding Domain (RBD) of the spike (S) protein were quantified using the chemiluminescence microparticle immunoassays (CMIA) Abbott Architect SARS-CoV-2 IgG and SARS-CoV-2 IgG Quant II (Abbott), respectively. Anti-S IgG and IgA were measured by S-Flow assay based on the recognition of SARS-CoV-2 S protein expressed on the surface of human embryonic kidney (HEK) 293T cells, as described previously (6) (see **Supplementary Methods**).

Neutralization Assays

Neutralizing antibody titers were measured for each serum using a viral pseudoparticle-based assay. Pseudoparticles (provided by Rossolillo Laboratory, IGBMC) harboring the S protein of D614G, alpha or beta variants on their surface and encoding for a luciferase reporter gene were preincubated for 1 h at $+37^{\circ}\text{C}$ with serial serum dilutions. The mix were added to 293T-ACE2 target cells (provided by O Schwartz Laboratory, Institut Pasteur) plated in 96-well plates with 30,000 cells per well. The luciferase signal was measured after 72 h incubation at 37°C . Analyses were performed in triplicates and the neutralization titer was defined as the geometric mean \log_{10} of the sample dilutions that yielded 50% inhibition of pseudoparticle infectivity ($\log_{10} \text{IC}_{50}$). Sera were considered neutralizing if the 1:40 dilution ($1.60 \log_{10}$) did mediate at least a 50% luminometric signal reduction relative to the control condition without serum.

A live-virus neutralizing assay using the S-Fuse reporter cells was performed using D614G, alpha, beta, and delta variants, as previously described (7). Briefly, S-Fuse U2OS cells expressing

ACE2 and either GFP1–10 or GFP11 were infected with SARS-CoV-2 incubated with serial serum dilutions. Infection with SARS-CoV-2 was measured by numbering GFP-producing syncytia formed upon productive infection after 18 h. Neutralization of infectious D614G, B.1.1.7, B.1.351, and B.1.617.2 variants was assessed for each serum. Neutralizing activity of each serum was expressed as the \log_{10} of half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}), with the first serum dilution tested of 1:30 ($1.48 \log_{10}$) set as positivity threshold.

ELISpot Assay

SARS-CoV-2 specific T cell immune response was investigated by an interferon gamma (IFN- γ) enzyme linked immunospot (ELISpot) assay on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). Cells were seeded at 250,000 PBMCs/well and stimulated for 20 ± 4 h in duplicates with overlapping 15-mer peptide pools spanning the N-terminal and C-terminal fractions of SARS-CoV-2 S proteins (S1 and S2, respectively) of the wild-type (WT) SARS-CoV-2 strain and the alpha (α) and beta (β) variants (PepMix™, JPT Peptide Technologies). Cells with AIM-V culture medium (Gibco Life Technologies) were used as negative controls and with phytohemagglutinin-L (PHA, Sigma-Aldrich) as positive controls. PBMCs were cultured overnight (20 ± 4 h) at 37°C before enzymatic revelation of IFN- γ capture. Spots were counted using an ELISPOT reader (AID iSpot). Results were expressed as the mean number of spot forming units (SFU)/ 10^6 PBMCs after subtraction of the background value. The threshold defining a significant T cell reactivity for one antigen was set at exceeding three standard deviations of the negative control background.

AIM and ICS Assays

Antigen specific and cytokine-expressing cells were characterized by activation-induced marker (AIM) and intra-cellular staining (ICS) assays (see **Supplementary Methods**). Thawed PBMCs were put in culture at a concentration of 10 million cells/ml. After a rest of 1 h at 37°C, a CD40 blocking antibody was added. After 15 min at 37°C, cells were stimulated with 0.5 μ g/ml PHA or 0.44 μ g/ml of overlapping peptide pools spanning S1 and S2 of WT, alpha and beta SARS-CoV-2 strains (PepMix™, JPT Peptide Technologies) for 9 h at 37°C allowing for upregulation of CD69/CD40L/OX40 on antigen-specific cells (AIM⁺). Cells were further incubated for 12 additional hours at 37°C in the presence of Brefeldin A (Sigma) to allow for subsequent intracellular cytokines accumulation. An unstimulated condition served as a negative control.

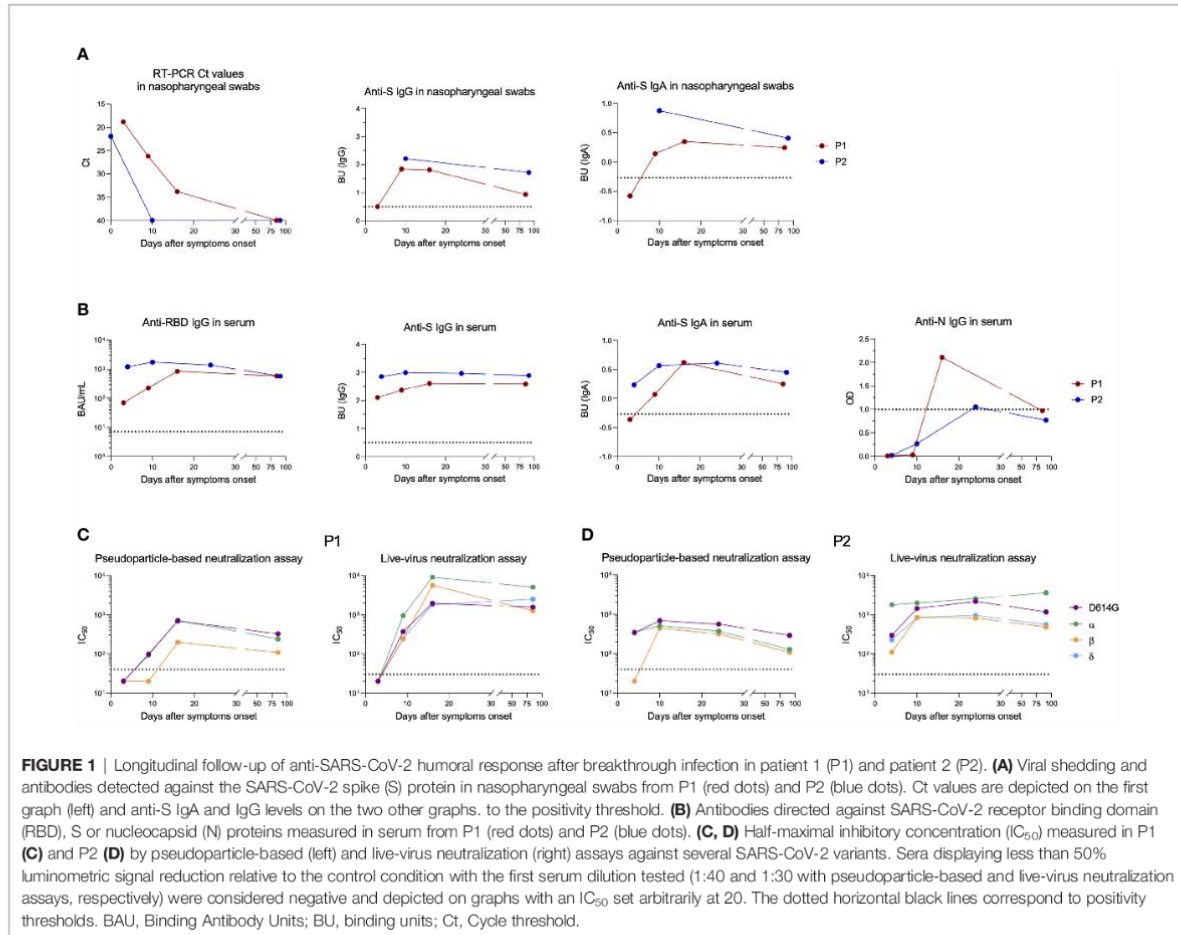
Cells were then collected, stained with the Aqua Live/Dead staining kit (ThermoFisher Scientific), for 20 min at 4°C and then with antibodies against extracellular molecules. After fixation with paraformaldehyde and permeabilization with the PermWash buffer (BD), cells were stained with antibodies targeting intracellular cytokines for an additional 45 min at room temperature. Cells were then washed and resuspended in PBS for subsequent analysis. After acquisition (Navios, Beckman-Coulter), analysis was performed using FlowJo software version 10.7.1.

RESULTS

The nasopharyngeal swab from P1 showed a high viral load of alpha variant (cycle threshold (Ct) = 18.8) at 3 DSO, that lasted until 16 DSO (Ct: 33.8) (**Figure 1A**). Mucosal anti-S IgA and IgG were negative at 3 DSO, appeared at 9 DSO and persisted until day 85 (**Figure 1A**). Serum sample collected at 3 DSO was positive for anti-RBD (70 BAU/ml) and anti-S IgG (**Figure 1B**). This serum failed to neutralize any of the viral strains (**Figure 1C**). At 16 DSO, Anti-RBD IgG increased by $1.08 \log_{10}$ (846 BAU/ml), neutralization titers reached over $2 \log_{10}$ IC_{50} against the 4 viral strains (D614G, alpha, beta, and delta) and persisted until 85 DSO. Anti-S IgA and anti-N IgG appeared at 9 and 16 DSO, respectively (**Figure 1B**). Anti-S IgA persisted during follow-up while anti-N IgG became negative after three months.

At the time of diagnosis, P2 displayed a high viral load of beta variant (Ct = 21.9) (**Figure 1A**). Because of the presence of lysis buffer in transport medium of the nasopharyngeal swab collected at the day of diagnosis, we were not able to analyze anti-S IgG and IgA. On day 10, anti-S IgG and IgA were positive in the nasopharyngeal swab and RNA became undetectable (**Figure 1A**). Anti-RBD IgG (1,220 BAU/ml) and also anti-S IgG and IgA were positive in serum at 4 DSO, whereas no anti-N IgG were detected (**Figure 1B**). At this time, neutralization was negative against beta variant with pseudoparticle-based assay and weak ($2.04 \log_{10}$ IC_{50}) with live-virus neutralization assay (**Figure 1D**). Serum anti-RBD IgG slightly increased by day 10 (1,739 BAU/ml) and neutralizing antibody titer reached at least $2.6 \log_{10}$ IC_{50} against beta variant and persisted up to 3 months against all tested variants (**Figure 1D**).

In contrast to humoral response, SARS-CoV-2 specific T cell response was not different between viral variants. Early after infection, the frequency of IFN- γ -producing T cells directed against the S protein was higher in P2 (mean S1 \pm standard deviation (SD) between all variants: 323 ± 31 SFU/ 10^6 PBMCs, S2: 293 ± 49 SFU/ 10^6 PBMCs) than that observed in P1 (S1: 24 ± 11 SFU/ 10^6 PBMCs, S2: 70 ± 16 SFU/ 10^6 PBMCs) (**Figures 2A, S1**). Low frequency of CD8⁺IFN γ ⁺ cells were also observed by ICS assay in P1 while CD4⁺IFN γ ⁺ T cells and also those expressing TNF α were detected at similar frequencies between participants (**Figures 2B, C, S2**). Interestingly, IL-2-expressing CD4⁺ T cells were also detected at lower frequencies in P1 compared to P2. P1 tended to display lower rates of antigen-specific CD4⁺ (CD4⁺AIM⁺, CD69⁺OX40⁺CD40L⁺) cells than P2 (ranging between 0.20–0.32 and 0.18–0.45%, respectively), but both displayed similar rates of CD8⁺AIM⁺ cells (ranging between 0.22 and 0.83%). Three months later, CD4⁺AIM⁺ frequencies remained slightly lower in P1 while CD8⁺AIM⁺ frequencies decreased to reach the same range (0.03–0.11%) in both participants. Conversely, the frequency of S-specific IFN- γ -producing T cells (CD4⁺ and CD8⁺ cells) measured by ELISpot increased after three months for P1 both against S1 (107 ± 16 SFU/ 10^6 PBMCs) and S2 (191 ± 17 SFU/ 10^6 PBMCs) (**Figures 2A, S1**). For P2, IFN- γ responses increased against S2 (407 ± 27 SFU/ 10^6 PBMCs) but remained stable against S1 ($330 \pm$



28 SFU/10⁶ PBMCs). Both participants displayed polyfunctional cytokine responses ($TNF\alpha^+$, $IFN\gamma^+$, $IL-2^+$) in both subsets at higher levels than early in infection (**Figures 2B, C, S2**).

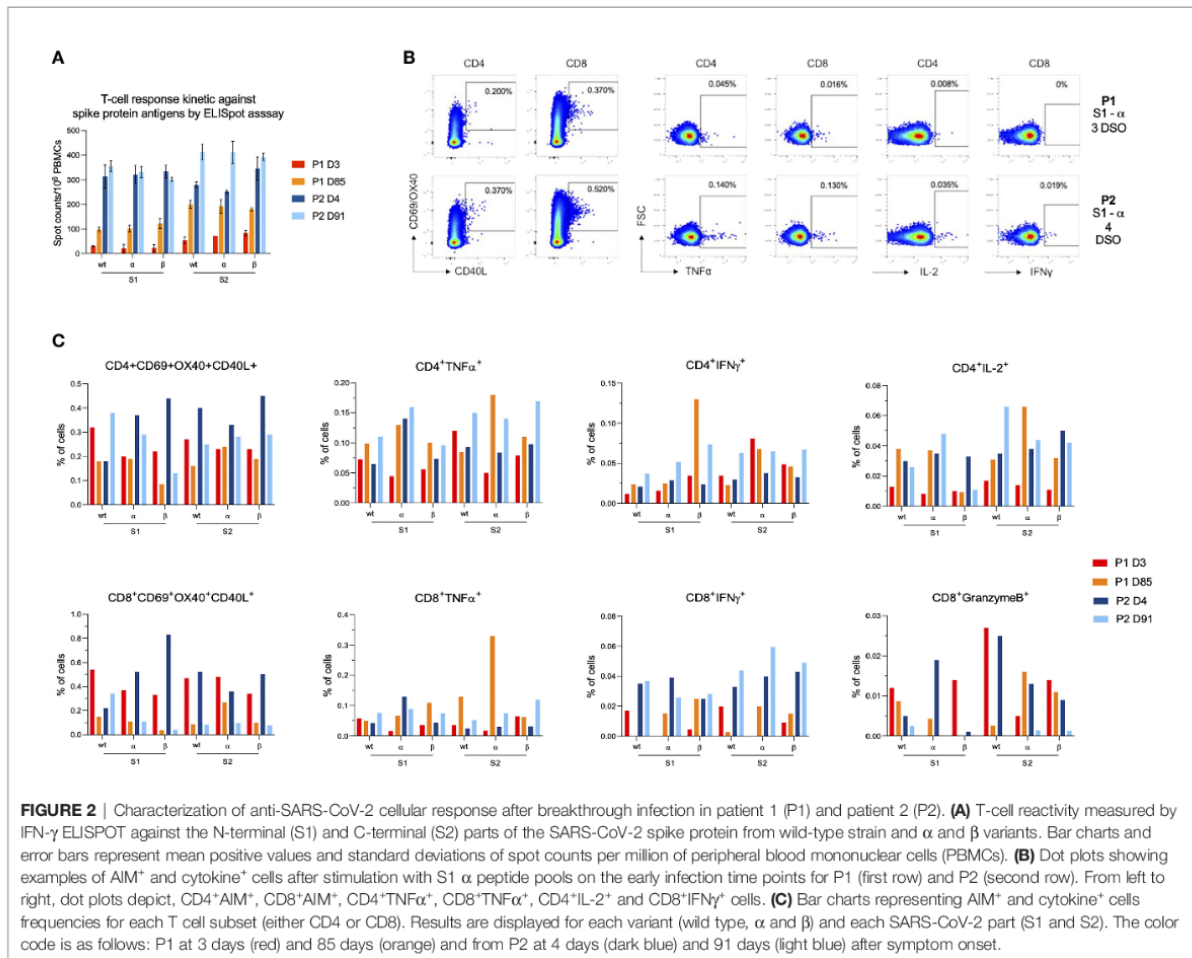
DISCUSSION

In this study, we report two cases of mild breakthrough infection by alpha and beta variants, respectively. Both patients displayed similar viral loads at symptom onset, however, viral shedding and clinical symptoms evolve differently. The analysis of cellular and humoral response in both cases suggests two possible mechanisms of breakthrough infection, a poor immune response to vaccine (P1) and viral evasion to neutralizing antibodies (P2).

Early after symptom onset, analysis of P1 samples revealed the absence of mucosal anti-S antibodies and a low level of circulating anti-S antibodies that failed to neutralize all tested variants. In addition, P1 displayed low levels of $CD8^+$ $IFN\gamma^+$ cells and also $CD4^+$ $IL2^+$ cells, suggesting a low level of circulating effector $CD8^+$ T cells and of $CD4^+$ central memory T cells, respectively.

This poor response may explain the relatively long period of viral shedding and persistence of COVID-19 symptoms up to 3 months DSO. Underlying obesity of this immunocompetent patient may explain the poor immune response after two doses of vaccine although recent studies dispute the role of obesity in the immune response to vaccination (8, 9). Breakthrough infection of P2 appears to be due to escape of the beta variant from neutralizing antibodies irrespective of SARS-CoV-2 specific T cells levels, consistent with previous studies (10, 11). Interestingly, both patients developed neutralization activity against all variants including beta and delta variants that lasts up to 3 months after breakthrough infection.

The limitation of this study relies on unavailability of blood sample before breakthrough infection in both patients. Instead, post-vaccinal SARS-CoV-2 immune responses were assessed in the three to four days following the first symptoms onset and were therefore possibly already boosted by anamnestic responses. However, we revealed a lack of neutralizing antibodies against variants involved in infection in both patients, which was undoubtedly already the case before infection. Moreover, no



anti-N antibodies were detected consequently to infection at this time and only low antibody levels were found in P1, suggesting that these immune responses measured early after infection were a good reflection of the previous vaccine response. Finally, we did not explore *de novo* T cell responses induced by infection (particularly against nucleocapsid and membrane proteins) that may also have shortened the time of viral clearance and tempered disease severity, along with anti-S T cell recall responses (12–14).

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found below: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>, accession ID: OM714898 and OM702711.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by the Ethics Committee of the University Hospital of Strasbourg (N^oCE–2020–51). The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

FG, PG, OS and SFK contributed to conception and design of the study. FG, PG, DP, TB, FP and ES performed the experiments. PR contributed to design the experiments. MS, SF, and JS helped at data collection. FG and PG organized the database. FG and PG performed the statistical analysis. FG wrote the first draft of the manuscript. PG and SFK wrote sections of the manuscript. All authors listed have made a substantial, direct, and intellectual contribution to the work and approved it for publication.

FUNDING

This work was supported by the Strasbourg University Hospital (SeroCoV-HUS; PRI 7782), ANR-18-CE17-0028, ANR-11-LABX-0070_TRANSPLANTEX, Strasbourg University and the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (UMR_S 1109). Work in OS lab is funded by the Institut Pasteur, Urgence COVID-19 Fundraising Campaign of Institut Pasteur, Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), ANRS, the Vaccine Research Institute (ANR-10-LABX-77), Labex IBEID (ANR-10-LABX-62-IBEID), ANR/FRM Flash Covid PROTEO-SARS-CoV-2 and IDISCOVER. DP is supported by the Vaccine Research Institute.

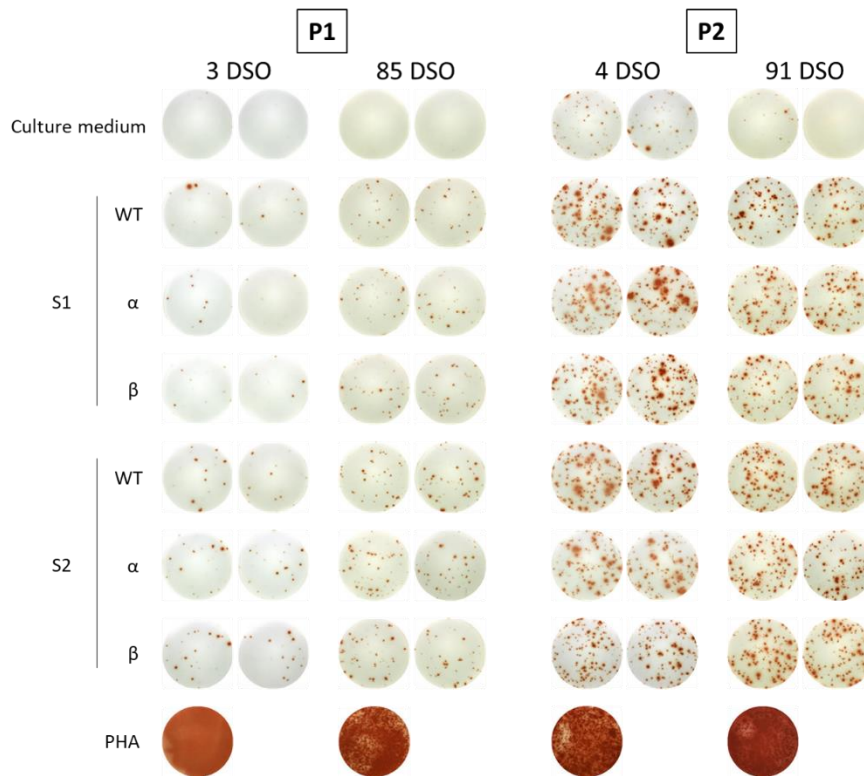
REFERENCES

- Kustin T, Harel N, Finkel U, Perchik S, Harari S, Tahor M, et al. Evidence for Increased Breakthrough Rates of SARS-CoV-2 Variants of Concern in BNT162b2-mRNA-Vaccinated Individuals. *Nat Med* (2021) 27(8):1379–84. doi: 10.1038/s41591-021-01413-7
- McEwen AE, Cohen S, Bryson-Cahn C, Liu C, Pergam SA, Lynch J, et al. Variants of Concern Are Overrepresented Among Postvaccination Breakthrough Infections of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in Washington State. *Clin Infect Dis* (2021) ciab58. doi: 10.1093/cid/ciab581
- Rovida F, Cassaniti I, Paolucci S, Percivalle E, Sarasini A, Piralla A, et al. SARS-CoV-2 Vaccine Breakthrough Infections With the Alpha Variant Are Asymptomatic or Mildly Symptomatic Among Health Care Workers. *Nat Commun* (2021) 12:6032. doi: 10.1038/s41467-021-26154-6
- Brosh-Nissimov T, Orenbuch-Harroch E, Chowers M, Elbaz M, Neshet L, Stein M, et al. BNT162b2 Vaccine Breakthrough: Clinical Characteristics of 152 Fully Vaccinated Hospitalized COVID-19 Patients in Israel. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* (2021) 27(11):16528–7. doi: 10.1016/j.cmi.2021.06.036
- Fourati S, Decusser J-W, Khouider S, N'Debi M, Demontant V, Trawinski E, et al. Novel SARS-CoV-2 Variant Derived From Clade 19b, France. *Emerg Infect Dis J - CDC* (2021) 27(5):15408–3. doi: 10.3201/eid2705.210324
- Grzelak L, Temmam S, Planchais C, Demeret C, Tondeur L, Huon C, et al. A Comparison of Four Serological Assays for Detecting Anti-SARS-CoV-2 Antibodies in Human Serum Samples From Different Populations. *Sci Transl Med* (2020) 12:eabc3103. doi: 10.1126/scitranslmed.abc3103
- Planas D, Bruel T, Grzelak L, Guivel-Benhassine F, Staropoli I, Porrot F, et al. Sensitivity of Infectious SARS-CoV-2 B.1.1.7 and B.1.351 Variants to Neutralizing Antibodies. *Nat Med* (2021) 27(5):917–24. doi: 10.1038/s41591-021-01318-5
- Pellini R, Venuti A, Pimpinelli F, Abril E, Blandino G, Campo F, et al. Early Onset of SARS-COV-2 Antibodies After First Dose of BNT162b2: Correlation With Age, Gender and BMI. *Vaccines* (2021) 9:685. doi: 10.3390/vaccines9070685
- Kipshidze N, Kipshidze N, Fried M. COVID-19 Vaccines: Special Considerations for the Obese Population. *Obes Surg* (2021) 31(8):3854–6. doi: 10.1007/s11695-021-05404-y
- Khoury DS, Cromer D, Reynaldi A, Schlub TE, Wheatley AK, Juno JA, et al. Neutralizing Antibody Levels Are Highly Predictive of Immune Protection From Symptomatic SARS-CoV-2 Infection. *Nat Med* (2021) 27:1205–11. doi: 10.1038/s41591-021-01377-8
- Israelow B, Mao T, Klein J, Song E, Menasche B, Omer SB, et al. Adaptive Immune Determinants of Viral Clearance and Protection in Mouse Models of SARS-CoV-2. *Sci Immunol* (2021) 6(64):eabl4509. doi: 10.1126/sciimmunol.abl4509
- Sette A, Crotty S. Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell* (2021) 184:861–80. doi: 10.1016/j.cell.2021.01.007
- Lipsitch M, Krammer F, Regev-Yochay G, Lustig Y, Balicer RD. SARS-CoV-2 Breakthrough Infections in Vaccinated Individuals: Measurement, Causes and Impact. *Nat Rev Immunol* (2022) 22:57–65. doi: 10.1038/s41577-021-00662-4
- Nguyen THO, Cohen CA, Rowntree LC, Bull MB, Hachim A, Kedzierska K, et al. T Cells Targeting SARS-CoV-2: By Infection, Vaccination, and Against Future Variants. *Front Med* (2021) 8:793102. doi: 10.3389/fmed.2021.793102

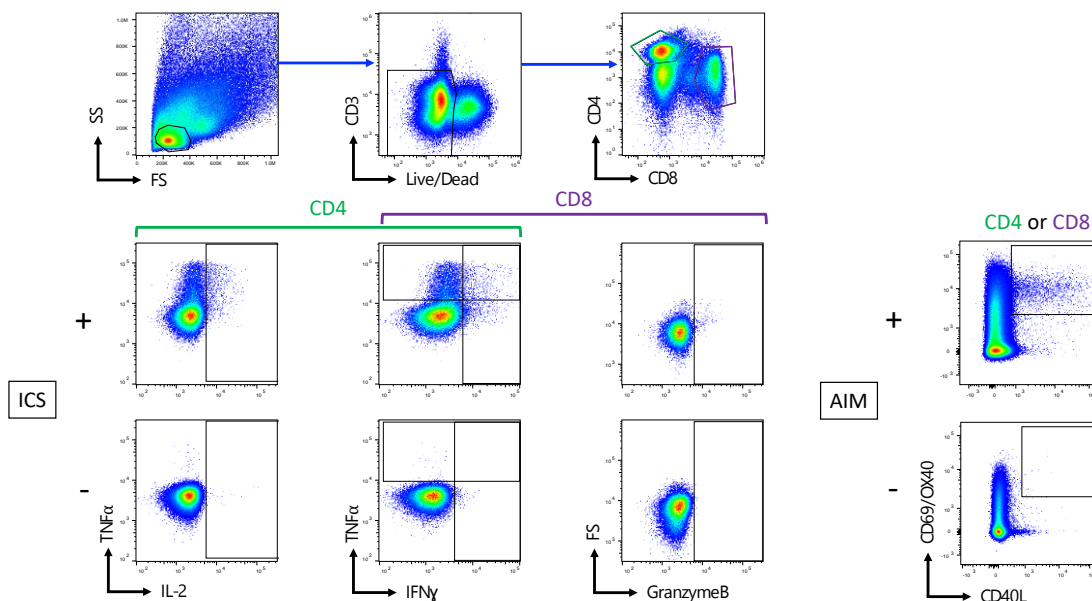
Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Gallais, Gantner, Planas, Solis, Bruel, Pierre, Soulier, Rossolillo, Fourati, Sibilia, Schwartz and Fafi-Kremer. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



Supplementary Figure S1. Images obtained by IFN- γ ELISPOT conducted on peripheral blood cells isolated from patient 1 (P1) and from patient 2 (P2) after breakthrough infection. Cells were collected in P1 at 3 and 85 days after symptoms onset (DSO) (left) and in P2 at 4 and 91 DSO (right). T cell specific responses were evaluated using peptide pools spanning the SARS-CoV-2 spike protein (N-terminal region = S1, C-terminal region = S2) of the reference strain (wild-type, wt) and of α and β variants. All experiments were performed in duplicates, with at least two wells of negative controls (cells with culture medium only) and one well of positive control (phytohemagglutinin) for each sample. P2 was highly reactive to all peptide pools irrespective of the variants at 4 DSO whereas P1 was only poorly reactive. T-cell response was increased in P1 at 85 DSO but remained lower than those measured in P2 at 91 DSO.



Supplementary Figure S2. Gating strategy. Gating strategy used for AIM/ICS analysis, with examples of dot plots showing cytokine+ and AIM+ cells after stimulation (row “+”) and unstimulated cells as negative controls (row “-“).

Supplementary methods

Full-length SARS-CoV-2 genome sequencing

The full-length SARS-CoV-2 genomes were sequenced by means of next-generation sequencing. Briefly, viral RNA was extracted from nasopharyngeal swabs in viral transport medium using NucliSENS® easyMAG kit on EMAG device (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France). Sequencing was performed with the Illumina COVIDSeq Test (Illumina, San Diego, California), that uses 98-target multiplex amplifications along the full SARS-CoV-2 genome. The libraries were sequenced with NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5 (75 Cycles) on a NextSeq 500 device (Illumina). The sequences were demultiplexed and assembled as full-length genomes by means of the DRAGEN COVIDSeq Test Pipeline on a local DRAGEN server (Illumina). Lineages and clades were interpreted using Pangolin and NextClade, before being submitted to the GISAID database (<https://www.gisaid.org>).

Serology S-flow assay

Anti-S IgG and IgA were measured by S-Flow assay based on the recognition of SARS-CoV-2 S protein expressed on the surface of human embryonic kidney (HEK) 293T cells. Briefly, 293T cells (ATCC® CRL-3216™) were transfected with the indicated S-protein expression

plasmids or a control plasmid using Lipofectamine 2000 (Life Technologies). One day after, transfected cells were detached using PBS-EDTA and transferred into U-bottom 96-well plates (50,000 cells per well). Cells were incubated at 4 °C for 30 min with sera (1:300 dilution) or nasal swabs (1:50 dilution) in PBS containing 0.5% BSA and 2 mM EDTA, washed with PBS and stained using anti-IgG AF647 (1:600 dilution; Thermo Fisher). Cells were washed with PBS and fixed for 10 min using 4% paraformaldehyde. Data were acquired on an Attune Nxt instrument (Life Technologies). Stainings were also performed on control (293T-empty) cells. The specific binding was calculated as follow: $100 \times (\% \text{ binding } 293\text{T Spike} - \% \text{ binding } 293\text{T } 227 \text{ Empty}) / (100 - \% \text{ binding } 293\text{T Empty})$. The positivity of a sample was defined as a specific binding above 40% for IgG and 20% for IgA. The calculation of Binding units (BU) enabled to standardize the results by establishing a dose-response curve with a reference anti-Spike human monoclonal antibody.

AIM and ICS assays

Antigen specific and cytokine-expressing cells were characterized by activation-induced marker (AIM) and intra-cellular staining (ICS) assays. PBMCs were thawed, washed and put in culture at a concentration of 10 million cells/mL in RPMI 1640 medium (Gibco Life Technologies, Cat# 11,875-093) supplemented with 0.5% penicillin/streptomycin (Gibco, Cat# 15070063) and 10% human serum (Sigma, Cat# H5522-100mL). After a rest of 1 h at 37 °C, a CD40 blocking antibody (Miltenyi-MACS, Cat# 130-094-133) was added to the culture to prevent the interaction of CD40L with CD40 and its subsequent downregulation. After 15 min incubation at 37°C, cells were stimulated with 0.5 µg/mL PHA or 0.44 µg/ml of overlapping peptide pools spanning S1 and S2 of WT, α and β SARS-CoV-2 strains (PepMix™, JPT Peptide Technologies, Cat# PM-WCPV-S, PM-SARS2-SMUT01-1, PM-SARS2-SMUT02-1, respectively) for 9 hours at 37°C allowing for upregulation of CD69/CD40L/OX40 on antigen-specific cells (AIM+). Cells were further incubated for 12 additional hours at 37°C in the presence of Brefeldin A (BFA, Sigma, Cat# 7651). An unstimulated condition served as a negative control.

After resting or stimulation, cells were collected, resuspended in PBS and stained with the Aqua Live/Dead staining kit (ThermoFisher Scientific, Cat#L34957) for 20min at 4°C. Cells were then stained with antibodies against extracellular molecules in PBS + 4% human serum for 20min at 4°C. After a 15min fixation with PBS + 4% paraformaldehyde (Sigma, Cat# 252549), a permeabilization step was performed with the PermWash buffer for 30min (BD, Cat# 554723) following the manufacturer's instructions. Cells were then stained with antibodies targeting intracellular cytokines for an additional 45min at room temperature in the PermWash Buffer. Cells were then washed and resuspended in PBS for subsequent analysis. After

acquisition (Navios, Beckman-Coulter), analysis was performed using FlowJo software version 10.7.1 (Tree Star, Ashland, OR).

Antibodies used: CD4-APC-H7 (Clone: RPA-T4, Cat#560168, Dilution 1/100), CD3-A700 (Clone: UCHT1, Cat#557943, Dilution 1/200), CD69-BV786 (Clone: FN50, Cat#563834, Dilution 1/50), OX40-BV605 (Clone: ACT35, Cat#743284, Dilution 1/50), IFN γ -PE-Cy7 (Clone: B27, Cat#557643, Dilution 1/100), TNF α -APC (Clone: MAb11, Cat#562084, Dilution 1/100), GranzymeB-PE (Clone: GB11, Cat#561142, Dilution 1/33) and IL-2-PerCP-Cy5.5 (Clone: MQ1-17H2, Cat#560708, Dilution 1/33) and CD40L-BV421 (Clone: TRAP1, Cat#563886, Dilution 1/25) purchased from BD Bioscience, and CD8-FITC (Clone: BW135/80, Cat#130-113-719, Dilution

IV. Discussion

Cette étude a mis en lumière deux mécanismes possibles pouvant favoriser la survenue d'infections post-vaccinales : une faible réponse immunitaire globale à la vaccination (P1) et l'échappement d'un variant aux anticorps neutralisants malgré une réponse de forte intensité (P2). Malheureusement, aucun échantillon de sérum prélevé entre la seconde dose et la survenue de l'infection n'était disponible pour aucune des deux patientes étudiées. Ainsi, la réponse immunitaire évaluée à 3-4 jours du début des symptômes pourrait avoir déjà été stimulée par la réplication virale et donc être un reflet imparfait de l'immunité post-vaccinale. Cependant, le biais potentiellement induit par ce délai est probablement mineur, car une étude rapporte que l'augmentation des concentrations en anticorps débute dans ce contexte entre 4 et 6 jours après le début des symptômes suite à l'activation des lymphocytes B mémoires (541). De plus, les déficits d'immunité observés par l'analyse de ces prélèvements étaient nécessairement également présents voire plus importants avant l'infection, ce qui ne remet donc pas en cause nos conclusions.

La première patiente (P1) présentait une faible réponse humorale et cellulaire à la vaccination. Celle-ci a probablement contribué à la durée prolongée des symptômes consécutifs à l'infection, du fait d'un contrôle moins efficace de la réplication virale. Ce défaut de réponse vaccinale n'a pas de cause apparente chez cette patiente, hormis son obésité qui a été décrite comme associée à des titres d'anticorps plus faibles dans plusieurs travaux (542–544).

La seconde patiente avait quant à elle un déficit de neutralisation portant essentiellement sur le variant beta, tandis que les autres variants étaient mieux couverts. Etant donné que le pouvoir neutralisant est le paramètre biologique le mieux corrélé à la protection vaccinale, ce défaut de neutralisation a vraisemblablement favorisé l'infection symptomatique par une souche du variant beta chez cette jeune patiente, malgré son immunité cellulaire par ailleurs robuste (431). Le variant beta présente des mutations d'échappement au système immunitaire dans la région RBD, en particulier les mutations E484K et K417N, probablement responsables du défaut de neutralisation observé. A l'instar du cas de cette patiente, la littérature décrit une

surreprésentation des variants préoccupants dans les infections post-vaccinales (545), et en particulier du variant beta avant l'émergence des variants delta et omicron. Ainsi, une étude menée en Israël a mis en évidence un excès d'implication du variant beta dans les infections survenant après la seconde dose vaccinale en comparaison des sujets non vaccinés (5,4 vs. 0,7 %), suggérant une efficacité vaccinale réduite envers ce variant (546). De même, une étude épidémiologique au Qatar a estimé l'efficacité vaccinale à 89,5 % contre l'infection par le variant alpha et à 75,0 % contre l'infection par le variant beta, avec néanmoins une forte protection de plus de 97 % contre les formes sévères (547).

Enfin, il peut être souligné que la survenue d'infections non sévères par le SARS-CoV-2 chez des patients vaccinés est un événement attendu, et ne remet en aucun cas en cause l'utilité de la vaccination. L'administration d'un vaccin par voie parentérale n'induit généralement pas ou que très peu de lymphocytes mémoires résidents des tissus (548,549). De même, la vaccination contre le SARS-CoV-2 ne génère pas d'immunité muqueuse comparable à l'immunité post-infectieuse, avec des IgA sécrétoires neutralisant le virus dès son entrée dans le tractus respiratoire (550). Des anticorps peuvent tout de même être détectés à la surface des muqueuses ou dans la salive après vaccination mais à faible niveau, provenant essentiellement de la transsudation des anticorps depuis le compartiment sanguin (541,550). Ce constat explique que les infections par le SARS-CoV-2 restent possibles après vaccination même en l'absence d'immunosuppression. Toutefois, celles-ci restent généralement peu sévères comme dans le cas des deux patientes qui ont fait l'objet de cette étude. Cette protection repose sur les anticorps circulants, sur l'immunité lymphocytaire T et enfin sur l'activation des lymphocytes B et T mémoires qui participent au contrôle de l'infection.

En conclusion, le risque d'infections post-vaccinales dépend essentiellement du titre en anticorps neutralisants à un instant donné, du niveau d'exposition au virus et des variants en circulation (540,551). L'arrivée du variant omicron a entraîné un énorme bond du nombre de cas d'infection post-vaccinale atteignant un pic au mois de janvier 2022, du fait de sa forte contagiosité et de ses mutations d'échappement au système immunitaire. Ces infections sont

aussi possibles après la troisième dose vaccinale, malgré une réduction du risque d'infections et de leur sévérité par cette dernière (552,553). Les infections sont alors le plus souvent bénignes chez les sujets immunocompétents du fait d'une part de la protection vaccinale accrue suite à la troisième dose, et d'autre part de la sévérité moins importante des infections impliquant le variant omicron.

Conclusion et perspectives

L'immunité adaptative développée après une première infection par le SARS-CoV-2 ou suite à la vaccination est le facteur clé dans la protection contre la survenue de nouveaux épisodes de COVID-19 et surtout contre leurs formes sévères. Au cours de ce travail, nous avons étudié le développement, la persistance et les facteurs déterminants de cette réponse immunitaire dans plusieurs contextes cliniques.

Dans une première partie, nous avons caractérisé la réponse immunitaire développée secondairement à l'infection par le SARS-CoV-2 chez les adultes immunocompétents. Après avoir montré qu'une réponse adaptative cellulaire pouvait être développée isolément après exposition au virus sans anticorps détectables associés, nous avons suivi la réponse humorale induite par la primo-infection sur une période de plus d'un an chez près de 400 soignants volontaires. Nous avons pu recruter ces participants majoritairement atteints de forme légère de COVID-19 très tôt après le début de la pandémie du fait de la précocité et de l'intensité de la première vague observée dans notre région du Grand Est. Grâce à une mobilisation intense et multidisciplinaire au sein des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg et à une collaboration étroite rapidement mise en place avec l'Institut Pasteur, cette étude a été l'une des premières à décrire une persistance des anticorps protecteurs dirigés contre le RBD jusqu'à plus d'un an après l'infection, avec une différence de cinétique observée en fonction du sexe. Une forte réduction de 96,7 % du risque de nouvelle infection a été objectivée au cours de la période étudiée, toutefois antérieure à l'émergence des variants delta et omicron, ces derniers étant plus contagieux et associés à un risque de réinfection plus important. La stabilisation de la décroissance des anticorps que nous avons constatée en fin de suivi suggère qu'ils resteraient détectables plusieurs années après l'infection, même en l'absence de réinfection ou de vaccination. Des études de suivi sérologique menées sur le plus long terme permettraient en théorie de vérifier cette hypothèse, mais seraient compliquées à conduire en pratique. En effet, la vaccination actuellement recommandée pour tous les adultes même en cas d'antécédent

de COVID-19 et la circulation intense du variant omicron rendent difficilement réalisable d'évaluer cette immunité humorale plusieurs années après une primo-infection sans nouvelle stimulation antigénique. Par ailleurs, il serait intéressant de mener des études similaires chez des cohortes différentes de patients, en particulier chez des personnes précédemment atteintes de forme sévère ou au contraire asymptomatiques, ou encore chez les enfants ou les personnes d'âge très avancé, afin d'évaluer si la persistance des anticorps est comparable au sein de ces populations. Enfin, l'analyse des titres en anticorps neutralisants un an après l'infection a souligné le bénéfice de la vaccination chez les personnes précédemment infectées, avec un gain notable observé en particulier contre les variants portant des mutations d'échappement au système immunitaire.

Dans un second volet, nous avons exploré la réponse adaptative développée après vaccination contre le SARS-CoV-2 chez des patients immunodéprimés, traités par rituximab ou sous traitement immunosuppresseur suite à une transplantation pulmonaire. Malgré l'administration de trois doses de vaccin à base d'ARNm, un défaut de réponse humorale a été mis en évidence chez les patients avec une déplétion profonde en lymphocytes B circulants consécutive à l'administration de rituximab moins de 6 mois avant la vaccination. Les patients vaccinés plus à distance de leur traitement ont quant à eux tous séroconverti, et ce déjà après la seconde dose. Ces résultats incitent à retarder si possible la vaccination après l'administration de rituximab pour permettre la reconstitution des lymphocytes B, ou à adopter à défaut une autre stratégie prophylactique à base d'anticorps monoclonaux. Néanmoins, tous les patients ont développé une immunité cellulaire après vaccination, dont l'intensité était totalement dissociée de la concentration en anticorps, contrairement à la corrélation que nous avons observée chez les sujets immunocompétents entre ces deux pans de l'immunité adaptative. Il serait à présent intéressant d'évaluer en vie réelle le niveau de protection conféré par la vaccination chez les patients sous rituximab ayant développé une réponse cellulaire isolée ou combinée à une réponse humorale, en vue d'une éventuelle adaptation des recommandations relatives à la place de la vaccination chez ces patients.

La réponse vaccinale était plus faible chez les patients transplantés pulmonaires, avec seulement 37% de séroconversions constatées après l'administration de trois doses de vaccin à base d'ARNm. Les titres d'anticorps atteints étaient relativement faibles pour la majorité des répondeurs sans antécédent de COVID-19, aucun n'ayant de pouvoir neutralisant contre le variant omicron. Plusieurs facteurs prédictifs de réponse vaccinale ont été identifiés, comprenant le type de vaccin, le traitement par mycophénolate et enfin la charge virale de TTV, ce dernier paramètre ayant la plus forte valeur prédictive. Une charge virale supérieure à $6,2 \log_{10}$ cp/mL était en effet associée à un défaut de réponse humorale avec une forte valeur prédictive négative, que la mesure soit réalisée avant toute vaccination ou avant l'administration de la troisième dose chez les patients séronégatifs après la seconde dose. L'utilisation de ce marqueur pourrait donc guider les cliniciens dans leur choix de la stratégie prophylactique à mettre en œuvre contre la COVID-19 chez ces patients fragiles, en anticipant ou non l'instauration d'une protection efficace via l'administration d'anticorps monoclonaux. Néanmoins, il reste à déterminer quelle proportion de patients transplantés pulmonaires séroconvertissent suite à la dose de rappel actuellement recommandée et dans quelle mesure la charge virale de TTV conserve son intérêt dans ce contexte. En tout état de cause, la mise en évidence de l'intérêt de la charge virale de TTV dans la prédiction de la réponse vaccinale participe à l'originalité de notre travail, confirme le potentiel de ce biomarqueur comme reflet de l'état immunitaire global et ouvre la voie à un large champ d'études. À présent, la suite logique serait d'évaluer ce marqueur chez d'autres populations de transplantés d'organe solide, chez des greffés de cellules souches hématopoïétiques ou encore chez d'autres types de patients immunodéprimés, tels que les patients dialysés, vivant avec le VIH, traités par immunosuppresseurs pour un cancer ou encore pour une maladie auto-immune. Une autre question posée pourrait être dans quelle mesure la charge virale de TTV serait prédictive de l'intensité de la réponse humorale à la vaccination chez les sujets immunocompétents. Enfin, l'intérêt de ce marqueur pourrait être évalué dans la prédiction de la réponse à des vaccins contre d'autres pathogènes.

La dernière partie de ce travail a consisté à explorer la réponse immunitaire humorale et cellulaire contre plusieurs variants du SARS-CoV-2 chez deux patientes immunocompétentes infectées moins de deux mois après leur primo-vaccination complète par vaccin à ARNm. Nous avons mis en évidence deux mécanismes possibles permettant ces infections précoces, la première patiente présentant une faible réponse immunitaire globale et la seconde une forte réponse mais avec un défaut de neutralisation du variant beta responsable de son infection. Cette étude a été conduite au printemps 2021, lorsque les infections post-vaccinales étaient encore relativement rares avant l'émergence des variants delta et omicron. Ces infections sont aujourd'hui bien plus courantes mais restent généralement peu sévères, grâce à l'effet protecteur des anticorps neutralisants et de l'immunité mémoire B et T développée suite à la vaccination.

En conclusion, la répétition de la stimulation antigénique via l'administration d'une dose de rappel vaccinal, la survenue d'une infection post-vaccinale ou encore la vaccination des individus précédemment vaccinés induit d'une part une réponse humorale neutralisante de spectre large avec une affinité accrue contre les variants du SARS-CoV-2, et renforce d'autre part la réponse cellulaire qui participe à la protection contre les formes sévères de COVID-19. Malgré une hétérogénéité interindividuelle de la réponse immunitaire à l'infection et à la vaccination en fonction de différents facteurs tels que l'âge, le sexe, la sévérité de la maladie ou encore l'immunocompétence, la couverture vaccinale large de la population française associée à la récente circulation virale intense du variant omicron tendent à accroître le niveau global d'immunité de la population. Celle-ci nous fait entrevoir la fin de la pandémie avec un virus qui entraînerait majoritairement des infections peu sévères et deviendrait endémique à l'image des autres coronavirus saisonniers. Néanmoins, la situation reste à surveiller de près notamment du fait du défaut de vaccination observé dans d'autres pays et de l'émergence possible de nouveaux variants.

Références

1. Wang C, Horby PW, Hayden FG, Gao GF. A novel coronavirus outbreak of global health concern. *Lancet Lond Engl.* 15 févr 2020;395(10223):470-3.
2. Naming the coronavirus disease (COVID-19) and the virus that causes it [Internet]. [cité 23 mars 2022]. Disponible sur: [https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-\(covid-2019\)-and-the-virus-that-causes-it](https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-(covid-2019)-and-the-virus-that-causes-it)
3. Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature.* mars 2020;579(7798):270-3.
4. Zhou Z, Qiu Y, Ge X. The taxonomy, host range and pathogenicity of coronaviruses and other viruses in the Nidovirales order. *Anim Dis.* 23 avr 2021;1(1):5.
5. Ruiz-Aravena M, McKee C, Gamble A, Lunn T, Morris A, Snedden CE, et al. Ecology, evolution and spillover of coronaviruses from bats. *Nat Rev Microbiol.* 19 nov 2021;20(5):299-314.
6. Redondo N, Zaldívar-López S, Garrido JJ, Montoya M. SARS-CoV-2 Accessory Proteins in Viral Pathogenesis: Knowns and Unknowns. *Front Immunol.* 7 juill 2021;12:708264.
7. Cabrera-Garcia D, Bekdash R, Abbott GW, Yazawa M, Harrison NL. The envelope protein of SARS-CoV-2 increases intra-Golgi pH and forms a cation channel that is regulated by pH. *J Physiol.* juin 2021;599(11):2851-68.
8. Boson B, Legros V, Zhou B, Siret E, Mathieu C, Cosset FL, et al. The SARS-CoV-2 envelope and membrane proteins modulate maturation and retention of the spike protein, allowing assembly of virus-like particles. *J Biol Chem.* 1 janv 2021;296:100111.
9. Neuman BW, Kiss G, Kunding AH, Bhella D, Baksh MF, Connelly S, et al. A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology. *J Struct Biol.* avr 2011;174(1):11-22.
10. Bessa LM, Guseva S, Camacho-Zarco AR, Salvi N, Maurin D, Perez LM, et al. The intrinsically disordered SARS-CoV-2 nucleoprotein in dynamic complex with its viral partner nsp3a. *Sci Adv.* 21 janv 2022;8(3):eabm4034.
11. Tilocca B, Soggiu A, Sanguinetti M, Musella V, Britti D, Bonizzi L, et al. Comparative computational analysis of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein epitopes in taxonomically related coronaviruses. *Microbes Infect.* mai 2020;22(4):188-94.
12. Cubuk J, Alston JJ, Incicco JJ, Singh S, Stuchell-Brereton MD, Ward MD, et al. The SARS-CoV-2 nucleocapsid protein is dynamic, disordered, and phase separates with RNA. *Nat Commun.* 29 mars 2021;12(1):1936.
13. Velazquez-Salinas L, Zarate S, Eberl S, Gladue DP, Novella I, Borca MV. Positive Selection of ORF1ab, ORF3a, and ORF8 Genes Drives the Early Evolutionary Trends of SARS-CoV-2 During the 2020 COVID-19 Pandemic. *Front Microbiol.* 23 oct 2020;11:550674.
14. Xia H, Cao Z, Xie X, Zhang X, Chen JYC, Wang H, et al. Evasion of Type I Interferon by SARS-CoV-2. *Cell Rep.* 6 oct 2020;33(1):108234.
15. Shang J, Han N, Chen Z, Peng Y, Li L, Zhou H, et al. Compositional diversity and evolutionary pattern of coronavirus accessory proteins. *Brief Bioinform.* 22 mars 2021;22(2):1267-78.
16. Watanabe Y, Allen JD, Wrapp D, McLellan JS, Crispin M. Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike. *Science.* 17 juill 2020;369(6501):330-3.
17. Huang Y, Yang C, Xu X feng, Xu W, Liu S wen. Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antiviral drug development for COVID-19. *Acta Pharmacol Sin.* sept 2020;41(9):1141-9.
18. Zhang Q, Xiang R, Huo S, Zhou Y, Jiang S, Wang Q, et al. Molecular mechanism of interaction between SARS-CoV-2 and host cells and interventional therapy. *Signal Transduct Target Ther.* 11 juin 2021;6(1):1-19.
19. Wang Y, Liu M, Gao J. Enhanced receptor binding of SARS-CoV-2 through networks of hydrogen-bonding and hydrophobic interactions. *Proc Natl Acad Sci.* 23 juin 2020;117(25):13967-74.
20. Lan J, Ge J, Yu J, Shan S, Zhou H, Fan S, et al. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature.* mai 2020;581(7807):215-20.

21. Ali A, Vijayan R. Dynamics of the ACE2–SARS-CoV-2/SARS-CoV spike protein interface reveal unique mechanisms. *Sci Rep.* 26 août 2020;10(1):14214.
22. Gong Y, Qin S, Dai L, Tian Z. The glycosylation in SARS-CoV-2 and its receptor ACE2. *Signal Transduct Target Ther.* 15 nov 2021;6(1):1-24.
23. Mehdipour AR, Hummer G. Dual nature of human ACE2 glycosylation in binding to SARS-CoV-2 spike. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 11 mai 2021;118(19):e2100425118.
24. Huang Y, Harris BS, Minami SA, Jung S, Shah PS, Nandi S, et al. SARS-CoV-2 spike binding to ACE2 is stronger and longer ranged due to glycan interaction. *Biophys J.* 4 janv 2022;121(1):79-90.
25. Nguyen K, Chakraborty S, Mansbach RA, Korber B, Gnanakaran S. Exploring the Role of Glycans in the Interaction of SARS-CoV-2 RBD and Human Receptor ACE2. *Viruses.* 17 mai 2021;13(5):927.
26. Du L, Yang Y, Zhang X. Neutralizing antibodies for the prevention and treatment of COVID-19. *Cell Mol Immunol.* oct 2021;18(10):2293-306.
27. Mittal A, Manjunath K, Ranjan RK, Kaushik S, Kumar S, Verma V. COVID-19 pandemic: Insights into structure, function, and hACE2 receptor recognition by SARS-CoV-2. *PLOS Pathog.* 21 août 2020;16(8):e1008762.
28. Takeda M. Proteolytic activation of SARS-CoV-2 spike protein. *Microbiol Immunol.* janv 2022;66(1):15-23.
29. Wu Y, Zhao S. Furin cleavage sites naturally occur in coronaviruses. *Stem Cell Res.* 1 janv 2021;50:102115.
30. Benton DJ, Wrobel AG, Xu P, Roustan C, Martin SR, Rosenthal PB, et al. Receptor binding and priming of the spike protein of SARS-CoV-2 for membrane fusion. *Nature.* déc 2020;588(7837):327-30.
31. Berger I, Schaffitzel C. The SARS-CoV-2 spike protein: balancing stability and infectivity. *Cell Res.* déc 2020;30(12):1059-60.
32. Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Veesler D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell.* 16 avr 2020;181(2):281-292.e6.
33. Peacock TP, Goldhill DH, Zhou J, Baillon L, Frise R, Swann OC, et al. The furin cleavage site in the SARS-CoV-2 spike protein is required for transmission in ferrets. *Nat Microbiol.* juill 2021;6(7):899-909.
34. Rahbar Saadat Y, Hosseiniyan Khatibi SM, Zununi Vahed S, Ardalan M. Host Serine Proteases: A Potential Targeted Therapy for COVID-19 and Influenza. *Front Mol Biosci.* 30 août 2021;8:725528.
35. Chitsike L, Duerksen-Hughes P. Keep out! SARS-CoV-2 entry inhibitors: their role and utility as COVID-19 therapeutics. *Virology.* 23 juill 2021;18(1):154.
36. Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh CL, Abiona O, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science.* 13 mars 2020;367(6483):1260-3.
37. Jackson CB, Farzan M, Chen B, Choe H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* janv 2022;23(1):3-20.
38. Mancia G, Rea F, Ludergnani M, Apolone G, Corrao G. Renin–Angiotensin–Aldosterone System Blockers and the Risk of Covid-19. *N Engl J Med.* 18 juin 2020;382(25):2431-40.
39. Reynolds HR, Adhikari S, Pulgarin C, Troxel AB, Iturrate E, Johnson SB, et al. Renin–Angiotensin–Aldosterone System Inhibitors and Risk of Covid-19. *N Engl J Med.* 18 juin 2020;382(25):2441-8.
40. Sungnak W, Huang N, Bécavin C, Berg M, Queen R, Litvinukova M, et al. SARS-CoV-2 Entry Factors are Highly Expressed in Nasal Epithelial Cells Together with Innate Immune Genes. *Nat Med.* mai 2020;26(5):681-7.
41. Ziegler CGK, Allon SJ, Nyquist SK, Mbanjo IM, Miao VN, Tzouanas CN, et al. SARS-CoV-2 Receptor ACE2 Is an Interferon-Stimulated Gene in Human Airway Epithelial Cells and Is Detected in Specific Cell Subsets across Tissues. *Cell.* 28 mai 2020;181(5):1016-1035.e19.
42. Valyaeva AA, Zharikova AA, Kasianov AS, Vassetzky YS, Sheval EV. Expression of SARS-CoV-2 entry factors in lung epithelial stem cells and its potential implications for COVID-19. *Sci Rep.* 20 oct 2020;10(1):17772.
43. Varga Z, Flammer AJ, Steiger P, Haberecker M, Andermatt R, Zinkernagel AS, et al. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. *Lancet Lond Engl.* 2 mai 2020;395(10234):1417-8.
44. Hou YJ, Okuda K, Edwards CE, Martinez DR, Asakura T, Dinnon KH, et al. SARS-CoV-2 Reverse Genetics Reveals a Variable Infection Gradient in the Respiratory Tract. *Cell.* 23 juill 2020;182(2):429-446.e14.
45. Ryu G, Shin HW. SARS-CoV-2 Infection of Airway Epithelial Cells. *Immune Netw.* 2 mars 2021;21(1):e3.

46. Alfi O, Yakirevitch A, Wald O, Wandel O, Izhar U, Oiknine-Djian E, et al. Human Nasal and Lung Tissues Infected Ex Vivo with SARS-CoV-2 Provide Insights into Differential Tissue-Specific and Virus-Specific Innate Immune Responses in the Upper and Lower Respiratory Tract. *J Virol.* 24 juin 2021;95(14):e0013021.
47. Baggen J, Vanstreels E, Jansen S, Daelemans D. Cellular host factors for SARS-CoV-2 infection. *Nat Microbiol.* oct 2021;6(10):1219-32.
48. Onabajo OO, Banday AR, Stanifer ML, Yan W, Obajemu A, Santer DM, et al. Interferons and viruses induce a novel truncated ACE2 isoform and not the full-length SARS-CoV-2 receptor. *Nat Genet.* déc 2020;52(12):1283-93.
49. Baker SA, Kwok S, Berry GJ, Montine TJ. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) expression increases with age in patients requiring mechanical ventilation. *PloS One.* 16 févr 2021;16(2):e0247060.
50. Nowak JK, Lindstrøm JC, Kalla R, Ricanek P, Halfvarson J, Satsangi J. Age, Inflammation, and Disease Location Are Critical Determinants of Intestinal Expression of SARS-CoV-2 Receptor ACE2 and TMPRSS2 in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology.* sept 2020;159(3):1151-1154.e2.
51. Chen J, Jiang Q, Xia X, Liu K, Yu Z, Tao W, et al. Individual variation of the SARS-CoV-2 receptor ACE2 gene expression and regulation. *Aging Cell.* juill 2020;19(7):e13168.
52. Muus C, Luecken MD, Eraslan G, Sikkema L, Waghray A, Heimberg G, et al. Single-cell meta-analysis of SARS-CoV-2 entry genes across tissues and demographics. *Nat Med.* mars 2021;27(3):546-59.
53. Lee IT, Nakayama T, Wu CT, Goltsev Y, Jiang S, Gall PA, et al. ACE2 localizes to the respiratory cilia and is not increased by ACE inhibitors or ARBs. *Nat Commun.* 28 oct 2020;11(1):5453.
54. Smith JC, Sausville EL, Girish V, Yuan ML, Vasudevan A, John KM, et al. Cigarette Smoke Exposure and Inflammatory Signaling Increase the Expression of the SARS-CoV-2 Receptor ACE2 in the Respiratory Tract. *Dev Cell.* 8 juin 2020;53(5):514-529.e3.
55. Jacobs M, Van Eeckhoutte HP, Wijnant SRA, Janssens W, Joos GF, Brusselle GG, et al. Increased expression of ACE2, the SARS-CoV-2 entry receptor, in alveolar and bronchial epithelium of smokers and COPD subjects. *Eur Respir J.* août 2020;56(2):2002378.
56. Leung JM, Yang CX, Tam A, Shaipanich T, Hackett TL, Singhera GK, et al. ACE-2 expression in the small airway epithelia of smokers and COPD patients: implications for COVID-19. *Eur Respir J.* mai 2020;55(5):2000688.
57. Clausen TM, Sandoval DR, Spliid CB, Pihl J, Perrett HR, Painter CD, et al. SARS-CoV-2 Infection Depends on Cellular Heparan Sulfate and ACE2. *Cell.* 12 nov 2020;183(4):1043-1057.e15.
58. Wei C, Wan L, Yan Q, Wang X, Zhang J, Yang X, et al. HDL-scavenger receptor B type 1 facilitates SARS-CoV-2 entry. *Nat Metab.* déc 2020;2(12):1391-400.
59. Daly JL, Simonetti B, Klein K, Chen KE, Williamson MK, Antón-Plágaro C, et al. Neuropilin-1 is a host factor for SARS-CoV-2 infection. *Science.* 13 nov 2020;370(6518):861-5.
60. Cantuti-Castelvetri L, Ojha R, Pedro LD, Djannatian M, Franz J, Kuivanen S, et al. Neuropilin-1 facilitates SARS-CoV-2 cell entry and infectivity. *Science.* 13 nov 2020;370(6518):856-60.
61. Wang S, Qiu Z, Hou Y, Deng X, Xu W, Zheng T, et al. AXL is a candidate receptor for SARS-CoV-2 that promotes infection of pulmonary and bronchial epithelial cells. *Cell Res.* févr 2021;31(2):126-40.
62. Lempp FA, Soriaga LB, Montiel-Ruiz M, Benigni F, Noack J, Park YJ, et al. Lectins enhance SARS-CoV-2 infection and influence neutralizing antibodies. *Nature.* oct 2021;598(7880):342-7.
63. Ibrahim IM, Abdelmalek DH, Elshahat ME, Elfiky AA. COVID-19 spike-host cell receptor GRP78 binding site prediction. *J Infect.* mai 2020;80(5):554-62.
64. V'kovski P, Kratzel A, Steiner S, Stalder H, Thiel V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol.* mars 2021;19(3):155-70.
65. Hidalgo P, Valdés M, González RA, Hidalgo P, Valdés M, González RA. Molecular biology of coronaviruses: an overview of virus-host interactions and pathogenesis. *Bol Méd Hosp Infant México.* févr 2021;78(1):41-58.
66. Perlman S, Netland J. Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol.* juin 2009;7(6):439-50.
67. Huang C, Lokugamage KG, Rozovics JM, Narayanan K, Semler BL, Makino S. SARS coronavirus nsp1 protein induces template-dependent endonucleolytic cleavage of mRNAs: viral mRNAs are resistant to nsp1-induced RNA cleavage. *PLoS Pathog.* déc 2011;7(12):e1002433.

68. Heinz FX, Stiasny K. Distinguishing features of current COVID-19 vaccines: knowns and unknowns of antigen presentation and modes of action. *Npj Vaccines*. 16 août 2021;6(1):1-13.
69. Peck KM, Luring AS. Complexities of Viral Mutation Rates. *J Virol*. 15 juill 2018;92(14):e01031-17.
70. Sanjuán R, Nebot MR, Chirico N, Mansky LM, Belshaw R. Viral mutation rates. *J Virol*. oct 2010;84(19):9733-48.
71. Domingo E, García-Crespo C, Lobo-Vega R, Perales C. Mutation Rates, Mutation Frequencies, and Proofreading-Repair Activities in RNA Virus Genetics. *Viruses*. 21 sept 2021;13(9):1882.
72. Sender R, Bar-On YM, Gleizer S, Bernshtein B, Flamholz A, Phillips R, et al. The total number and mass of SARS-CoV-2 virions. *Proc Natl Acad Sci*. 22 juin 2021;118(25):e2024815118.
73. Di Giorgio S, Martignano F, Torcia MG, Mattiuz G, Conticello SG. Evidence for host-dependent RNA editing in the transcriptome of SARS-CoV-2. *Sci Adv*. 17 juin 2020;6(25):eabb5813.
74. Ratcliff J, Simmonds P. Potential APOBEC-mediated RNA editing of the genomes of SARS-CoV-2 and other coronaviruses and its impact on their longer term evolution. *Virology*. 1 avr 2021;556:62-72.
75. Jackson B, Boni MF, Bull MJ, Collieran A, Colquhoun RM, Darby AC, et al. Generation and transmission of interlineage recombinants in the SARS-CoV-2 pandemic. *Cell*. 30 sept 2021;184(20):5179-5188.e8.
76. Yi H. 2019 Novel Coronavirus Is Undergoing Active Recombination. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 28 juill 2020;71(15):884-7.
77. Varabyou A, Pockrandt C, Salzberg SL, Perteua M. Rapid detection of inter-clade recombination in SARS-CoV-2 with Bolotie. *Genetics*. 1 juill 2021;218(3):iyab074.
78. VanInsberghe D, Neish AS, Lowen AC, Koelle K. Recombinant SARS-CoV-2 genomes circulated at low levels over the first year of the pandemic. *Virus Evol*. 15 janv 2022;7(2):veab059.
79. Ignatieva A, Hein J, Jenkins PA. Ongoing Recombination in SARS-CoV-2 Revealed through Genealogical Reconstruction. *Mol Biol Evol*. 3 févr 2022;39(2):msac028.
80. Latinne A, Hu B, Olival KJ, Zhu G, Zhang L, Li H, et al. Origin and cross-species transmission of bat coronaviruses in China. *Nat Commun*. 25 août 2020;11(1):4235.
81. Su S, Wong G, Shi W, Liu J, Lai ACK, Zhou J, et al. Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends Microbiol*. 1 juin 2016;24(6):490-502.
82. Duchene S, Featherstone L, Haritopoulou-Sinanidou M, Rambaut A, Lemey P, Baele G. Temporal signal and the phylodynamic threshold of SARS-CoV-2. *Virus Evol*. juill 2020;6(2):veaa061.
83. Jenkins GM, Rambaut A, Pybus OG, Holmes EC. Rates of molecular evolution in RNA viruses: a quantitative phylogenetic analysis. *J Mol Evol*. févr 2002;54(2):156-65.
84. Choi B, Choudhary MC, Regan J, Sparks JA, Padera RF, Qiu X, et al. Persistence and Evolution of SARS-CoV-2 in an Immunocompromised Host. *N Engl J Med*. 3 déc 2020;383(23):2291-3.
85. Avanzato VA, Matson MJ, Seifert SN, Pryce R, Williamson BN, Anzick SL, et al. Case Study: Prolonged Infectious SARS-CoV-2 Shedding from an Asymptomatic Immunocompromised Individual with Cancer. *Cell*. 23 déc 2020;183(7):1901-1912.e9.
86. Kemp SA, Collier DA, Datir RP, Ferreira IATM, Gayed S, Jahun A, et al. SARS-CoV-2 evolution during treatment of chronic infection. *Nature*. avr 2021;592(7853):277-82.
87. Truong TT, Ryutov A, Pandey U, Yee R, Goldberg L, Bhojwani D, et al. Increased viral variants in children and young adults with impaired humoral immunity and persistent SARS-CoV-2 infection: A consecutive case series. *EBioMedicine*. mai 2021;67:103355.
88. Mallapaty S. Where did Omicron come from? Three key theories. *Nature*. 28 janv 2022;602(7895):26-8.
89. Corey L, Beyrer C, Cohen MS, Michael NL, Bedford T, Rolland M. SARS-CoV-2 Variants in Patients with Immunosuppression. *N Engl J Med*. 5 août 2021;385(6):562-6.
90. Wu F, Zhao S, Yu B, Chen YM, Wang W, Song ZG, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*. mars 2020;579(7798):265-9.
91. Callaway E. The coronavirus is mutating — does it matter? *Nature*. 8 sept 2020;585(7824):174-7.
92. Yurkovetskiy L, Wang X, Pascal KE, Tomkins-Tinch C, Nyalile TP, Wang Y, et al. Structural and Functional Analysis of the D614G SARS-CoV-2 Spike Protein Variant. *Cell*. 29 oct 2020;183(3):739-751.e8.
93. Liu Y, Liu J, Plante KS, Plante JA, Xie X, Zhang X, et al. The N501Y spike substitution enhances SARS-CoV-2 infection and transmission. *Nature*. févr 2022;602(7896):294-9.

94. Motozono C, Toyoda M, Zahradnik J, Saito A, Nasser H, Tan TS, et al. SARS-CoV-2 spike L452R variant evades cellular immunity and increases infectivity. *Cell Host Microbe*. 14 juill 2021;29(7):1124-1136.e11.
95. Bayarri-Olmos R, Jarlhelt I, Johnsen LB, Hansen CB, Helgstrand C, Rose Bjelke J, et al. Functional Effects of Receptor-Binding Domain Mutations of SARS-CoV-2 B.1.351 and P.1 Variants. *Front Immunol*. 7 oct 2021;12:757197.
96. Di Giacomo S, Mercatelli D, Rakhimov A, Giorgi FM. Preliminary report on severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Spike mutation T478K. *J Med Virol*. sept 2021;93(9):5638-43.
97. Tian D, Sun Y, Zhou J, Ye Q. The global epidemic of SARS-CoV-2 variants and their mutational immune escape. *J Med Virol*. 2022;94(3):847-57.
98. Lubinski B, Fernandes MHV, Frazier L, Tang T, Daniel S, Diel DG, et al. Functional evaluation of the P681H mutation on the proteolytic activation of the SARS-CoV-2 variant B.1.1.7 (Alpha) spike. *iScience*. 10 déc 2021;25(1):103589.
99. Meng B, Kemp SA, Papa G, Datir R, Ferreira IATM, Marelli S, et al. Recurrent emergence of SARS-CoV-2 spike deletion H69/V70 and its role in the Alpha variant B.1.1.7. *Cell Rep*. 29 juin 2021;35(13):109292.
100. Jangra S, Ye C, Rathnasinghe R, Stadlbauer D, Alshammary H, Amoako AA, et al. SARS-CoV-2 spike E484K mutation reduces antibody neutralisation. *Lancet Microbe*. 1 juill 2021;2(7):e283-4.
101. Garcia-Beltran WF, Lam EC, St. Denis K, Nitido AD, Garcia ZH, Hauser BM, et al. Multiple SARS-CoV-2 variants escape neutralization by vaccine-induced humoral immunity. *Cell*. 29 avr 2021;184(9):2372-2383.e9.
102. McCarthy KR, Rennick LJ, Nambulli S, Robinson-McCarthy LR, Bain WG, Haidar G, et al. Recurrent deletions in the SARS-CoV-2 spike glycoprotein drive antibody escape. *Science*. 12 mars 2021;371(6534):1139-42.
103. Yuan M, Huang D, Lee CCD, Wu NC, Jackson AM, Zhu X, et al. Structural and functional ramifications of antigenic drift in recent SARS-CoV-2 variants. *Science*. 13 août 2021;373(6556):818-23.
104. Yang TJ, Yu PY, Chang YC, Liang KH, Tso HC, Ho MR, et al. Effect of SARS-CoV-2 B.1.1.7 mutations on spike protein structure and function. *Nat Struct Mol Biol*. sept 2021;28(9):731-9.
105. Davies NG, Jarvis CI, CMMID COVID-19 Working Group, Edmunds WJ, Jewell NP, Diaz-Ordaz K, et al. Increased mortality in community-tested cases of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7. *Nature*. mai 2021;593(7858):270-4.
106. Lyngse FP, Mølbak K, Skov RL, Christiansen LE, Mortensen LH, Albertsen M, et al. Increased transmissibility of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 by age and viral load. *Nat Commun*. 13 déc 2021;12(1):7251.
107. Liu H, Wei P, Kappler JW, Marrack P, Zhang G. SARS-CoV-2 Variants of Concern and Variants of Interest Receptor Binding Domain Mutations and Virus Infectivity. *Front Immunol*. 27 janv 2022;13:825256.
108. Funk T, Pharris A, Spiteri G, Bundle N, Melidou A, Carr M, et al. Characteristics of SARS-CoV-2 variants of concern B.1.1.7, B.1.351 or P.1: data from seven EU/EEA countries, weeks 38/2020 to 10/2021. *Euro Surveill*. avr 2021;26(16):2100348.
109. Challen R, Brooks-Pollock E, Read JM, Dyson L, Tsaneva-Atanasova K, Danon L. Risk of mortality in patients infected with SARS-CoV-2 variant of concern 202012/1: matched cohort study. *BMJ*. 9 mars 2021;372:n579.
110. Planas D, Bruel T, Grzelak L, Guivel-Benhassine F, Staropoli I, Porrot F, et al. Sensitivity of infectious SARS-CoV-2 B.1.1.7 and B.1.351 variants to neutralizing antibodies. *Nat Med*. mai 2021;27(5):917-24.
111. Muik A, Wallisch AK, Sängler B, Swanson KA, Mühl J, Chen W, et al. Neutralization of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 pseudovirus by BNT162b2 vaccine-elicited human sera. *Science*. 12 mars 2021;371(6534):1152-3.
112. Tegally H, Wilkinson E, Giovanetti M, Iranzadeh A, Fonseca V, Giandhari J, et al. Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa. *Nature*. avr 2021;592(7854):438-43.
113. Wibmer CK, Ayres F, Hermanus T, Madzivhandila M, Kgagudi P, Oosthuysen B, et al. SARS-CoV-2 501Y.V2 escapes neutralization by South African COVID-19 donor plasma. *Nat Med*. avr 2021;27(4):622-5.
114. Faria NR, Mellan TA, Whittaker C, Claro IM, Candido D da S, Mishra S, et al. Genomics and epidemiology of the P.1 SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil. *Science*. 21 mai 2021;372(6544):815-21.

115. Coutinho RM, Marquitti FMD, Ferreira LS, Borges ME, da Silva RLP, Canton O, et al. Model-based estimation of transmissibility and reinfection of SARS-CoV-2 P.1 variant. *Commun Med*. 15 nov 2021;1(1):1-8.
116. Hoffmann M, Arora P, Groß R, Seidel A, Hörnich BF, Hahn AS, et al. SARS-CoV-2 variants B.1.351 and P.1 escape from neutralizing antibodies. *Cell*. 29 avr 2021;184(9):2384-2393.e12.
117. Wang P, Casner RG, Nair MS, Wang M, Yu J, Cerutti G, et al. Increased resistance of SARS-CoV-2 variant P.1 to antibody neutralization. *Cell Host Microbe*. 12 mai 2021;29(5):747-751.e4.
118. Sabino EC, Buss LF, Carvalho MPS, Prete CA, Crispim MAE, Fraiji NA, et al. Resurgence of COVID-19 in Manaus, Brazil, despite high seroprevalence. *The Lancet*. 6 févr 2021;397(10273):452-5.
119. Allen H, Vusirikala A, Flannagan J, Twohig KA, Zaidi A, Chudasama D, et al. Household transmission of COVID-19 cases associated with SARS-CoV-2 delta variant (B.1.617.2): national case-control study. *Lancet Reg Health Eur*. janv 2022;12:100252.
120. Li B, Deng A, Li K, Hu Y, Li Z, Shi Y, et al. Viral infection and transmission in a large, well-traced outbreak caused by the SARS-CoV-2 Delta variant. *Nat Commun*. 24 janv 2022;13(1):460.
121. Sheikh A, McMenamin J, Taylor B, Robertson C. SARS-CoV-2 Delta VOC in Scotland: demographics, risk of hospital admission, and vaccine effectiveness. *The Lancet*. 26 juin 2021;397(10293):2461-2.
122. Ong SWX, Chiew CJ, Ang LW, Mak TM, Cui L, Toh MPHS, et al. Clinical and virological features of SARS-CoV-2 variants of concern: a retrospective cohort study comparing B.1.1.7 (Alpha), B.1.315 (Beta), and B.1.617.2 (Delta). *Clin Infect Dis*. 23 août 2021;ciab721.
123. Fisman DN, Tuite AR. Evaluation of the relative virulence of novel SARS-CoV-2 variants: a retrospective cohort study in Ontario, Canada. *CMAJ*. 25 oct 2021;193(42):E1619-25.
124. Planas D, Veyer D, Baidaliuk A, Staropoli I, Guivel-Benhassine F, Rajah MM, et al. Reduced sensitivity of SARS-CoV-2 variant Delta to antibody neutralization. *Nature*. août 2021;596(7871):276-80.
125. Mlcochova P, Kemp SA, Dhar MS, Papa G, Meng B, Ferreira IATM, et al. SARS-CoV-2 B.1.617.2 Delta variant replication and immune evasion. *Nature*. nov 2021;599(7883):114-9.
126. Lopez Bernal J, Andrews N, Gower C, Gallagher E, Simmons R, Thelwall S, et al. Effectiveness of Covid-19 Vaccines against the B.1.617.2 (Delta) Variant. *N Engl J Med*. 12 août 2021;385(7):585-94.
127. Analyse de risque sur les variants émergents du SARS-CoV-2 réalisée conjointement par Santé publique France et le CNR des virus des infections respiratoires. *Santé Publique France*; 2022 avr.
128. Saxena SK, Kumar S, Ansari S, Paweska JT, Maurya VK, Tripathi AK, et al. Characterization of the novel SARS-CoV-2 Omicron (B.1.1.529) variant of concern and its global perspective. *J Med Virol*. avr 2022;94(4):1738-44.
129. Mannar D, Saville JW, Zhu X, Srivastava SS, Berezuk AM, Tuttle KS, et al. SARS-CoV-2 Omicron variant: Antibody evasion and cryo-EM structure of spike protein-ACE2 complex. *Science*. 18 févr 2022;375(6582):760-4.
130. Lyngse FP, Kirkeby CT, Denwood M, Christiansen LE, Mølbak K, Møller CH, et al. medRxiv preprint: Transmission of SARS-CoV-2 Omicron VOC subvariants BA.1 and BA.2: Evidence from Danish Households. 30 janv 2022. Disponible sur: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2022.01.28.22270044v1>
131. Communicable Disease Threats Report, Week 14, 3-9 April 2022. European Centre for Disease Prevention and Control; 2022 avr.
132. Majumdar S, Sarkar R. Mutational and phylogenetic analyses of the two lineages of the Omicron variant. *J Med Virol*. mai 2022;94(5):1777-9.
133. Yu J, Collier ARY, Rowe M, Mardas F, Ventura JD, Wan H, et al. Neutralization of the SARS-CoV-2 Omicron BA.1 and BA.2 Variants. *N Engl J Med*. 21 avr 2022;386(16):1579-80.
134. Mistry P, Barmania F, Mellet J, Peta K, Strydom A, Viljoen IM, et al. SARS-CoV-2 Variants, Vaccines, and Host Immunity. *Front Immunol*. 3 janv 2022;12:809244.
135. Kupferschmidt K. Where did « weird » Omicron come from? *Science*. 3 déc 2021;374(6572):1179.
136. Callaway E. Heavily mutated Omicron variant puts scientists on alert. *Nature*. 25 nov 2021;600(7887):21.
137. Ito K, Piantham C, Nishiura H. Relative instantaneous reproduction number of Omicron SARS-CoV-2 variant with respect to the Delta variant in Denmark. *J Med Virol*. 30 déc 2021;94(5):2265-8.

138. Nishiura H, Ito K, Anzai A, Kobayashi T, Piantham C, Rodríguez-Morales AJ. Relative Reproduction Number of SARS-CoV-2 Omicron (B.1.1.529) Compared with Delta Variant in South Africa. *J Clin Med*. 23 déc 2021;11(1):30.
139. Zahradník J, Marciano S, Shemesh M, Zoler E, Harari D, Chiaravalli J, et al. SARS-CoV-2 variant prediction and antiviral drug design are enabled by RBD in vitro evolution. *Nat Microbiol*. sept 2021;6(9):1188-98.
140. Tiecco G, Storti S, Degli Antoni M, Focà E, Castelli F, Quiros-Roldan E. Omicron Genetic and Clinical Peculiarities That May Overturn SARS-CoV-2 Pandemic: A Literature Review. *Int J Mol Sci*. 11 févr 2022;23(4):1987.
141. Cameroni E, Bowen JE, Rosen LE, Saliba C, Zepeda SK, Culap K, et al. Broadly neutralizing antibodies overcome SARS-CoV-2 Omicron antigenic shift. *Nature*. févr 2022;602(7898):664-70.
142. Peacock TP, Brown JC, Zhou J, Thakur N, Newman J, Kugathasan R, et al. bioRxiv preprint: The SARS-CoV-2 variant, Omicron, shows rapid replication in human primary nasal epithelial cultures and efficiently uses the endosomal route of entry. 3 janv 2022. Disponible sur: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.12.31.474653v1>
143. Willett BJ, Grove J, MacLean OA, Wilkie C, Logan N, Lorenzo GD, et al. medRxiv preprint: The hyper-transmissible SARS-CoV-2 Omicron variant exhibits significant antigenic change, vaccine escape and a switch in cell entry mechanism. 26 janv 2022. Disponible sur: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2022.01.03.21268111v2>
144. Kozlov M. How does Omicron spread so fast? A high viral load isn't the answer. *Nature*. 19 janv 2022;
145. Backer JA, Eggink D, Andeweg SP, Veldhuijzen IK, van Maarseveen N, Vermaas K, et al. Shorter serial intervals in SARS-CoV-2 cases with Omicron BA.1 variant compared with Delta variant, the Netherlands, 13 to 26 December 2021. *Eurosurveillance*. 10 févr 2022;27(6):2200042.
146. Suzuki R, Yamasoba D, Kimura I, Wang L, Kishimoto M, Ito J, et al. Attenuated fusogenicity and pathogenicity of SARS-CoV-2 Omicron variant. *Nature*. 24 mars 2022;603(7902):700-5.
147. Meng B, Abdullahi A, Ferreira IATM, Goonawardane N, Saito A, Kimura I, et al. Altered TMPRSS2 usage by SARS-CoV-2 Omicron impacts tropism and fusogenicity. *Nature*. 24 mars 2022;603(7902):706-14.
148. Wolter N, Jassat W, Walaza S, Welch R, Moultrie H, Groome M, et al. Early assessment of the clinical severity of the SARS-CoV-2 omicron variant in South Africa: a data linkage study. *The Lancet*. 29 janv 2022;399(10323):437-46.
149. Modes ME, Directo MP, Melgar M, Johnson LR, Yang H, Chaudhary P, et al. Clinical Characteristics and Outcomes Among Adults Hospitalized with Laboratory-Confirmed SARS-CoV-2 Infection During Periods of B.1.617.2 (Delta) and B.1.1.529 (Omicron) Variant Predominance - One Hospital, California, July 15-September 23, 2021, and December 21, 2021-January 27, 2022. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 11 févr 2022;71(6):217-23.
150. Ulloa AC, Buchan SA, Daneman N, Brown KA. Estimates of SARS-CoV-2 Omicron Variant Severity in Ontario, Canada. *JAMA*. 17 févr 2022;327(13):1286-8.
151. Hussey H, Davies MA, Heekes A, Williamson C, Valley-Omar Z, Hardie D, et al. Assessing the clinical severity of the Omicron variant in the Western Cape Province, South Africa, using the diagnostic PCR proxy marker of RdRp target delay to distinguish between Omicron and Delta infections - a survival analysis. *Int J Infect Dis*. mai 2022;118:150-4.
152. Veneti L, Bøås H, Bråthen Kristoffersen A, Stålcrantz J, Bragstad K, Hungnes O, et al. Reduced risk of hospitalisation among reported COVID-19 cases infected with the SARS-CoV-2 Omicron BA.1 variant compared with the Delta variant, Norway, December 2021 to January 2022. *Euro Surveill*. 27 janv 2022;27(4):2200077.
153. Report 50 - Hospitalisation risk for Omicron cases in England. Imperial College London; 2021 déc.
154. Lewnard JA, Hong VX, Patel MM, Kahn R, Lipsitch M, Tartof SY. medRxiv preprint: Clinical outcomes among patients infected with Omicron (B.1.1.529) SARS-CoV-2 variant in southern California. 7 mars 2022. Disponible sur: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2022.01.11.22269045v2>
155. Wang L, Berger NA, Kaelber DC, Davis PB, Volkow ND, Xu R. Incidence Rates and Clinical Outcomes of SARS-CoV-2 Infection With the Omicron and Delta Variants in Children Younger Than 5 Years in the US. *JAMA Pediatr*. 1 avr 2022;
156. Garg R, Gautam P, Suroliya V, Agarwal R, Bhugra A, Kaur US, et al. Evidence of early community transmission of Omicron (B1.1.529) in Delhi- A city with very high seropositivity and past-exposure. *Travel Med Infect Dis*. 16 févr 2022;46:102276.

157. Hoffmann M, Krüger N, Schulz S, Cossmann A, Rocha C, Kempf A, et al. The Omicron variant is highly resistant against antibody-mediated neutralization: Implications for control of the COVID-19 pandemic. *Cell*. 3 févr 2022;185(3):447-456.e11.
158. Dejnirattisai W, Huo J, Zhou D, Zahradník J, Supasa P, Liu C, et al. SARS-CoV-2 Omicron-B.1.1.529 leads to widespread escape from neutralizing antibody responses. *Cell*. 3 févr 2022;185(3):467-484.e15.
159. GeurtsvanKessel CH, Geers D, Schmitz KS, Mykytyn AZ, Lamers MM, Bogers S, et al. Divergent SARS CoV-2 Omicron-reactive T- and B cell responses in COVID-19 vaccine recipients. *Sci Immunol*. 25 mars 2022;7(69):eabo2202.
160. Nemet I, Kliker L, Lustig Y, Zuckerman N, Erster O, Cohen C, et al. Third BNT162b2 Vaccination Neutralization of SARS-CoV-2 Omicron Infection. *N Engl J Med*. 3 févr 2022;386(5):492-4.
161. Lu L, Mok BWY, Chen LL, Chan JMC, Tsang OTY, Lam BHS, et al. Neutralization of SARS-CoV-2 Omicron variant by sera from BNT162b2 or Coronavac vaccine recipients. *Clin Infect Dis*. 16 déc 2021;ciab1041.
162. Cele S, Jackson L, Khoury DS, Khan K, Moyo-Gwete T, Tegally H, et al. Omicron extensively but incompletely escapes Pfizer BNT162b2 neutralization. *Nature*. févr 2022;602(7898):654-6.
163. Mallapaty S. COVID reinfections surge during Omicron onslaught. *Nature*. 16 févr 2022;
164. Altarawneh HN, Chemaitelly H, Hasan MR, Ayoub HH, Qassim S, AlMukdad S, et al. Protection against the Omicron Variant from Previous SARS-CoV-2 Infection. *N Engl J Med*. 31 mars 2022;386(13):1288-90.
165. Report 49 - Growth, population distribution and immune escape of Omicron in England. Imperial College London; 2021 déc.
166. Stegger M, Edslev SM, Sieber RN, Ingham AC, Ng KL, Tang MHE, et al. medRxiv preprint: Occurrence and significance of Omicron BA.1 infection followed by BA.2 reinfection. 22 févr 2022. Disponible sur: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2022.02.19.22271112v1>
167. Chemaitelly H, Ayoub HH, Coyle P, Tang P, Yassine HM, Al-Khatib HA, et al. medRxiv preprint: Protection of Omicron sub-lineage infection against reinfection with another Omicron sub-lineage. 25 févr 2022. Disponible sur: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2022.02.24.22271440v1>
168. Greenhalgh T, Jimenez JL, Prather KA, Tufekci Z, Fisman D, Schooley R. Ten scientific reasons in support of airborne transmission of SARS-CoV-2. *The Lancet*. 1 mai 2021;397(10285):1603-5.
169. van Doremalen N, Bushmaker T, Morris DH, Holbrook MG, Gamble A, Williamson BN, et al. Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. *N Engl J Med*. 16 avr 2020;382(16):1564-7.
170. Wang CC, Prather KA, Sznitman J, Jimenez JL, Lakdawala SS, Tufekci Z, et al. Airborne transmission of respiratory viruses. *Science*. 27 août 2021;373(6558):eabd9149.
171. Huang N, Pérez P, Kato T, Mikami Y, Okuda K, Gilmore RC, et al. SARS-CoV-2 infection of the oral cavity and saliva. *Nat Med*. mai 2021;27(5):892-903.
172. Science Brief: SARS-CoV-2 and Surface (Fomite) Transmission for Indoor Community Environments. US Centers for Disease Control and Prevention; 2021 avr.
173. Qian Q, Fan L, Liu W, Li J, Yue J, Wang M, et al. Direct Evidence of Active SARS-CoV-2 Replication in the Intestine. *Clin Infect Dis*. 2 août 2021;73(3):361-6.
174. Cheung KS, Hung IFN, Chan PPY, Lung KC, Tso E, Liu R, et al. Gastrointestinal Manifestations of SARS-CoV-2 Infection and Virus Load in Fecal Samples From a Hong Kong Cohort: Systematic Review and Meta-analysis. *Gastroenterology*. juill 2020;159(1):81-95.
175. Parasa S, Desai M, Thoguluva Chandrasekar V, Patel HK, Kennedy KF, Roesch T, et al. Prevalence of Gastrointestinal Symptoms and Fecal Viral Shedding in Patients With Coronavirus Disease 2019. *JAMA Netw Open*. 11 juin 2020;3(6):e2011335.
176. Zhang Y, Chen C, Zhu S, Shu C, Wang D, Song J, et al. Isolation of 2019-nCoV from a Stool Specimen of a Laboratory-Confirmed Case of the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *China CDC Wkly*. 1 févr 2020;2(8):123-4.
177. Jeong HW, Kim SM, Kim HS, Kim YI, Kim JH, Cho JY, et al. Viable SARS-CoV-2 in various specimens from COVID-19 patients. *Clin Microbiol Infect*. nov 2020;26(11):1520-4.
178. Xiao F, Sun J, Xu Y, Li F, Huang X, Li H, et al. Infectious SARS-CoV-2 in Feces of Patient with Severe COVID-19. *Emerg Infect Dis*. août 2020;26(8):1920-2.

179. Wang W, Xu Y, Gao R, Lu R, Han K, Wu G, et al. Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. *JAMA*. 12 mai 2020;323(18):1843-4.
180. Guo M, Tao W, Flavell RA, Zhu S. Potential intestinal infection and faecal–oral transmission of SARS-CoV-2. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. avr 2021;18(4):269-83.
181. Sun J, Zhu A, Li H, Zheng K, Zhuang Z, Chen Z, et al. Isolation of infectious SARS-CoV-2 from urine of a COVID-19 patient. *Emerg Microbes Infect*. déc 2020;9(1):991-3.
182. Ciapponi A, Bardach A, Comandé D, Berrueta M, Argento FJ, Rodriguez Cairoli F, et al. COVID-19 and pregnancy: An umbrella review of clinical presentation, vertical transmission, and maternal and perinatal outcomes. *PloS One*. 29 juin 2021;16(6):e0253974.
183. Liu Y, Gayle AA, Wilder-Smith A, Rocklöv J. The reproductive number of COVID-19 is higher compared to SARS coronavirus. *J Travel Med*. 13 févr 2020;27(2):taaa021.
184. Liu Y, Rocklöv J. The effective reproduction number for the omicron SARS-CoV-2 variant of concern is several times higher than Delta. *J Travel Med*. 9 mars 2022;taac037.
185. Johansson MA, Quandelacy TM, Kada S, Prasad PV, Steele M, Brooks JT, et al. SARS-CoV-2 Transmission From People Without COVID-19 Symptoms. *JAMA Netw Open*. 7 janv 2021;4(1):e2035057.
186. Estimating mortality from COVID-19. World Health Organization; 2020 août.
187. Weekly epidemiological update: Omicron variant of concern (VOC) – week 2 (data as of 20 January 2022) EU/EEA. European Centre for Disease Prevention and Control; 2022 janv.
188. Romero Starke K, Reissig D, Peterleit-Haack G, Schmauder S, Nienhaus A, Seidler A. The isolated effect of age on the risk of COVID-19 severe outcomes: a systematic review with meta-analysis. *BMJ Glob Health*. déc 2021;6(12):e006434.
189. O'Driscoll M, Ribeiro Dos Santos G, Wang L, Cummings DAT, Azman AS, Paireau J, et al. Age-specific mortality and immunity patterns of SARS-CoV-2. *Nature*. févr 2021;590(7844):140-5.
190. Salje H, Tran Kiem C, Lefrancq N, Courtejoie N, Bosetti P, Paireau J, et al. Estimating the burden of SARS-CoV-2 in France. *Science*. 10 juill 2020;369(6500):208-11.
191. Peckham H, de Gruijter NM, Raine C, Radziszewska A, Ciurtin C, Wedderburn LR, et al. Male sex identified by global COVID-19 meta-analysis as a risk factor for death and ITU admission. *Nat Commun*. 9 déc 2020;11(1):6317.
192. Kaeuffer C, Le Hyaric C, Fabacher T, Mootien J, Dervieux B, Ruch Y, et al. Clinical characteristics and risk factors associated with severe COVID-19: prospective analysis of 1,045 hospitalised cases in North-Eastern France, March 2020. *Euro Surveill*. déc 2020;25(48).
193. Stratégie de vaccination contre le Sars-Cov-2 : Actualisation des facteurs de risque de formes graves de la COVID-19 et des recommandations sur la stratégie de priorisation des populations à vacciner. Haute Autorité de Santé; 2021 mars.
194. Li Q, Guan X, Wu P, Wang X, Zhou L, Tong Y, et al. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus–Infected Pneumonia. *N Engl J Med*. 26 mars 2020;382(13):1199-207.
195. Lauer SA, Grantz KH, Bi Q, Jones FK, Zheng Q, Meredith HR, et al. The Incubation Period of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) From Publicly Reported Confirmed Cases: Estimation and Application. *Ann Intern Med*. 5 mai 2020;172(9):577-82.
196. Grant R, Charmet T, Schaeffer L, Galmiche S, Madec Y, Von Platen C, et al. Impact of SARS-CoV-2 Delta variant on incubation, transmission settings and vaccine effectiveness: Results from a nationwide case-control study in France. *Lancet Reg Health Eur*. févr 2022;13:100278.
197. Brandal LT, MacDonald E, Veneti L, Ravlo T, Lange H, Naseer U, et al. Outbreak caused by the SARS-CoV-2 Omicron variant in Norway, November to December 2021. *Eurosurveillance*. 16 déc 2021;26(50):2101147.
198. He X, Lau EHY, Wu P, Deng X, Wang J, Hao X, et al. Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. *Nat Med*. mai 2020;26(5):672-5.
199. van Kampen JJA, van de Vijver DAMC, Fraaij PLA, Haagmans BL, Lamers MM, Okba N, et al. Duration and key determinants of infectious virus shedding in hospitalized patients with coronavirus disease-2019 (COVID-19). *Nat Commun*. 11 janv 2021;12(1):267.
200. Benotmane I, Risch S, Doderer-Lang C, Caillard S, Fafi-Kremer S. Long-term shedding of viable SARS-CoV-2 in kidney transplant recipients with COVID-19. *Am J Transplant*. août 2021;21(8):2871-5.

201. Qutub M, Aldabbagh Y, Mehdawi F, Alraddadi A, Alhomysy M, Alnahdi A, et al. Duration of viable SARS-CoV-2 shedding from respiratory tract in different human hosts and its impact on isolation discontinuation policies revision; a narrative review. *Clin Infect Pract.* 1 janv 2022;13:100140.
202. Matheson NJ, Lehner PJ. How does SARS-CoV-2 cause COVID-19? *Science.* 31 juill 2020;369(6503):510-1.
203. Ma Q, Liu J, Liu Q, Kang L, Liu R, Jing W, et al. Global Percentage of Asymptomatic SARS-CoV-2 Infections Among the Tested Population and Individuals With Confirmed COVID-19 Diagnosis: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Netw Open.* 1 déc 2021;4(12):e2137257.
204. Oran DP, Topol EJ. Prevalence of Asymptomatic SARS-CoV-2 Infection. *Ann Intern Med.* sept 2020;173(5):362-7.
205. Hu B, Guo H, Zhou P, Shi ZL. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol.* mars 2021;19(3):141-54.
206. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet.* 15 févr 2020;395(10223):497-506.
207. Viner RM, Ward JL, Hudson LD, Ashe M, Patel SV, Hargreaves D, et al. Systematic review of reviews of symptoms and signs of COVID-19 in children and adolescents. *Arch Dis Child.* 1 août 2021;106(8):802-7.
208. Tong JY, Wong A, Zhu D, Fastenberg JH, Tham T. The Prevalence of Olfactory and Gustatory Dysfunction in COVID-19 Patients: A Systematic Review and Meta-analysis. *Otolaryngol--Head Neck Surg.* juill 2020;163(1):3-11.
209. Maisa A, Spaccaferri G, Fournier L, Schaeffer J, Deniau J, Rolland P, et al. First cases of Omicron in France are exhibiting mild symptoms, November 2021-January 2022. *Infect Dis Now.* 12 févr 2022;S2666-9919(22)00036-7.
210. Clinical Spectrum of SARS-CoV-2 Infection [Internet]. National Institute of Health, COVID-19 Treatment Guidelines. 2021 [cité 1 mai 2022]. Disponible sur: <https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/overview/clinical-spectrum/>
211. Wu Z, McGoogan JM. Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72 314 Cases From the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA.* 7 avr 2020;323(13):1239-42.
212. Report of the WHO-China Joint Mission on Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). World Health Organization; 2020 févr.
213. Clinical characteristics of COVID-19 [Internet]. European Centre for Disease Prevention and Control. 2022 [cité 1 mai 2022]. Disponible sur: <https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/latest-evidence/clinical>
214. Ning Q, Wu D, Wang X, Xi D, Chen T, Chen G, et al. The mechanism underlying extrapulmonary complications of the coronavirus disease 2019 and its therapeutic implication. *Signal Transduct Target Ther.* 23 févr 2022;7(1):57.
215. Tan SW, Tam YC, Oh CC. Skin manifestations of COVID-19: A worldwide review. *JAAD Int.* mars 2021;2:119-33.
216. Suh YJ, Hong H, Ohana M, Bompard F, Revel MP, Valle C, et al. Pulmonary Embolism and Deep Vein Thrombosis in COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Radiology.* févr 2021;298(2):E70-80.
217. Whittaker A, Anson M, Harky A. Neurological Manifestations of COVID-19: A systematic review and current update. *Acta Neurol Scand.* juill 2020;142(1):14-22.
218. Gabarre P, Dumas G, Dupont T, Darmon M, Azoulay E, Zafrani L. Acute kidney injury in critically ill patients with COVID-19. *Intensive Care Med.* juill 2020;46(7):1339-48.
219. Akbarialiabadi H, Taghrir MH, Abdollahi A, Ghahramani N, Kumar M, Paydar S, et al. Long COVID, a comprehensive systematic scoping review. *Infection.* 2021;49(6):1163-86.
220. Theuerkauf SA, Michels A, Riechert V, Maier TJ, Flory E, Cichutek K, et al. Quantitative assays reveal cell fusion at minimal levels of SARS-CoV-2 spike protein and fusion from without. *iScience.* 19 mars 2021;24(3):102170.
221. Rajah MM, Bernier A, Buchrieser J, Schwartz O. The Mechanism and Consequences of SARS-CoV-2 Spike-Mediated Fusion and Syncytia Formation. *J Mol Biol.* 30 mars 2022;434(6):167280.
222. Robinot R, Hubert M, de Melo GD, Lazarini F, Bruel T, Smith N, et al. SARS-CoV-2 infection induces the dedifferentiation of multiciliated cells and impairs mucociliary clearance. *Nat Commun.* 16 juill 2021;12(1):4354.

223. D'Agnillo F, Walters KA, Xiao Y, Sheng ZM, Scherler K, Park J, et al. Lung epithelial and endothelial damage, loss of tissue repair, inhibition of fibrinolysis, and cellular senescence in fatal COVID-19. *Sci Transl Med*. 17 nov 2021;13(620):eabj7790.
224. Ye CH, Hsu WL, Peng GR, Yu WC, Lin WC, Hu S, et al. Role of the Immune Microenvironment in SARS-CoV-2 Infection. *Cell Transplant*. 1 janv 2021;30:09636897211010632.
225. Aboudounya MM, Heads RJ. COVID-19 and Toll-Like Receptor 4 (TLR4): SARS-CoV-2 May Bind and Activate TLR4 to Increase ACE2 Expression, Facilitating Entry and Causing Hyperinflammation. *Mediators Inflamm*. 14 janv 2021;2021:8874339.
226. Choudhury A, Mukherjee S. In silico studies on the comparative characterization of the interactions of SARS-CoV-2 spike glycoprotein with ACE-2 receptor homologs and human TLRs. *J Med Virol*. oct 2020;92(10):2105-13.
227. Imai Y, Kuba K, Neely GG, Yaghubian-Malhami R, Perkmann T, van Loo G, et al. Identification of oxidative stress and Toll-like receptor 4 signaling as a key pathway of acute lung injury. *Cell*. 18 avr 2008;133(2):235-49.
228. Diamond MS, Kanneganti TD. Innate immunity: the first line of defense against SARS-CoV-2. *Nat Immunol*. févr 2022;23(2):165-76.
229. Zheng M, Karki R, Williams EP, Yang D, Fitzpatrick E, Vogel P, et al. TLR2 senses the SARS-CoV-2 envelope protein to produce inflammatory cytokines. *Nat Immunol*. juill 2021;22(7):829-38.
230. Menezes MCS, Veiga ADM, Martins de Lima T, Kunimi Kubo Ariga S, Vieira Barbeiro H, de Lucena Moreira C, et al. Lower peripheral blood Toll-like receptor 3 expression is associated with an unfavorable outcome in severe COVID-19 patients. *Sci Rep*. 27 juill 2021;11(1):15223.
231. Khanmohammadi S, Rezaei N. Role of Toll-like receptors in the pathogenesis of COVID-19. *J Med Virol*. 2021;93(5):2735-9.
232. Xu H, Akinyemi IA, Chitre SA, Loeb JC, Lednicky JA, McIntosh MT, et al. SARS-CoV-2 viroporin encoded by ORF3a triggers the NLRP3 inflammatory pathway. *Virology*. mars 2022;568:13-22.
233. Pan P, Shen M, Yu Z, Ge W, Chen K, Tian M, et al. SARS-CoV-2 N protein promotes NLRP3 inflammasome activation to induce hyperinflammation. *Nat Commun*. 2 août 2021;12(1):4664.
234. Campbell GR, To RK, Hanna J, Spector SA. SARS-CoV-2, SARS-CoV-1, and HIV-1 derived ssRNA sequences activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages through a non-classical pathway. *iScience*. 23 avr 2021;24(4):102295.
235. Carvalho T, Krammer F, Iwasaki A. The first 12 months of COVID-19: a timeline of immunological insights. *Nat Rev Immunol*. avr 2021;21(4):245-56.
236. Hadjadj J, Yatim N, Barnabei L, Corneau A, Boussier J, Smith N, et al. Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. *Science*. 7 août 2020;369(6504):718-24.
237. Laing AG, Lorenc A, del Molino del Barrio I, Das A, Fish M, Monin L, et al. A dynamic COVID-19 immune signature includes associations with poor prognosis. *Nat Med*. oct 2020;26(10):1623-35.
238. Zhang Y, Chen S, Jin Y, Ji W, Zhang W, Duan G. An Update on Innate Immune Responses during SARS-CoV-2 Infection. *Viruses*. 14 oct 2021;13(10):2060.
239. Birra D, Benucci M, Landolfi L, Merchionda A, Loi G, Amato P, et al. COVID 19: a clue from innate immunity. *Immunol Res*. 1 juin 2020;68(3):161-8.
240. Francistiová L, Klepe A, Curley G, Gulya K, Dinnyés A, Filkor K. Cellular and Molecular Effects of SARS-CoV-2 Linking Lung Infection to the Brain. *Front Immunol*. 13 août 2021;12:730088.
241. Banerjee AK, Blanco MR, Bruce EA, Honson DD, Chen LM, Chow A, et al. SARS-CoV-2 Disrupts Splicing, Translation, and Protein Trafficking to Suppress Host Defenses. *Cell*. 25 nov 2020;183(5):1325-1339.e21.
242. Su CM, Wang L, Yoo D. Activation of NF- κ B and induction of proinflammatory cytokine expressions mediated by ORF7a protein of SARS-CoV-2. *Sci Rep*. 29 juin 2021;11(1):13464.
243. Haga S, Yamamoto N, Nakai-Murakami C, Osawa Y, Tokunaga K, Sata T, et al. Modulation of TNF-alpha-converting enzyme by the spike protein of SARS-CoV and ACE2 induces TNF-alpha production and facilitates viral entry. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 3 juin 2008;105(22):7809-14.
244. Zhang Q, Bastard P, Liu Z, Le Pen J, Moncada-Velez M, Chen J, et al. Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19. *Science*. 23 oct 2020;370(6515):eabd4570.

245. Wang EY, Mao T, Klein J, Dai Y, Huck JD, Jaycox JR, et al. Diverse functional autoantibodies in patients with COVID-19. *Nature*. juill 2021;595(7866):283-8.
246. Bastard P, Rosen LB, Zhang Q, Michailidis E, Hoffmann HH, Zhang Y, et al. Autoantibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19. *Science*. 23 oct 2020;370(6515):eabd4585.
247. Bastard P, Gervais A, Le Voyer T, Rosain J, Philippot Q, Manry J, et al. Autoantibodies neutralizing type I IFNs are present in ~4% of uninfected individuals over 70 years old and account for ~20% of COVID-19 deaths. *Sci Immunol*. 19 août 2021;6(62):eabl4340.
248. Cuevas AM, Clark JM, Potter JJ. Increased TLR/MyD88 signaling in patients with obesity: is there a link to COVID-19 disease severity? *Int J Obes*. mai 2021;45(5):1152-4.
249. Merad M, Martin JC. Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages. *Nat Rev Immunol*. juin 2020;20(6):355-62.
250. Gillot C, Favresse J, Mullier F, Lecompte T, Dogné JM, Douxfils J. NETosis and the Immune System in COVID-19: Mechanisms and Potential Treatments. *Front Pharmacol*. août 2021;12:708302.
251. Bi J. NK cell dysfunction in patients with COVID-19. *Cell Mol Immunol*. févr 2022;19(2):127-9.
252. Li M, Guo W, Dong Y, Wang X, Dai D, Liu X, et al. Elevated Exhaustion Levels of NK and CD8+ T Cells as Indicators for Progression and Prognosis of COVID-19 Disease. *Front Immunol*. 14 oct 2020;11:580237.
253. Karki R, Sharma BR, Tuladhar S, Williams EP, Zalduondo L, Samir P, et al. Synergism of TNF- α and IFN- γ Triggers Inflammatory Cell Death, Tissue Damage, and Mortality in SARS-CoV-2 Infection and Cytokine Shock Syndromes. *Cell*. 7 janv 2021;184(1):149-168.e17.
254. Batah SS, Fabro AT. Pulmonary pathology of ARDS in COVID-19: A pathological review for clinicians. *Respir Med*. janv 2021;176:106239.
255. Mason RJ. Pathogenesis of COVID-19 from a cell biologic perspective. *Eur Respir J*. 16 avr 2020;55(4):2000607.
256. Chao J, Wood JG, Gonzalez NC. Alveolar hypoxia, alveolar macrophages, and systemic inflammation. *Respir Res*. 22 juin 2009;10(1):54.
257. Gupta A, Madhavan MV, Sehgal K, Nair N, Mahajan S, Sehrawat TS, et al. Extrapulmonary manifestations of COVID-19. *Nat Med*. juill 2020;26(7):1017-32.
258. Samavati L, Uhal BD. ACE2, Much More Than Just a Receptor for SARS-COV-2. *Front Cell Infect Microbiol*. 5 juin 2020;10:317.
259. Pennock ND, White JT, Cross EW, Cheney EE, Tamburini BA, Kedl RM. T cell responses: naïve to memory and everything in between. *Adv Physiol Educ*. déc 2013;37(4):273-83.
260. Ciudad M. Thèse d'Université : Étude des cellules lymphoïdes innées spléniques humaines et de leurs implications au cours de la thrombopénie immunologique. Université de Bourgogne Franche-Comté; 2018.
261. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations. *Annu Rev Immunol*. 2010;28:445-89.
262. Crotty S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu Rev Immunol*. 2011;29:621-63.
263. Yoshitomi H, Ueno H. Shared and distinct roles of T peripheral helper and T follicular helper cells in human diseases. *Cell Mol Immunol*. mars 2021;18(3):523-7.
264. Notarbartolo S, Ranzani V, Bandera A, Gruarin P, Bevilacqua V, Putignano AR, et al. Integrated longitudinal immunophenotypic, transcriptional, and repertoire analyses delineate immune responses in patients with COVID-19. *Sci Immunol*. 10 août 2021;6(62):eabg5021.
265. Bergamaschi L, Mescia F, Turner L, Hanson AL, Kotagiri P, Dunmore BJ, et al. Longitudinal analysis reveals that delayed bystander CD8+ T cell activation and early immune pathology distinguish severe COVID-19 from mild disease. *Immunity*. 8 juin 2021;54(6):1257-1275.e8.
266. Grifoni A, Weiskopf D, Ramirez SI, Mateus J, Dan JM, Moderbacher CR, et al. Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. *Cell*. 25 2020;181(7):1489-1501.e15.
267. Dan JM, Mateus J, Kato Y, Hastie KM, Yu ED, Faliti CE, et al. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science*. 5 févr 2021;371(6529):eabf4063.
268. Rydzynski Moderbacher C, Ramirez SI, Dan JM, Grifoni A, Hastie KM, Weiskopf D, et al. Antigen-Specific Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 in Acute COVID-19 and Associations with Age and Disease Severity. *Cell*. 12 nov 2020;183(4):996-1012.e19.

269. Sekine T, Perez-Potti A, Rivera-Ballesteros O, Strålin K, Gorin JB, Olsson A, et al. Robust T Cell Immunity in Convalescent Individuals with Asymptomatic or Mild COVID-19. *Cell*. 1 oct 2020;183(1):158-168.e14.
270. Peng Y, Mentzer AJ, Liu G, Yao X, Yin Z, Dong D, et al. Broad and strong memory CD4 + and CD8 + T cells induced by SARS-CoV-2 in UK convalescent individuals following COVID-19. *Nat Immunol*. nov 2020;21(11):1336-45.
271. Moss P. The T cell immune response against SARS-CoV-2. *Nat Immunol*. févr 2022;23(2):186-93.
272. McClain MT, Park LP, Nicholson B, Veldman T, Zaas AK, Turner R, et al. Longitudinal analysis of leukocyte differentials in peripheral blood of patients with acute respiratory viral infections. *J Clin Virol*. déc 2013;58(4):689-95.
273. Chen G, Wu D, Guo W, Cao Y, Huang D, Wang H, et al. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. *J Clin Invest*. 1 mai 2020;130(5):2620-9.
274. Mathew D, Giles JR, Baxter AE, Oldridge DA, Greenplate AR, Wu JE, et al. Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications. *Science*. 4 sept 2020;369(6508):eabc8511.
275. Mazzone A, Salvati L, Maggi L, Capone M, Vanni A, Spinicci M, et al. Impaired immune cell cytotoxicity in severe COVID-19 is IL-6 dependent. *J Clin Invest*. 1 sept 2020;130(9):4694-703.
276. Wichmann D, Sperhake JP, Lütgehetmann M, Steurer S, Edler C, Heinemann A, et al. Autopsy Findings and Venous Thromboembolism in Patients With COVID-19. *Ann Intern Med*. 18 août 2020;173(4):268-77.
277. Liao M, Liu Y, Yuan J, Wen Y, Xu G, Zhao J, et al. Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19. *Nat Med*. juin 2020;26(6):842-4.
278. Prozan L, Shusterman E, Ablin J, Mitelpunkt A, Weiss-Meilik A, Adler A, et al. Prognostic value of neutrophil-to-lymphocyte ratio in COVID-19 compared with Influenza and respiratory syncytial virus infection. *Sci Rep*. 2 nov 2021;11(1):21519.
279. Kuri-Cervantes L, Pampena MB, Meng W, Rosenfeld AM, Ittner CAG, Weisman AR, et al. Comprehensive mapping of immune perturbations associated with severe COVID-19. *Sci Immunol*. 15 juill 2020;5(49):eabd7114.
280. Zhou R, To KKW, Wong YC, Liu L, Zhou B, Li X, et al. Acute SARS-CoV-2 Infection Impairs Dendritic Cell and T Cell Responses. *Immunity*. 13 oct 2020;53(4):864-877.e5.
281. Swadlow L, Maini MK. T cells in COVID-19 — united in diversity. *Nat Immunol*. nov 2020;21(11):1307-8.
282. Weiskopf D, Schmitz KS, Raadsen MP, Grifoni A, Okba NMA, Endeman H, et al. Phenotype and kinetics of SARS-CoV-2-specific T cells in COVID-19 patients with acute respiratory distress syndrome. *Sci Immunol*. 26 juin 2020;5(48):eabd2071.
283. Meckiff BJ, Ramírez-Suástegui C, Fajardo V, Chee SJ, Kusnadi A, Simon H, et al. Imbalance of Regulatory and Cytotoxic SARS-CoV-2-Reactive CD4+ T Cells in COVID-19. *Cell*. 25 nov 2020;183(5):1340-1353.e16.
284. Xu Z, Shi L, Wang Y, Zhang J, Huang L, Zhang C, et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir Med*. 1 avr 2020;8(4):420-2.
285. Su Y, Chen D, Yuan D, Lausted C, Choi J, Dai CL, et al. Multi-Omics Resolves a Sharp Disease-State Shift between Mild and Moderate COVID-19. *Cell*. 10 déc 2020;183(6):1479-1495.e20.
286. Zheng M, Gao Y, Wang G, Song G, Liu S, Sun D, et al. Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. *Cell Mol Immunol*. mai 2020;17(5):533-5.
287. Diao B, Wang C, Tan Y, Chen X, Liu Y, Ning L, et al. Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Front Immunol*. 1 mai 2020;11:827.
288. Thieme CJ, Anft M, Paniskaki K, Blazquez-Navarro A, Doevelaar A, Seibert FS, et al. Robust T Cell Response Toward Spike, Membrane, and Nucleocapsid SARS-CoV-2 Proteins Is Not Associated with Recovery in Critical COVID-19 Patients. *Cell Rep Med*. 22 sept 2020;1(6):100092.
289. Quadeer AA, Ahmed SF, McKay MR. Landscape of epitopes targeted by T cells in 852 individuals recovered from COVID-19: Meta-analysis, immunoprevalence, and web platform. *Cell Rep Med*. 21 mai 2021;2(6):100312.
290. Grifoni A, Sidney J, Vita R, Peters B, Crotty S, Weiskopf D, et al. SARS-CoV-2 human T cell epitopes: Adaptive immune response against COVID-19. *Cell Host Microbe*. 14 juill 2021;29(7):1076-92.

291. Tarke A, Sidney J, Kidd CK, Dan JM, Ramirez SI, Yu ED, et al. Comprehensive analysis of T cell immunodominance and immunoprevalence of SARS-CoV-2 epitopes in COVID-19 cases. *Cell Rep Med*. 16 févr 2021;2(2):100204.
292. Ferretti AP, Kula T, Wang Y, Nguyen DMV, Weinheimer A, Dunlap GS, et al. Unbiased Screens Show CD8+ T Cells of COVID-19 Patients Recognize Shared Epitopes in SARS-CoV-2 that Largely Reside outside the Spike Protein. *Immunity*. 17 nov 2020;53(5):1095-1107.e3.
293. Tarke A, Sidney J, Methot N, Yu ED, Zhang Y, Dan JM, et al. Impact of SARS-CoV-2 variants on the total CD4+ and CD8+ T cell reactivity in infected or vaccinated individuals. *Cell Rep Med*. 20 juill 2021;2(7):100355.
294. Mateus J, Grifoni A, Tarke A, Sidney J, Ramirez SI, Dan JM, et al. Selective and cross-reactive SARS-CoV-2 T cell epitopes in unexposed humans. *Science*. 2 oct 2020;370(6512):89-94.
295. Le Bert N, Tan AT, Kunasegaran K, Tham CYL, Hafezi M, Chia A, et al. SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls. *Nature*. août 2020;584(7821):457-62.
296. Braun J, Loyal L, Frentsch M, Wendisch D, Georg P, Kurth F, et al. SARS-CoV-2-reactive T cells in healthy donors and patients with COVID-19. *Nature*. nov 2020;587(7833):270-4.
297. Nelde A, Bilich T, Heitmann JS, Maringer Y, Salih HR, Roerden M, et al. SARS-CoV-2-derived peptides define heterologous and COVID-19-induced T cell recognition. *Nat Immunol*. janv 2021;22(1):74-85.
298. Ni L, Ye F, Cheng ML, Feng Y, Deng YQ, Zhao H, et al. Detection of SARS-CoV-2-Specific Humoral and Cellular Immunity in COVID-19 Convalescent Individuals. *Immunity*. 16 juin 2020;52(6):971-977.e3.
299. Mallajosyula V, Ganjavi C, Chakraborty S, McSween AM, Pavlovitch-Bedzyk AJ, Wilhelmy J, et al. CD8+ T cells specific for conserved coronavirus epitopes correlate with milder disease in patients with COVID-19. *Sci Immunol*. juill 2021;6(61):eabg5669.
300. Sagar M, Reifler K, Rossi M, Miller NS, Sinha P, White LF, et al. Recent endemic coronavirus infection is associated with less-severe COVID-19. *J Clin Invest*. 4 janv 2021;131(1):143380.
301. Bacher P, Rosati E, Esser D, Martini GR, Saggau C, Schiminsky E, et al. Low-Avidity CD4+ T Cell Responses to SARS-CoV-2 in Unexposed Individuals and Humans with Severe COVID-19. *Immunity*. 15 déc 2020;53(6):1258-1271.e5.
302. Dykema AG, Zhang B, Woldemeskel BA, Garliss CC, Cheung LS, Choudhury D, et al. Functional characterization of CD4+ T cell receptors crossreactive for SARS-CoV-2 and endemic coronaviruses. *J Clin Invest*. 131(10):e146922.
303. Zuo J, Dowell AC, Pearce H, Verma K, Long HM, Begum J, et al. Robust SARS-CoV-2-specific T cell immunity is maintained at 6 months following primary infection. *Nat Immunol*. mai 2021;22(5):620-6.
304. Law JC, Koh WH, Budykowski P, Lin J, Yue F, Abe KT, et al. Systematic Examination of Antigen-Specific Recall T Cell Responses to SARS-CoV-2 versus Influenza Virus Reveals a Distinct Inflammatory Profile. *J Immunol*. 1 janv 2021;206(1):37-50.
305. Cohen KW, Linderman SL, Moodie Z, Czartoski J, Lai L, Mantus G, et al. Longitudinal analysis shows durable and broad immune memory after SARS-CoV-2 infection with persisting antibody responses and memory B and T cells. *Cell Rep Med*. 20 juill 2021;2(7):100354.
306. Poon MML, Rybkina K, Kato Y, Kubota M, Matsumoto R, Bloom NI, et al. SARS-CoV-2 infection generates tissue-localized immunological memory in humans. *Sci Immunol*. 6(65):eabl9105.
307. Grau-Expósito J, Sánchez-Gaona N, Massana N, Suppi M, Astorga-Gamaza A, Perea D, et al. Peripheral and lung resident memory T cell responses against SARS-CoV-2. *Nat Commun*. 21 mai 2021;12(1):3010.
308. McMahan K, Yu J, Mercado NB, Loos C, Tostanoski LH, Chandrashekar A, et al. Correlates of protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. *Nature*. févr 2021;590(7847):630-4.
309. Kurosaki T, Kometani K, Ise W. Memory B cells. *Nat Rev Immunol*. mars 2015;15(3):149-59.
310. Alugupalli KR, Leong JM, Woodland RT, Muramatsu M, Honjo T, Gerstein RM. B1b lymphocytes confer T cell-independent long-lasting immunity. *Immunity*. sept 2004;21(3):379-90.
311. Obukhanych TV, Nussenzweig MC. T-independent type II immune responses generate memory B cells. *J Exp Med*. 20 févr 2006;203(2):305-10.
312. Phan TG, Paus D, Chan TD, Turner ML, Nutt SL, Basten A, et al. High affinity germinal center B cells are actively selected into the plasma cell compartment. *J Exp Med*. 30 oct 2006;203(11):2419-24.
313. Mesin L, Ersching J, Victora GD. Germinal center B cell dynamics. *Immunity*. 20 sept 2016;45(3):471-82.

314. Shinnakasu R, Inoue T, Kometani K, Moriyama S, Adachi Y, Nakayama M, et al. Regulated selection of germinal-center cells into the memory B cell compartment. *Nat Immunol.* juill 2016;17(7):861-9.
315. MacLeod MKL, David A, McKee AS, Crawford F, Kappler JW, Marrack P. Memory CD4 T Cells That Express CXCR5 Provide Accelerated Help to B Cells. *J Immunol.* 1 mars 2011;186(5):2889-96.
316. Dogan I, Bertocci B, Vilmont V, Delbos F, Mégret J, Storck S, et al. Multiple layers of B cell memory with different effector functions. *Nat Immunol.* déc 2009;10(12):1292-9.
317. Pape KA, Taylor JJ, Maul RW, Gearhart PJ, Jenkins MK. Different B cell populations mediate early and late memory during an endogenous immune response. *Science.* 4 mars 2011;331(6021):1203-7.
318. Forthall DN. Functions of Antibodies. *Microbiol Spectr.* 15 août 2014;2(4):1-17.
319. Lu LL, Suscovich TJ, Fortune SM, Alter G. Beyond binding: antibody effector functions in infectious diseases. *Nat Rev Immunol.* janv 2018;18(1):46-61.
320. Devasenapathy N, Ye Z, Loeb M, Fang F, Najafabadi BT, Xiao Y, et al. Efficacité et innocuité du plasma de convalescent en cas de forme grave de COVID-19, extrapolée de données relatives à d'autres formes graves d'infections respiratoires virales: revue systématique et méta-analyse. *CMAJ.* 23 nov 2020;192(47):E1559-70.
321. Wang SF, Tseng SP, Yen CH, Yang JY, Tsao CH, Shen CW, et al. Antibody-dependent SARS coronavirus infection is mediated by antibodies against spike proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 22 août 2014;451(2):208-14.
322. Gudbjartsson DF, Norddahl GL, Melsted P, Gunnarsdottir K, Holm H, Eythorsson E, et al. Humoral Immune Response to SARS-CoV-2 in Iceland. *N Engl J Med.* 29 oct 2020;383(18):1724-34.
323. Wajnberg A, Amanat F, Firpo A, Altman DR, Bailey MJ, Mansour M, et al. Robust neutralizing antibodies to SARS-CoV-2 infection persist for months. *Science.* 4 déc 2020;370(6521):1227-30.
324. Fafi-Kremer S, Bruel T, Madec Y, Grant R, Tondeur L, Grzelak L, et al. Serologic responses to SARS-CoV-2 infection among hospital staff with mild disease in eastern France. *EBioMedicine.* sept 2020;59:102915.
325. Stephens DS, McElrath MJ. COVID-19 and the Path to Immunity. *JAMA.* 6 oct 2020;324(13):1279-81.
326. Knies A, Ladage D, Braun RJ, Kimpel J, Schneider M. Persistence of humoral response upon SARS-CoV-2 infection. *Rev Med Virol.* 2022;32(2):e2272.
327. Arkhipova-Jenkins I, Helfand M, Armstrong C, Gean E, Anderson J, Paynter RA, et al. Antibody Response After SARS-CoV-2 Infection and Implications for Immunity : A Rapid Living Review. *Ann Intern Med.* juin 2021;174(6):811-21.
328. Turner JS, Kim W, Kalaidina E, Goss CW, Rauseo AM, Schmitz AJ, et al. SARS-CoV-2 infection induces long-lived bone marrow plasma cells in humans. *Nature.* juill 2021;595(7867):421-5.
329. Piccoli L, Park YJ, Tortorici MA, Czudnochowski N, Walls AC, Beltramello M, et al. Mapping Neutralizing and Immunodominant Sites on the SARS-CoV-2 Spike Receptor-Binding Domain by Structure-Guided High-Resolution Serology. *Cell.* 12 nov 2020;183(4):1024-1042.e21.
330. Klein SL, Pekosz A, Park HS, Ursin RL, Shapiro JR, Benner SE, et al. Sex, age, and hospitalization drive antibody responses in a COVID-19 convalescent plasma donor population. *J Clin Invest.* 2 nov 2020;130(11):6141-50.
331. Sasson JM, Campo JJ, Carpenter RM, Young MK, Randall AZ, Trappl-Kimmons K, et al. Diverse Humoral Immune Responses in Younger and Older Adult COVID-19 Patients. *mBio.* 12(3):e01229-21.
332. Grzelak L, Velay A, Madec Y, Gallais F, Staropoli I, Schmidt-Mutter C, et al. Sex Differences in the Evolution of Neutralizing Antibodies to Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. *J Infect Dis.* 17 sept 2021;224(6):983-8.
333. Lucas C, Klein J, Sundaram ME, Liu F, Wong P, Silva J, et al. Delayed production of neutralizing antibodies correlates with fatal COVID-19. *Nat Med.* juill 2021;27(7):1178-86.
334. Dispinseri S, Secchi M, Pirillo MF, Tolazzi M, Borghi M, Brigatti C, et al. Neutralizing antibody responses to SARS-CoV-2 in symptomatic COVID-19 is persistent and critical for survival. *Nat Commun.* 11 mai 2021;12(1):2670.
335. Moriyama S, Adachi Y, Sato T, Tonouchi K, Sun L, Fukushi S, et al. Temporal maturation of neutralizing antibodies in COVID-19 convalescent individuals improves potency and breadth to circulating SARS-CoV-2 variants. *Immunity.* 10 août 2021;54(8):1841-1852.e4.

336. Wang Z, Muecksch F, Schaefer-Babajew D, Finkin S, Viant C, Gaebler C, et al. Naturally enhanced neutralizing breadth against SARS-CoV-2 one year after infection. *Nature*. juill 2021;595(7867):426-31.
337. McCallum M, De Marco A, Lempp FA, Tortorici MA, Pinto D, Walls AC, et al. N-terminal domain antigenic mapping reveals a site of vulnerability for SARS-CoV-2. *Cell*. 29 avr 2021;184(9):2332-2347.e16.
338. Chi X, Yan R, Zhang J, Zhang G, Zhang Y, Hao M, et al. A neutralizing human antibody binds to the N-terminal domain of the Spike protein of SARS-CoV-2. *Science*. 7 août 2020;369(6504):650-5.
339. Atyeo C, Fischinger S, Zohar T, Slein MD, Burke J, Loos C, et al. Distinct Early Serological Signatures Track with SARS-CoV-2 Survival. *Immunity*. 15 sept 2020;53(3):524-532.e4.
340. Li D, Edwards RJ, Manne K, Martinez DR, Schäfer A, Alam SM, et al. In vitro and in vivo functions of SARS-CoV-2 infection-enhancing and neutralizing antibodies. *Cell*. 5 août 2021;184(16):4203-4219.e32.
341. Zhou Y, Liu Z, Li S, Xu W, Zhang Q, Silva IT, et al. Enhancement versus neutralization by SARS-CoV-2 antibodies from a convalescent donor associates with distinct epitopes on the RBD. *Cell Rep*. 2 févr 2021;34(5):108699.
342. Liu Y, Soh WT, Kishikawa J ichi, Hirose M, Nakayama EE, Li S, et al. An infectivity-enhancing site on the SARS-CoV-2 spike protein targeted by antibodies. *Cell*. 24 juin 2021;184(13):3452-3466.e18.
343. Shimizu J, Sasaki T, Yamanaka A, Ichihara Y, Koketsu R, Samune Y, et al. The potential of COVID-19 patients' sera to cause antibody-dependent enhancement of infection and IL-6 production. *Sci Rep*. 9 déc 2021;11(1):23713.
344. Ng KW, Faulkner N, Cornish GH, Rosa A, Harvey R, Hussain S, et al. Preexisting and de novo humoral immunity to SARS-CoV-2 in humans. *Science*. 11 déc 2020;370(6522):1339-43.
345. Galipeau Y, Siragam V, Laroche G, Marion E, Greig M, McGuinty M, et al. Relative Ratios of Human Seasonal Coronavirus Antibodies Predict the Efficiency of Cross-Neutralization of SARS-CoV-2 Spike Binding to ACE2. *eBioMedicine*. déc 2021;74:103700.
346. Poston D, Weisblum Y, Wise H, Templeton K, Jenks S, Hatzioannou T, et al. Absence of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Neutralizing Activity in Prepandemic Sera From Individuals With Recent Seasonal Coronavirus Infection. *Clin Infect Dis*. 1 sept 2021;73(5):e1208-11.
347. Selva KJ, van de Sandt CE, Lemke MM, Lee CY, Shoffner SK, Chua BY, et al. Systems serology detects functionally distinct coronavirus antibody features in children and elderly. *Nat Commun*. 1 avr 2021;12(1):2037.
348. Réponses rapides dans le cadre de la COVID-19 - Place du scanner thoracique. Haute Autorité de Santé; 2020 nov.
349. Kovács A, Palásti P, Veréb D, Bozsik B, Palkó A, Kincses ZT. The sensitivity and specificity of chest CT in the diagnosis of COVID-19. *Eur Radiol*. mai 2021;31(5):2819-24.
350. Khatami F, Saatchi M, Zadeh SST, Aghamir ZS, Shabestari AN, Reis LO, et al. A meta-analysis of accuracy and sensitivity of chest CT and RT-PCR in COVID-19 diagnosis. *Sci Rep*. 28 déc 2020;10(1):22402.
351. Butler-Laporte G, Lawandi A, Schiller I, Yao M, Dendukuri N, McDonald EG, et al. Comparison of Saliva and Nasopharyngeal Swab Nucleic Acid Amplification Testing for Detection of SARS-CoV-2. *JAMA Intern Med*. mars 2021;181(3):1-8.
352. Wyllie AL, Fournier J, Casanovas-Massana A, Campbell M, Tokuyama M, Vijayakumar P, et al. Saliva or Nasopharyngeal Swab Specimens for Detection of SARS-CoV-2. *N Engl J Med*. 24 sept 2020;383(13):1283-6.
353. Évaluation des tests antigéniques salivaires pour la détection du SARS-CoV-2. Haute Autorité de Santé; 2022 févr.
354. Avis n° 2020.0050/AC/SEAP du 24 septembre 2020 du collège de la Haute Autorité de santé relatif à l'inscription sur la liste des actes et prestations mentionnée à l'article L. 162-1-7 du code de la sécurité sociale, de la détection antigénique du virus SARS-CoV-2 sur prélèvement nasopharyngé. Haute Autorité de Santé; 2020 sept.
355. Quels sont les tests rapides de dépistage de la COVID-19 existants et comment fonctionnent-ils ? [Internet]. [cité 30 mars 2022]. Disponible sur: <https://www.science.lu/fr/tests-depistage-du-coronavirus/quels-sont-les-tests-rapides-depistage-covid-19-existants-comment-fonctionnent-ils>
356. Au WY, Cheung PPH. Diagnostic performances of common nucleic acid tests for SARS-CoV-2 in hospitals and clinics: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Microbe*. 1 déc 2021;2(12):e704-14.

357. Lee RA, Herigon JC, Benedetti A, Pollock NR, Denkinger CM. Performance of Saliva, Oropharyngeal Swabs, and Nasal Swabs for SARS-CoV-2 Molecular Detection: a Systematic Review and Meta-analysis. *J Clin Microbiol.* 20 avr 2021;59(5):e02881-20.
358. Tsang NNY, So HC, Ng KY, Cowling BJ, Leung GM, Ip DKM. Diagnostic performance of different sampling approaches for SARS-CoV-2 RT-PCR testing: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* sept 2021;21(9):1233-45.
359. Cevik M, Tate M, Lloyd O, Maraolo AE, Schafers J, Ho A. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV viral load dynamics, duration of viral shedding, and infectiousness: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Microbe.* janv 2021;2(1):e13-22.
360. Yan D, Zhang X, Chen C, Jiang D, Liu X, Zhou Y, et al. Characteristics of Viral Shedding Time in SARS-CoV-2 Infections: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Public Health.* 19 mars 2021;9:652842.
361. Wölfel R, Corman VM, Guggemos W, Seilmaier M, Zange S, Müller MA, et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature.* mai 2020;581(7809):465-9.
362. Protocol: Real-time RT-PCR assays for the detection of SARS-CoV-2 (Institut Pasteur, Paris). World Health Organization; 2020 févr.
363. RT-qPCR de détection SARS-CoV-2 / Protocole Institut Pasteur Paris v.2. CNR VIR de l'Institut Pasteur; 2021 avr.
364. Lefeuvre C, Przyrowski É, Apaire-Marchais V. Aspects virologiques et diagnostic du coronavirus Sars-CoV-2. *Actual Pharm.* oct 2020;59(599):18-23.
365. Avis du 25 septembre 2020 de la Société Française de Microbiologie (SFM) relatif à l'interprétation de la valeur de Ct (estimation de la charge virale) obtenue en cas de RT-PCR SARS-CoV-2 positive sur les prélèvements cliniques réalisés à des fins diagnostiques ou de dépistage. Société Française de Microbiologie; 2021 janv.
366. Velay A, Gallais F, Benotmane I, Wendling MJ, Danion F, Collange O, et al. Evaluation of the performance of SARS-CoV-2 serological tools and their positioning in COVID-19 diagnostic strategies. *Diagn Microbiol Infect Dis.* déc 2020;98(4):115181.
367. Kristiansen PA, Page M, Bernasconi V, Mattiuzzo G, Dull P, Makar K, et al. WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin. *Lancet Lond Engl.* 10 avr 2021;397(10282):1347-8.
368. Saker K, Escuret V, Pitiot V, Massardier-Pilonchéry A, Paul S, Mokdad B, et al. Evaluation of Commercial Anti-SARS-CoV-2 Antibody Assays and Comparison of Standardized Titers in Vaccinated Health Care Workers. *J Clin Microbiol.* 19 janv 2022;60(1):e0174621.
369. Update to living WHO guideline on drugs for covid-19. *BMJ.* 25 avr 2022;377:o1045.
370. Glenardi G, Christya F, Oetoro BJ, Mangkuliguna G, Natalia N. Comparison of high-flow nasal oxygen therapy and noninvasive ventilation in COVID-19 patients: a systematic review and meta-analysis. *Acute Crit Care.* févr 2022;37(1):71-83.
371. Bradbury CA, McQuilten Z. Anticoagulation in COVID-19. *The Lancet.* 1 janv 2022;399(10319):5-7.
372. RECOVERY Collaborative Group, Horby P, Lim WS, Emberson JR, Mafham M, Bell JL, et al. Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19. *N Engl J Med.* 25 févr 2021;384(8):693-704.
373. DGS-URGENT N°2022-03. Mise à jour des informations relatives à l'utilisation des anticorps monoclonaux et des autres traitements en lien avec l'évolution de l'épidémie de COVID-19 liée au SARS-CoV-2 : impact de la diffusion du variant Omicron. Direction Générale de la Santé; 2022 janv.
374. WHO Rapid Evidence Appraisal for COVID-19 Therapies (REACT) Working Group, Shankar-Hari M, Vale CL, Godolphin PJ, Fisher D, Higgins JPT, et al. Association Between Administration of IL-6 Antagonists and Mortality Among Patients Hospitalized for COVID-19: A Meta-analysis. *JAMA.* 10 août 2021;326(6):499-518.
375. Zeraatkar D, Cusano E, Martínez JPD, Qasim A, Mangala S, Kum E, et al. Use of tocilizumab and sarilumab alone or in combination with corticosteroids for covid-19: systematic review and network meta-analysis. *BMJ Med.* 1 mars 2022;1:e000036.
376. Ely EW, Ramanan AV, Kartman CE, de Bono S, Liao R, Piruzeli MLB, et al. Efficacy and safety of baricitinib plus standard of care for the treatment of critically ill hospitalised adults with COVID-19 on invasive mechanical ventilation or extracorporeal membrane oxygenation: an exploratory, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Respir Med.* 3 févr 2022;S2213-2600(22)00006-6.

377. Richardson P, Griffin I, Tucker C, Smith D, Oechsle O, Phelan A, et al. Baricitinib as potential treatment for 2019-nCoV acute respiratory disease. *Lancet Lond Engl.* 15 févr 2020;395(10223):e30-1.
378. Jayk Bernal A, Gomes da Silva MM, Musungaie DB, Kovalchuk E, Gonzalez A, Delos Reyes V, et al. Molnupiravir for Oral Treatment of Covid-19 in Nonhospitalized Patients. *N Engl J Med.* 10 févr 2022;386(6):509-20.
379. Mahase E. Covid-19: Pfizer's paxlovid is 89% effective in patients at risk of serious illness, company reports. *BMJ.* 8 nov 2021;375:n2713.
380. Covid-19 : accès précoce accordé au Paxlovid® en traitement curatif [Internet]. Haute Autorité de Santé. 2022 [cité 20 mars 2022]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/jcms/p_3311074/fr/covid-19-acces-precoce-accorde-au-paxlovid-en-traitement-curatif
381. Covid-19 : accès précoce accordé au Xevudy® en traitement curatif [Internet]. Haute Autorité de Santé. 2022 [cité 20 mars 2022]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/jcms/p_3308420/fr/covid-19-acces-precoce-accorde-au-xevudy-en-traitement-curatif
382. Takashita E, Kinoshita N, Yamayoshi S, Sakai-Tagawa Y, Fujisaki S, Ito M, et al. Efficacy of Antiviral Agents against the SARS-CoV-2 Omicron Subvariant BA.2. *N Engl J Med.* 14 avr 2022;386(15):1475-7.
383. Pollard AJ, Bijker EM. A guide to vaccinology: from basic principles to new developments. *Nat Rev Immunol.* févr 2021;21(2):83-100.
384. Université de Strasbourg. Savoir(s) n°43. nov 2021;
385. Joubert E, Kekeh A, Amin C. COVID-19 and novel mRNA vaccines in pregnancy: an updated literature review. *BJOG Int J Obstet Gynaecol.* janv 2022;129(1):21-8.
386. Le Vu S, Bertrand M, Jabagi MJ, Botton J, Drouin J, Baricault B, et al. Association entre les vaccins COVID-19 à ARN messenger et la survenue de myocardite et péricardite chez les personnes de 12 à 50 ans en France. EPI-PHARE - Groupement d'intérêt scientifique (GIS) ANSM-CNAM; 2021 nov.
387. Voysey M, Clemens SAC, Madhi SA, Weckx LY, Folegatti PM, Aley PK, et al. Single-dose administration and the influence of the timing of the booster dose on immunogenicity and efficacy of ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) vaccine: a pooled analysis of four randomised trials. *The Lancet.* 6 mars 2021;397(10277):881-91.
388. Covid-19 : la HAS recommande d'utiliser le vaccin d'AstraZeneca chez les 55 ans et plus [Internet]. Haute Autorité de Santé. 2021 [cité 21 mars 2022]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/jcms/p_3244305/fr/covid-19-la-has-recommande-d-utiliser-le-vaccin-d-astrazeneca-chez-les-55-ans-et-plus
389. Avis n° 2021.0027/AC/SEESP du 8 avril 2021 du collège de la Haute Autorité de santé concernant le type de vaccin à utiliser pour la seconde dose chez les personnes de moins de 55 ans ayant reçu une première dose du vaccin AstraZeneca (nouvellement appelé VAXZEVRIA) contre la covid-19. Haute Autorité de Santé; 2021 avr.
390. Avis n°2021.0048/AC/SEESP du 8 juillet 2021 du collège de la Haute Autorité de santé concernant l'élargissement de la cible vaccinale du vaccin Janssen aux personnes de moins de 55 ans pour les français de l'étranger et les personnes éloignées du système de santé en France, ainsi que l'efficacité du schéma de vaccination à une dose de ce vaccin. Haute Autorité de Santé; 2021 juill.
391. Recommandation : Stratégie de vaccination contre la Covid-19, Place du vaccin Covid-19 Janssen. Haute Autorité de Santé; 2021 mars.
392. Avis n° 2021.0061/AC/SEESP du 23 août 2021 du collège de la HAS relatif à la définition des populations à cibler par la campagne de rappel vaccinal chez les personnes ayant eu une primovaccination complète contre la Covid-19. Haute Autorité de Santé; 2021 août.
393. Avis n°2022.0014/AC/SESPEV du 17 février 2022 du collège de la Haute Autorité de santé relatif à la place du vaccin Janssen dans stratégie de vaccination contre la Covid-19. Haute Autorité de Santé; 2022 févr.
394. Botton J, Jabagi MJ, Bertrand M, Baricault B, Drouin J, Le Vu S, et al. Évaluation du risque d'infarctus du myocarde, d'accident vasculaire cérébral et d'embolie pulmonaire suite aux différents vaccins anti- COVID-19 chez les adultes de moins de 75 ans en France : rapport complet. EPI-PHARE - Groupement d'intérêt scientifique (GIS) ANSM-CNAM; 2022 janv.
395. Aspects immunologiques et virologiques de l'infection par le SARS-CoV-2. Haute Autorité de Santé; 2020 nov.

396. Stratégie de vaccination contre la Covid-19. Place du vaccin NUVAXOVID (NVX-CoV2373). Haute Autorité de Santé; 2022 janv.
397. DGS-URGENT N°2022-35. Mise à Disposition du Vaccin Nuvaxovid de Novavax. Direction Générale de la Santé; 2022 mars.
398. DGS-URGENT N°2021_99. Reconnaissance des schémas vaccinaux effectués avec un vaccin non reconnu par l'EMA et modalités d'obtention du passe sanitaire. Direction Générale de la Santé; 2021 sept.
399. COVID-19 vaccines WHO EUL issued [Internet]. WHO - Prequalification of Medical Products (IVDs, Medicines, Vaccines and Immunization Devices, Vector Control). 2021 [cité 30 mars 2022]. Disponible sur: <https://extranet.who.int/pqweb/vaccines/vaccinescovid-19-vaccine-eul-issued>
400. Background document on the Bharat Biotech BBV152 COVAXIN® vaccine against COVID-19. World Health Organization; 2021 nov.
401. Avis n° 2022.0004/AC/SESPEV du 13 janvier 2022 du collège de la Haute Autorité de santé relatif à la place du vaccin Janssen en seconde dose et en dose de rappel dans la stratégie de vaccination contre la Covid-19. Haute Autorité de Santé; 2022 janv.
402. Avis du 6 avril 2021 : Elargissement des priorités d'accès à la vaccination anti- Covid-19 - mise à jour du 7 mai 2021. Conseil d'Orientation de la Stratégie Vaccinale; 2021 mai.
403. Caillard S, Thauinat O, Benotmane I, Masset C, Blancho G. Antibody Response to a Fourth Messenger RNA COVID-19 Vaccine Dose in Kidney Transplant Recipients: A Case Series. *Ann Intern Med.* 11 janv 2022;L21-0598.
404. Efficacité comparée des vaccins de Pfizer (BNT162b2) et Moderna (mRNA-1273). Conseil d'Orientation de la Stratégie Vaccinale; 2021 sept.
405. DGS-Urgent N°2022_16. Vaccination contre la COVID-19 des personnes sévèrement immunodéprimées et de l'entourage des personnes à risque de forme grave de la maladie. Direction Générale de la Santé; 2022 janv.
406. Feng S, Phillips DJ, White T, Sayal H, Aley PK, Bibi S, et al. Correlates of protection against symptomatic and asymptomatic SARS-CoV-2 infection. *Nat Med.* nov 2021;27(11):2032-40.
407. Avis du 6 Janvier 2022 Ouverture d'une 2ème dose de rappel vaccinal aux personnes sévèrement immunodéprimées. Conseil d'Orientation de la Stratégie Vaccinale; 2022 janv.
408. VaccinTracker Covid19: nombre de français vaccinés [Internet]. CovidTracker. [cité 29 avr 2022]. Disponible sur: <https://covidtracker.fr/vaccintracker/>
409. Ritchie H, Mathieu E, Rodés-Guirao L, Appel C, Giattino C, Ortiz-Ospina E, et al. Coronavirus Pandemic (COVID-19) [Internet]. Our World in Data. 2020 [cité 30 mars 2022]. Disponible sur: <https://ourworldindata.org/covid-vaccinations>
410. Covid-19 : l'OMS mise sur un nouvel élan pour intensifier la vaccination en Afrique [Internet]. ONU Info. 2022 [cité 30 mars 2022]. Disponible sur: <https://news.un.org/fr/story/2022/02/1115032>
411. Tauzin A, Nayrac M, Benlarbi M, Gong SY, Gasser R, Beaudoin-Bussièrès G, et al. A single dose of the SARS-CoV-2 vaccine BNT162b2 elicits Fc-mediated antibody effector functions and T cell responses. *Cell Host Microbe.* 14 juill 2021;29(7):1137-1150.e6.
412. Nguyen THO, Cohen CA, Rowntree LC, Bull MB, Hachim A, Kedzierska K, et al. T Cells Targeting SARS-CoV-2: By Infection, Vaccination, and Against Future Variants. *Front Med.* 24 déc 2021;8:793102.
413. Tarke A, Coelho CH, Zhang Z, Dan JM, Yu ED, Methot N, et al. SARS-CoV-2 vaccination induces immunological T cell memory able to cross-recognize variants from Alpha to Omicron. *Cell.* 3 mars 2022;185(5):847-859.e11.
414. Liu J, Chandrashekar A, Sellers D, Barrett J, Jacob-Dolan C, Lifton M, et al. Vaccines elicit highly conserved cellular immunity to SARS-CoV-2 Omicron. *Nature.* mars 2022;603(7901):493-6.
415. Goel RR, Painter MM, Apostolidis SA, Mathew D, Meng W, Rosenfeld AM, et al. mRNA vaccines induce durable immune memory to SARS-CoV-2 and variants of concern. *Science.* 3 déc 2021;374(6572):abm0829.
416. Jackson LA, Anderson EJ, Roupheal NG, Roberts PC, Makhene M, Coler RN, et al. An mRNA Vaccine against SARS-CoV-2 — Preliminary Report. *N Engl J Med.* 12 nov 2020;383(20):1920-31.
417. Walsh EE, Frenck RW, Falsey AR, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, et al. Safety and Immunogenicity of Two RNA-Based Covid-19 Vaccine Candidates. *N Engl J Med.* 17 déc 2020;383(25):2439-50.

418. Shrotri M, Navaratnam AMD, Nguyen V, Byrne T, Geismar C, Fragaszy E, et al. Spike-antibody waning after second dose of BNT162b2 or ChAdOx1. *Lancet Lond Engl.* 31 juill 2021;398(10298):385-7.
419. Liu X, Shaw RH, Stuart ASV, Greenland M, Aley PK, Andrews NJ, et al. Safety and immunogenicity of heterologous versus homologous prime-boost schedules with an adenoviral vectored and mRNA COVID-19 vaccine (Com-COV): a single-blind, randomised, non-inferiority trial. *Lancet Lond Engl.* 4 sept 2021;398(10303):856-69.
420. Müller L, Andrée M, Moskorz W, Drexler I, Walotka L, Grothmann R, et al. Age-dependent Immune Response to the Biontech/Pfizer BNT162b2 Coronavirus Disease 2019 Vaccination. *Clin Infect Dis.* 6 déc 2021;73(11):2065-72.
421. Levin EG, Lustig Y, Cohen C, Fluss R, Indenbaum V, Amit S, et al. Waning Immune Humoral Response to BNT162b2 Covid-19 Vaccine over 6 Months. *N Engl J Med.* 9 déc 2021;385(24):e84.
422. Abu Jabal K, Ben-Amram H, Beiruti K, Batheesh Y, Sussan C, Zarka S, et al. Impact of age, ethnicity, sex and prior infection status on immunogenicity following a single dose of the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine: real-world evidence from healthcare workers, Israel, December 2020 to January 2021. *Euro Surveill.* févr 2021;26(6):2100096.
423. Thakkar A, Gonzalez-Lugo JD, Goradia N, Gali R, Shapiro LC, Pradhan K, et al. Seroconversion rates following COVID-19 vaccination among patients with cancer. *Cancer Cell.* 9 août 2021;39(8):1081-1090.e2.
424. Galmiche S, Luong Nguyen LB, Tartour E, de Lamballerie X, Wittkop L, Loubet P, et al. Immunological and clinical efficacy of COVID-19 vaccines in immunocompromised populations: a systematic review. *Clin Microbiol Infect.* févr 2022;28(2):163-77.
425. Turner JS, O'Halloran JA, Kalaidina E, Kim W, Schmitz AJ, Zhou JQ, et al. SARS-CoV-2 mRNA vaccines induce persistent human germinal centre responses. *Nature.* août 2021;596(7870):109-13.
426. Edara VV, Pinsky BA, Suthar MS, Lai L, Davis-Gardner ME, Floyd K, et al. Infection and Vaccine-Induced Neutralizing-Antibody Responses to the SARS-CoV-2 B.1.617 Variants. *N Engl J Med.* 12 août 2021;385(7):664-6.
427. Gruell H, Vanshylla K, Tober-Lau P, Hillus D, Schommers P, Lehmann C, et al. mRNA booster immunization elicits potent neutralizing serum activity against the SARS-CoV-2 Omicron variant. *Nat Med.* mars 2022;28(3):477-80.
428. Garcia-Beltran WF, St Denis KJ, Hoelzemer A, Lam EC, Nitido AD, Sheehan ML, et al. mRNA-based COVID-19 vaccine boosters induce neutralizing immunity against SARS-CoV-2 Omicron variant. *Cell.* 3 févr 2022;185(3):457-466.e4.
429. Pajon R, Doria-Rose NA, Shen X, Schmidt SD, O'Dell S, McDanal C, et al. SARS-CoV-2 Omicron Variant Neutralization after mRNA-1273 Booster Vaccination. *N Engl J Med.* 17 mars 2022;386(11):1088-91.
430. Arora P, Zhang L, Rocha C, Sidarovich A, Kempf A, Schulz S, et al. Comparable neutralisation evasion of SARS-CoV-2 omicron subvariants BA.1, BA.2, and BA.3. *Lancet Infect Dis.* 12 avr 2022;S1473-3099(22)00224-9.
431. Khoury DS, Cromer D, Reynaldi A, Schlub TE, Wheatley AK, Juno JA, et al. Neutralizing antibody levels are highly predictive of immune protection from symptomatic SARS-CoV-2 infection. *Nat Med.* juill 2021;27(7):1205-11.
432. Liu Q, Qin C, Liu M, Liu J. Effectiveness and safety of SARS-CoV-2 vaccine in real-world studies: a systematic review and meta-analysis. *Infect Dis Poverty.* 14 nov 2021;10(1):132.
433. Zheng C, Shao W, Chen X, Zhang B, Wang G, Zhang W. Real-world effectiveness of COVID-19 vaccines: a literature review and meta-analysis. *Int J Infect Dis.* janv 2022;114:252-60.
434. Covid-19 : adapter la stratégie de vaccination pour faire face au variant delta [Internet]. Haute Autorité de Santé. [cité 23 mars 2022]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/jcms/p_3276955/fr/covid-19-adapter-la-strategie-de-vaccination-pour-faire-face-au-variant-delta
435. Xie J, Feng S, Li X, Gea-Mallorquí E, Prats-Urbe A, Prieto-Alhambra D. Comparative effectiveness of the BNT162b2 and ChAdOx1 vaccines against Covid-19 in people over 50. *Nat Commun.* 21 mars 2022;13(1):1519.
436. Mahase E. Covid-19: Longer interval between Pfizer doses results in higher antibody levels, research finds. *BMJ.* 23 juill 2021;374:n1875.

437. Amirthalingam G, Bernal JL, Andrews NJ, Whitaker H, Gower C, Stowe J, et al. Serological responses and vaccine effectiveness for extended COVID-19 vaccine schedules in England. *Nat Commun.* 10 déc 2021;12(1):7217.
438. Collier DA, Ferreira IATM, Kotagiri P, Datir RP, Lim EY, Touizer E, et al. Age-related immune response heterogeneity to SARS-CoV-2 vaccine BNT162b2. *Nature.* août 2021;596(7872):417-22.
439. Tregoning JS, Flight KE, Higham SL, Wang Z, Pierce BF. Progress of the COVID-19 vaccine effort: viruses, vaccines and variants versus efficacy, effectiveness and escape. *Nat Rev Immunol.* oct 2021;21(10):626-36.
440. Interim analysis of COVID-19 vaccine effectiveness against Severe Acute Respiratory Infection due to laboratory-confirmed SARS-CoV-2 among individuals aged 30 years and older, ECDC multi-country study – second update. European Centre for Disease Prevention and Control; 2022 mars.
441. Feikin DR, Higdon MM, Abu-Raddad LJ, Andrews N, Araos R, Goldberg Y, et al. Duration of effectiveness of vaccines against SARS-CoV-2 infection and COVID-19 disease: results of a systematic review and meta-regression. *The Lancet.* 5 mars 2022;399(10328):924-44.
442. COVID-19 vaccine surveillance report, Week 17. UK Health Security Agency; 2022 avr.
443. Schwarzkopf S, Krawczyk A, Knop D, Klump H, Heinold A, Heinemann FM, et al. Cellular Immunity in COVID-19 Convalescents with PCR-Confirmed Infection but with Undetectable SARS-CoV-2–Specific IgG. *Emerg Infect Dis.* janv 2021;27(1):122-9.
444. Schulien I, Kemming J, Oberhardt V, Wild K, Seidel LM, Killmer S, et al. Characterization of pre-existing and induced SARS-CoV-2-specific CD8+ T cells. *Nat Med.* janv 2021;27(1):78-85.
445. Gorse GJ, Patel GB, Vitale JN, O'Connor TZ. Prevalence of Antibodies to Four Human Coronaviruses Is Lower in Nasal Secretions than in Serum. *Clin Vaccine Immunol.* déc 2010;17(12):1875-80.
446. Kundu R, Narean JS, Wang L, Fenn J, Pillay T, Fernandez ND, et al. Cross-reactive memory T cells associate with protection against SARS-CoV-2 infection in COVID-19 contacts. *Nat Commun.* 10 janv 2022;13(1):80.
447. Shomuradova AS, Vagida MS, Sheetikov SA, Zornikova KV, Kiryukhin D, Titov A, et al. SARS-CoV-2 Epitopes Are Recognized by a Public and Diverse Repertoire of Human T Cell Receptors. *Immunity.* 15 déc 2020;53(6):1245-1257.e5.
448. Ogbe A, Kronsteiner B, Skelly DT, Pace M, Brown A, Adland E, et al. T cell assays differentiate clinical and subclinical SARS-CoV-2 infections from cross-reactive antiviral responses. *Nat Commun.* 6 avr 2021;12(1):2055.
449. Rosati M, Terpos E, Ntanasis-Stathopoulos I, Agarwal M, Bear J, Burns R, et al. Sequential Analysis of Binding and Neutralizing Antibody in COVID-19 Convalescent Patients at 14 Months After SARS-CoV-2 Infection. *Front Immunol.* 26 nov 2021;12:793953.
450. Shi D, Weng T, Wu J, Dai C, Luo R, Chen K, et al. Dynamic Characteristic Analysis of Antibodies in Patients With COVID-19: A 13-Month Study. *Front Immunol.* 20 juill 2021;12:708184.
451. Yang Y, Yang M, Peng Y, Liang Y, Wei J, Xing L, et al. Longitudinal analysis of antibody dynamics in COVID-19 convalescents reveals neutralizing responses up to 16 months after infection. *Nat Microbiol.* mars 2022;7(3):423-33.
452. Li Y, Wang X, Shen XR, Geng R, Xie N, Han JF, et al. A 1-year longitudinal study on COVID-19 convalescents reveals persistence of anti-SARS-CoV-2 humoral and cellular immunity. *Emerg Microbes Infect.* 11(1):902-13.
453. Zhang J, Lin H, Ye B, Zhao M, Zhan J, Dong S, et al. One-year sustained cellular and humoral immunities of COVID-19 convalescents. *Clin Infect Dis.* 5 oct 2021;ciab884.
454. GeurtsvanKessel CH, Okba NMA, Igloi Z, Bogers S, Embregts CWE, Laksono BM, et al. An evaluation of COVID-19 serological assays informs future diagnostics and exposure assessment. *Nat Commun.* 6 juill 2020;11(1):3436.
455. Yan LN, Liu PP, Li XG, Zhou SJ, Li H, Wang ZY, et al. Neutralizing Antibodies and Cellular Immune Responses Against SARS-CoV-2 Sustained One and a Half Years After Natural Infection. *Front Microbiol.* 3 mars 2022;12:803031.
456. Alejo JL, Mitchell J, Chang A, Chiang TPY, Massie AB, Segev DL, et al. Prevalence and Durability of SARS-CoV-2 Antibodies Among Unvaccinated US Adults by History of COVID-19. *JAMA.* 15 mars 2022;327(11):1085-7.

457. Muecksch F, Weisblum Y, Barnes CO, Schmidt F, Schaefer-Babajew D, Wang Z, et al. Affinity maturation of SARS-CoV-2 neutralizing antibodies confers potency, breadth, and resilience to viral escape mutations. *Immunity*. 10 août 2021;54(8):1853-1868.e7.
458. Krutikov M, Palmer T, Tut G, Fuller C, Azmi B, Giddings R, et al. Prevalence and duration of detectable SARS-CoV-2 nucleocapsid antibodies in staff and residents of long-term care facilities over the first year of the pandemic (VIVALDI study): prospective cohort study in England. *Lancet Healthy Longev*. 1 janv 2022;3(1):e13-21.
459. Perez-Saez J, Zaballa ME, Yerly S, Andrey DO, Meyer B, Eckerle I, et al. Persistence of anti-SARS-CoV-2 antibodies: immunoassay heterogeneity and implications for serosurveillance. *Clin Microbiol Infect*. 1 nov 2021;27(11):1695.e7-1695.e12.
460. Hartley GE, Edwards ESJ, Aui PM, Varese N, Stojanovic S, McMahon J, et al. Rapid generation of durable B cell memory to SARS-CoV-2 spike and nucleocapsid proteins in COVID-19 and convalescence. *Sci Immunol*. 22 déc 2020;5(54):eabf8891.
461. Sokal A, Chappert P, Barba-Spaeth G, Roeser A, Fourati S, Azzaoui I, et al. Maturation and persistence of the anti-SARS-CoV-2 memory B cell response. *Cell*. 4 mars 2021;184(5):1201-1213.e14.
462. Sakharkar M, Rappazzo CG, Wieland-Alter WF, Hsieh CL, Wrapp D, Esterman ES, et al. Prolonged evolution of the human B cell response to SARS-CoV-2 infection. *Sci Immunol*. 23 févr 2021;6(56):eabg6916.
463. Goel RR, Apostolidis SA, Painter MM, Mathew D, Pattekar A, Kuthuru O, et al. Distinct antibody and memory B cell responses in SARS-CoV-2 naïve and recovered individuals after mRNA vaccination. *Sci Immunol*. 15 avr 2021;6(58):eabi6950.
464. Hall V, Foulkes S, Insalata F, Kirwan P, Saei A, Atti A, et al. Protection against SARS-CoV-2 after Covid-19 Vaccination and Previous Infection. *N Engl J Med*. 16 févr 2022;386(13):1207-20.
465. Wei J, Matthews PC, Stoesser N, Maddox T, Lorenzi L, Studley R, et al. Anti-spike antibody response to natural SARS-CoV-2 infection in the general population. *Nat Commun*. 29 oct 2021;12(1):6250.
466. Robbiani DF, Gaebler C, Muecksch F, Lorenzi JCC, Wang Z, Cho A, et al. Convergent antibody responses to SARS-CoV-2 in convalescent individuals. *Nature*. août 2020;584(7821):437-42.
467. Li C, Yu D, Wu X, Liang H, Zhou Z, Xie Y, et al. Twelve-month specific IgG response to SARS-CoV-2 receptor-binding domain among COVID-19 convalescent plasma donors in Wuhan. *Nat Commun*. 6 juill 2021;12(1):4144.
468. Takahashi T, Ellingson MK, Wong P, Israelow B, Lucas C, Klein J, et al. Sex differences in immune responses that underlie COVID-19 disease outcomes. *Nature*. déc 2020;588(7837):315-20.
469. Ray JG, Schull MJ, Vermeulen MJ, Park AL. Association Between ABO and Rh Blood Groups and SARS-CoV-2 Infection or Severe COVID-19 Illness. *Ann Intern Med*. 24 nov 2020;174(3):308-15.
470. Zietz M, Zucker J, Tatonetti NP. Associations between blood type and COVID-19 infection, intubation, and death. *Nat Commun*. 13 nov 2020;11(1):5761.
471. Kim Y, Latz CA, DeCarlo CS, Lee S, Png CYM, Kibrik P, et al. Relationship between blood type and outcomes following COVID-19 infection. *Semin Vasc Surg*. sept 2021;34(3):125-31.
472. Lau EH, Hui DS, Tsang OT, Chan WH, Kwan MY, Chiu SS, et al. Long-term persistence of SARS-CoV-2 neutralizing antibody responses after infection and estimates of the duration of protection. *EClinicalMedicine*. nov 2021;41:101174.
473. Long QX, Tang XJ, Shi QL, Li Q, Deng HJ, Yuan J, et al. Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. *Nat Med*. août 2020;26(8):1200-4.
474. Kojima N, Klausner JD. Protective immunity after recovery from SARS-CoV-2 infection. *Lancet Infect Dis*. 1 janv 2022;22(1):12-4.
475. Edridge AWD, Kaczorowska J, Hoste ACR, Bakker M, Klein M, Loens K, et al. Seasonal coronavirus protective immunity is short-lasting. *Nat Med*. nov 2020;26(11):1691-3.
476. Analyse des données disponibles sur les réinfections possibles par le SARS-CoV-2 à partir de la base de données SIDEP. Point au 17 février 2022. *Santé Publique France*; 2022 févr.
477. Nordström P, Ballin M, Nordström A. Risk of SARS-CoV-2 reinfection and COVID-19 hospitalisation in individuals with natural and hybrid immunity: a retrospective, total population cohort study in Sweden. *Lancet Infect Dis*. 31 mars 2022;S1473-3099(22):00143-8.

478. Cavanaugh AM, Spicer KB, Thoroughman D, Glick C, Winter K. Reduced Risk of Reinfection with SARS-CoV-2 After COVID-19 Vaccination - Kentucky, May-June 2021. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 13 août 2021;70(32):1081-3.
479. Fröberg J, Gillard J, Philipsen R, Lanke K, Rust J, van Tuijl D, et al. SARS-CoV-2 mucosal antibody development and persistence and their relation to viral load and COVID-19 symptoms. *Nat Commun.* 23 sept 2021;12(1):5621.
480. Hou H, Zhang Y, Tang G, Luo Y, Liu W, Cheng C, et al. Immunologic memory to SARS-CoV-2 in convalescent COVID-19 patients at 1 year postinfection. *J Allergy Clin Immunol.* 1 déc 2021;148(6):1481-1492.e2.
481. Marcotte H, Piralla A, Zuo F, Du L, Cassaniti I, Wan H, et al. Immunity to SARS-CoV-2 up to 15 months after infection. *iScience.* 7 janv 2022;25(2):103743.
482. Keller MD, Harris KM, Jensen-Wachspress MA, Kankate VV, Lang H, Lazarski CA, et al. SARS-CoV-2-specific T cells are rapidly expanded for therapeutic use and target conserved regions of the membrane protein. *Blood.* 17 déc 2020;136(25):2905-17.
483. Bar-On YM, Flamholz A, Phillips R, Milo R. SARS-CoV-2 (COVID-19) by the numbers. *eLife.* 2 avr 2020;9:e57309.
484. Buch MH, Smolen JS, Betteridge N, Breedveld FC, Burmester G, Dörner T, et al. Updated consensus statement on the use of rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* juin 2011;70(6):909-20.
485. Leandro MJ. B-cell subpopulations in humans and their differential susceptibility to depletion with anti-CD20 monoclonal antibodies. *Arthritis Res Ther.* 2013;15 Suppl 1:S3.
486. Baker D, MacDougall A, Kang AS, Schmierer K, Giovannoni G, Dobson R. Seroconversion following COVID-19 vaccination: Can we optimize protective response in CD20-treated individuals? *Clin Exp Immunol.* 18 nov 2021;uxab015.
487. van Kempen ZLE, Strijbis EMM, Al MMCT, Steenhuis M, Uitdehaag BMJ, Rispens T, et al. SARS-CoV-2 Antibodies in Adult Patients With Multiple Sclerosis in the Amsterdam MS Cohort. *JAMA Neurol.* 1 juill 2021;78(7):880-2.
488. Zabalza A, Cárdenas-Robledo S, Tagliani P, Arrambide G, Otero-Romero S, Carbonell-Mirabent P, et al. COVID-19 in multiple sclerosis patients: susceptibility, severity risk factors and serological response. *Eur J Neurol.* 2021;28(10):3384-95.
489. Bigaut K, Kremer L, Fleury M, Lanotte L, Collongues N, de Seze J. Impact of disease-modifying treatments on humoral response after COVID-19 vaccination: A mirror of the response after SARS-CoV-2 infection. *Rev Neurol (Paris).* déc 2021;177(10):1237-40.
490. Sormani MP, Schiavetti I, Landi D, Carmisciano L, De Rossi N, Cordioli C, et al. SARS-CoV-2 serology after COVID-19 in multiple sclerosis: An international cohort study. *Mult Scler.* 30 juill 2021;13524585211035318.
491. Tallantyre EC, Vickaryous N, Anderson V, Asardag AN, Baker D, Bestwick J, et al. COVID-19 Vaccine Response in People with Multiple Sclerosis. *Ann Neurol.* janv 2022;91(1):89-100.
492. Gadani SP, Reyes-Mantilla M, Jank L, Harris S, Douglas M, Smith MD, et al. Discordant humoral and T cell immune responses to SARS-CoV-2 vaccination in people with multiple sclerosis on anti-CD20 therapy. *EBioMedicine.* nov 2021;73:103636.
493. Moor MB, Suter-Riniker F, Horn MP, Aeberli D, Amsler J, Möller B, et al. Humoral and cellular responses to mRNA vaccines against SARS-CoV-2 in patients with a history of CD20 B-cell-depleting therapy (RituxiVac): an investigator-initiated, single-centre, open-label study. *Lancet Rheumatol.* 1 nov 2021;3(11):e789-97.
494. Mrak D, Tobudic S, Koblichke M, Graninger M, Radner H, Sieghart D, et al. SARS-CoV-2 vaccination in rituximab-treated patients: B cells promote humoral immune responses in the presence of T-cell-mediated immunity. *Ann Rheum Dis.* oct 2021;80(10):1345-50.
495. Apostolidis SA, Kakara M, Painter MM, Goel RR, Mathew D, Lenzi K, et al. Cellular and humoral immune responses following SARS-CoV-2 mRNA vaccination in patients with multiple sclerosis on anti-CD20 therapy. *Nat Med.* nov 2021;27(11):1990-2001.
496. Sormani MP, Inglese M, Schiavetti I, Carmisciano L, Laroni A, Lapucci C, et al. Effect of SARS-CoV-2 mRNA vaccination in MS patients treated with disease modifying therapies. *EBioMedicine.* oct 2021;72:103581.

497. Felten R, Duret PM, Bauer E, Sedmak N, Djossou JH, Bensalem M, et al. B-cell targeted therapy is associated with severe COVID-19 among patients with inflammatory arthritides: a 1-year multicentre study in 1116 successive patients receiving intravenous biologics. *Ann Rheum Dis*. 1 janv 2022;81(1):143-5.
498. Salter A, Fox RJ, Newsome SD, Halper J, Li DKB, Kanellis P, et al. Outcomes and Risk Factors Associated With SARS-CoV-2 Infection in a North American Registry of Patients With Multiple Sclerosis. *JAMA Neurol*. juin 2021;78(6):1-10.
499. Sormani MP, Salvetti M, Labauge P, Schiavetti I, Zephir H, Carmisciano L, et al. DMTs and Covid-19 severity in MS: a pooled analysis from Italy and France. *Ann Clin Transl Neurol*. 7 juill 2021;8(8):1738-44.
500. Langer-Gould A, Smith JB, Li BH, KPSC MS Specialist Group. Multiple sclerosis, rituximab, and COVID-19. *Ann Clin Transl Neurol*. avr 2021;8(4):938-43.
501. Simpson-Yap S, De Brouwer E, Kalincik T, Rijke N, Hillert JA, Walton C, et al. Associations of Disease-Modifying Therapies With COVID-19 Severity in Multiple Sclerosis. *Neurology*. 9 nov 2021;97(19):e1870-85.
502. Schietzel S, Anderegg M, Limacher A, Born A, Horn MP, Maurer B, et al. Humoral and cellular immune responses on SARS-CoV-2 vaccines in patients with anti-CD20 therapies: a systematic review and meta-analysis of 1342 patients. *RMD Open*. févr 2022;8(1):e002036.
503. Jyssum I, Kared H, Tran TT, Tveter AT, Provan SA, Sexton J, et al. Humoral and cellular immune responses to two and three doses of SARS-CoV-2 vaccines in rituximab-treated patients with rheumatoid arthritis: a prospective, cohort study. *Lancet Rheumatol*. mars 2022;4(3):e177-87.
504. Furer V, Eviatar T, Zisman D, Peleg H, Paran D, Levartovsky D, et al. Immunogenicity and safety of the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine in adult patients with autoimmune inflammatory rheumatic diseases and in the general population: a multicentre study. *Ann Rheum Dis*. oct 2021;80(10):1330-8.
505. Hadjadj J, Planas D, Ouedrani A, Buffier S, Delage L, Nguyen Y, et al. Immunogenicity of BNT162b2 vaccine against the Alpha and Delta variants in immunocompromised patients with systemic inflammatory diseases. *Ann Rheum Dis*. mai 2022;81(5):720-8.
506. Simon D, Tascilar K, Fagni F, Schmidt K, Krönke G, Kleyer A, et al. Efficacy and safety of SARS-CoV-2 revaccination in non-responders with immune-mediated inflammatory disease. *Ann Rheum Dis*. 24 nov 2021;annrheumdis-2021-221554.
507. Jyssum I, Kared H, Tran TT, Tveter AT, Provan SA, Sexton J, et al. Humoral and cellular immune responses to two and three doses of SARS-CoV-2 vaccines in rituximab-treated patients with rheumatoid arthritis: a prospective, cohort study. *Lancet Rheumatol*. mars 2022;4(3):e177-87.
508. Bonelli M, Mrak D, Tobudic S, Sieghart D, Koblichke M, Mandl P, et al. Additional heterologous versus homologous booster vaccination in immunosuppressed patients without SARS-CoV-2 antibody seroconversion after primary mRNA vaccination: a randomised controlled trial. *Ann Rheum Dis*. mai 2022;81(5):687-94.
509. Bange EM, Han NA, Wileyto P, Kim JY, Gouma S, Robinson J, et al. CD8+ T cells contribute to survival in patients with COVID-19 and hematologic cancer. *Nat Med*. juill 2021;27(7):1280-9.
510. Mohanka MR, Mahan LD, Joerns J, Lawrence A, Bollineni S, Kaza V, et al. Clinical characteristics, management practices, and outcomes among lung transplant patients with COVID-19. *J Heart Lung Transplant*. sept 2021;40(9):936-47.
511. Messika J, Eloy P, Roux A, Hirschi S, Nieves A, Le Pavec J, et al. COVID-19 in Lung Transplant Recipients. *Transplantation*. 1 janv 2021;105(1):177-86.
512. De Vlaminck I, Khush KK, Strehl C, Kohli B, Luikart H, Neff NF, et al. Temporal Response of the Human Virome to Immunosuppression and Antiviral Therapy. *Cell*. 21 nov 2013;155(5):1178-87.
513. Haloschan M, Bettesch R, Görzer I, Weseslindtner L, Kundi M, Puchhammer-Stöckl E. TTV DNA plasma load and its association with age, gender, and HCMV IgG serostatus in healthy adults. *Age*. oct 2014;36(5):9716.
514. Kulifaj D, Durgueil-Larivière B, Meynier F, Munteanu E, Pichon N, Dubé M, et al. Development of a standardized real time PCR for Torque teno viruses (TTV) viral load detection and quantification: A new tool for immune monitoring. *J Clin Virol*. août 2018;105:118-27.
515. Kamar N, Abravanel F, Marion O, Couat C, Izopet J, Del Bello A. Three Doses of an mRNA Covid-19 Vaccine in Solid-Organ Transplant Recipients. *N Engl J Med*. 12 août 2021;385(7):661-2.

516. Benotmane I, Gautier G, Perrin P, Olagne J, Cognard N, Fafi-Kremer S, et al. Antibody Response After a Third Dose of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine in Kidney Transplant Recipients With Minimal Serologic Response to 2 Doses. *JAMA*. 21 sept 2021;326(11):1063-5.
517. Peled Y, Ram E, Lavee J, Segev A, Matezki S, Wieder-Finesod A, et al. Third dose of the BNT162b2 vaccine in heart transplant recipients: Immunogenicity and clinical experience. *J Heart Lung Transplant*. 28 août 2021;41(2):148-57.
518. Kumar D, Hu Q, Samson R, Ferreira VH, Hall VG, Ierullo M, et al. Neutralization against Omicron variant in transplant recipients after three doses of mRNA vaccine. *Am J Transplant*. 10 mars 2022;
519. Charmetant X, Espi M, Benotmane I, Barateau V, Heibel F, Buron F, et al. Infection or a third dose of mRNA vaccine elicit neutralizing antibody responses against SARS-CoV-2 in kidney transplant recipients. *Sci Transl Med*. 16 mars 2022;14(636):eabl6141.
520. Thieme CJ, Anft M, Paniskaki K, Blazquez-Navarro A, Doevelaar A, Seibert FS, et al. The Magnitude and Functionality of SARS-CoV-2 Reactive Cellular and Humoral Immunity in Transplant Population Is Similar to the General Population Despite Immunosuppression. *Transplantation*. 1 oct 2021;105(10):2156-64.
521. Favà A, Donadeu L, Sabé N, Pernin V, González-Costello J, Lladó L, et al. SARS-CoV-2-specific serological and functional T cell immune responses during acute and early COVID-19 convalescence in solid organ transplant patients. *Am J Transplant*. août 2021;21(8):2749-61.
522. Benotmane I, Gautier-Vargas G, Gallais F, Gantner P, Cognard N, Olagne J, et al. Strong antibody response after a first dose of a SARS-CoV-2 mRNA-based vaccine in kidney transplant recipients with a previous history of COVID-19. *Am J Transplant*. nov 2021;21(11):3808-10.
523. Narasimhan M, Mahimainathan L, Clark AE, Usmani A, Cao J, Araj E, et al. Serological Response in Lung Transplant Recipients after Two Doses of SARS-CoV-2 mRNA Vaccines. *Vaccines*. 30 juin 2021;9(7):708.
524. Boyarsky BJ, Werbel WA, Avery RK, Tobian AAR, Massie AB, Segev DL, et al. Antibody Response to 2-Dose SARS-CoV-2 mRNA Vaccine Series in Solid Organ Transplant Recipients. *JAMA*. 1 juin 2021;325(21):2204-6.
525. Stumpf J, Siepmann T, Lindner T, Karger C, Schwöbel J, Anders L, et al. Humoral and cellular immunity to SARS-CoV-2 vaccination in renal transplant versus dialysis patients: A prospective, multicenter observational study using mRNA-1273 or BNT162b2 mRNA vaccine. *Lancet Reg Health Eur*. oct 2021;9:100178.
526. Garcia P, Anand S, Han J, Montez-Rath ME, Sun S, Shang T, et al. COVID-19 Vaccine Type and Humoral Immune Response in Patients Receiving Dialysis. *J Am Soc Nephrol*. janv 2022;33(1):33-7.
527. Greenberger LM, Saltzman LA, Senefeld JW, Johnson PW, DeGennaro LJ, Nichols GL. Antibody response to SARS-CoV-2 vaccines in patients with hematologic malignancies. *Cancer Cell*. 9 août 2021;39(8):1031-3.
528. Kaiser RA, Haller MC, Apfalter P, Kerschner H, Cejka D. Comparison of BNT162b2 (Pfizer-BioNtech) and mRNA-1273 (Moderna) SARS-CoV-2 mRNA vaccine immunogenicity in dialysis patients. *Kidney Int*. sept 2021;100(3):697-8.
529. Strauss AT, Hallett AM, Boyarsky BJ, Ou MT, Werbel WA, Avery RK, et al. Antibody Response to Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus-2 Messenger RNA Vaccines in Liver Transplant Recipients. *Liver Transpl*. déc 2021;27(12):1852-6.
530. Kaplonek P, Cizmeci D, Fischinger S, Collier AR, Suscovich T, Linde C, et al. mRNA-1273 and BNT162b2 COVID-19 vaccines elicit antibodies with differences in Fc-mediated effector functions. *Sci Transl Med*. 29 mars 2022;eabm2311.
531. Meunier L, Sanavio M, Dumortier J, Meszaros M, Faure S, Ursic Bedoya J, et al. Mycophenolate mofetil decreases humoral responses to three doses of SARS-CoV-2 vaccine in liver transplant recipients. *Liver Int*. 26 mars 2022;
532. Hallett AM, Greenberg RS, Boyarsky BJ, Shah PD, Ou MT, Teles AT, et al. SARS-CoV-2 messenger RNA vaccine antibody response and reactogenicity in heart and lung transplant recipients. *J Heart Lung Transplant*. déc 2021;40(12):1579-88.
533. Shostak Y, Shafran N, Heching M, Rosengarten D, Shtraichman O, Shitenberg D, et al. Early humoral response among lung transplant recipients vaccinated with BNT162b2 vaccine. *Lancet Respir Med*. juin 2021;9(6):e52-3.

534. Görzer I, Jaksch P, Strassl R, Klepetko W, Puchhammer-Stöckl E. Association between plasma Torque teno virus level and chronic lung allograft dysfunction after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant.* mars 2017;36(3):366-8.
535. Görzer I, Haloschan M, Jaksch P, Klepetko W, Puchhammer-Stöckl E. Plasma DNA levels of Torque teno virus and immunosuppression after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant.* mars 2014;33(3):320-3.
536. Hoek RA, Verschuuren EA, de Vries RD, Vonk JM, van Baarle D, van der Heiden M, et al. High Torque tenovirus (TTV) load before first vaccine dose is associated with poor serological response to COVID-19 vaccination in lung transplant recipients. *J Heart Lung Transplant.* 16 mars 2022;
537. Rovida F, Cassaniti I, Paolucci S, Percivalle E, Sarasini A, Piralla A, et al. SARS-CoV-2 vaccine breakthrough infections with the alpha variant are asymptomatic or mildly symptomatic among health care workers. *Nat Commun.* 15 oct 2021;12(1):6032.
538. Brosh-Nissimov T, Orenbuch-Harroch E, Chowers M, Elbaz M, Nesher L, Stein M, et al. BNT162b2 vaccine breakthrough: clinical characteristics of 152 fully vaccinated hospitalized COVID-19 patients in Israel. *Clin Microbiol Infect.* nov 2021;27(11):1652-7.
539. Martinot M, Carnein S, Kempf C, Gantner P, Gallais F, Fafi-Kremer S. Outbreak of SARS-CoV-2 infection in a long-term care facility after COVID-19 BNT162b2 mRNA vaccination. *Clin Microbiol Infect.* oct 2021;27(10):1537-9.
540. Lipsitch M, Krammer F, Regev-Yochay G, Lustig Y, Balicer RD. SARS-CoV-2 breakthrough infections in vaccinated individuals: measurement, causes and impact. *Nat Rev Immunol.* janv 2022;22(1):57-65.
541. Terreri S, Piano Mortari E, Vinci MR, Russo C, Alteri C, Albano C, et al. Persistent B cell memory after SARS-CoV-2 vaccination is functional during breakthrough infections. *Cell Host Microbe.* 9 mars 2022;30(3):400-408.e4.
542. Malavazos AE, Basilico S, Iacobellis G, Milani V, Cardani R, Boniardi F, et al. Antibody responses to BNT162b2 mRNA vaccine: Infection-naïve individuals with abdominal obesity warrant attention. *Obesity.* mars 2022;30(3):606-13.
543. Kipshidze N, Kipshidze N, Fried M. COVID-19 Vaccines: Special Considerations for the Obese Population. *Obes Surg.* 8 avr 2021;31(8):3854-6.
544. Pellini R, Venuti A, Pimpinelli F, Abril E, Blandino G, Campo F, et al. Early Onset of SARS-COV-2 Antibodies after First Dose of BNT162b2: Correlation with Age, Gender and BMI. *Vaccines.* 22 juin 2021;9(7):685.
545. McEwen AE, Cohen S, Bryson-Cahn C, Liu C, Pergam SA, Lynch J, et al. Variants of Concern Are Overrepresented Among Postvaccination Breakthrough Infections of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in Washington State. *Clin Infect Dis.* 15 mars 2022;74(6):1089-92.
546. Kustin T, Harel N, Finkel U, Perchik S, Harari S, Tahor M, et al. Evidence for increased breakthrough rates of SARS-CoV-2 variants of concern in BNT162b2-mRNA-vaccinated individuals. *Nat Med.* 14 juin 2021;27:1379-84.
547. Abu-Raddad LJ, Chemaitelly H, Butt AA. Effectiveness of the BNT162b2 Covid-19 Vaccine against the B.1.1.7 and B.1.351 Variants. *N Engl J Med.* 8 juill 2021;385(2):187-9.
548. Schieffelin JS, Norton EB, Kolls JK. What should define a SARS-CoV-2 “breakthrough” infection? *J Clin Invest.* 15 juin 2021;131(12):e151186.
549. Allie SR, Bradley JE, Mudunuru U, Schultz MD, Graf BA, Lund FE, et al. The establishment of resident memory B cells in the lung requires local antigen encounter. *Nat Immunol.* janv 2019;20(1):97-108.
550. Azzi L, Dalla Gasperina D, Veronesi G, Shallak M, Ietto G, Iovino D, et al. Mucosal immune response in BNT162b2 COVID-19 vaccine recipients. *EBioMedicine.* janv 2022;75:103788.
551. Bergwerk M, Gonen T, Lustig Y, Amit S, Lipsitch M, Cohen C, et al. Covid-19 Breakthrough Infections in Vaccinated Health Care Workers. *N Engl J Med.* 14 oct 2021;385(16):1474-84.
552. Kuhlmann C, Mayer CK, Claassen M, Maponga T, Burgers WA, Keeton R, et al. Breakthrough infections with SARS-CoV-2 omicron despite mRNA vaccine booster dose. *The Lancet.* 12 févr 2022;399(10325):625-6.
553. Barda N, Dagan N, Cohen C, Hernán MA, Lipsitch M, Kohane IS, et al. Effectiveness of a third dose of the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine for preventing severe outcomes in Israel: an observational study. *The Lancet.* 4 déc 2021;398(10316):2093-100.

Annexes

Liste des autres publications en lien avec la pandémie de COVID-19

1. Velay A, **Gallais F**, Benotmane I, Wendling MJ, Danion F, Collange O, De Sèze J, Schmidt-Mutter C, Schneider F, Bilbault P, Meziani F, Fafi-Kremer S. Evaluation of the performance of SARS-CoV-2 serological tools and their positioning in COVID-19 diagnostic strategies. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2020 Dec;98(4):115181.
2. Renaud-Picard B, **Gallais F**, Riou M, Chatron E, Degot T, Freudenberger S, Porzio M, Schuller A, Stauder J, Hirschi S, Kessler R. The social and clinical impact of the COVID-19 epidemic on the Strasbourg lung transplant cohort: A single-center retrospective cohort study. *Clin Transplant*. 2020 Dec;34(12):e14119.
3. Renaud-Picard B, **Gallais F**, Ohana M, Zeyons F, Kretz B, Andre J, Sattler L, Hirschi S, Kessler R. Bilateral Acute Cardioembolic Limb Ischemia After Coronavirus Disease 2019 Pneumonia in a Lung Transplant Recipient: A Case Report. *Transplant Proc*. 2020 Nov;52(9):2715-2718.
4. Renaud-Picard B, **Gallais F**, Riou M, Zouzou A, Porzio M, Kessler R. Delayed pulmonary abscess following COVID-19 pneumonia: A case report. *Respir Med Res*. 2020 Nov;78:100776.
5. Velay A, **Gallais F**, Wendling MJ, Bayer S, Reix N, Schneider A, Glady L, Collongues N, Lessinger JM, Hansmann Y, Kling-Pillitteri L, De Sèze J, Gonzalez M, Schmidt-Mutter C, Meyer N, Fafi-Kremer S. COVID-19 exposure in SARS-CoV-2-seropositive hospital staff members during the first pandemic wave at Strasbourg University Hospital, France. *Infect Dis Now*. 2022 Feb;52(1):23-30.
6. Martinot M, Carnein S, Kempf C, Gantner P, **Gallais F**, Fafi-Kremer S. Outbreak of SARS-CoV-2 infection in a long-term care facility after COVID-19 BNT162b2 mRNA vaccination. *Clin Microbiol Infect*. 2021 Oct;27(10):1537-1539.
7. Grzelak L, Velay A, Madec Y, **Gallais F**, Staropoli I, Schmidt-Mutter C, Wendling MJ, Meyer N, Planchais C, Rey D, Mouquet H, Reix N, Glady L, Hansmann Y, Bruel T, De Sèze J, Fontanet A, Gonzalez M, Schwartz O, Fafi-Kremer S. Sex Differences in the Evolution of Neutralizing Antibodies to Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. *J Infect Dis*. 2021 Sep 17;224(6):983-988.
8. Scherlinger M, Felten R, **Gallais F**, Nazon C, Chatelus E, Pijnenburg L, Mengin A, Gras A, Vidailhet P, Arnould-Michel R, Bibi-Triki S, Carapito R, Trouillet-Assant S, Perret M, Belot A, Bahram S, Arnaud L, Gottenberg JE, Fafi-Kremer S, Sibilia J. Refining "Long-COVID" by a Prospective Multimodal Evaluation of Patients with Long-Term Symptoms Attributed to SARS-CoV-2 Infection. *Infect Dis Ther*. 2021 Sep;10(3):1747-1763.
9. Benotmane I, Gautier-Vargas G, **Gallais F**, Gantner P, Cognard N, Olagne J, Velay A, Heibel F, Braun-Parvez L, Martzloff J, Perrin P, Moulin B, Fafi-Kremer S, Caillard S. Strong antibody response after a first dose of a SARS-CoV-2 mRNA-based vaccine in kidney transplant recipients with a previous history of COVID-19. *Am J Transplant*. 2021 Nov;21(11):3808-3810.
10. Benotmane I, Gautier-Vargas G, Wendling MJ, Perrin P, Velay A, Bassand X, Bedo D, Baldacini C, Sagnard M, Bozman DF, Della-Chiesa M, Solis M, **Gallais F**, Cognard N, Olagne J, Delagrèverie H, Gontard L, Panaget B, Marx D, Heibel F, Braun-Parvez L, Moulin B, Caillard S, Fafi-Kremer S. In-depth virological assessment of kidney transplant recipients with COVID-19. *Am J Transplant*. 2020 Nov;20(11):3162-3172.

11. Charmetant X, Espi M, Benotmane I, Barateau V, Heibel F, Buron F, Gautier-Vargas G, Delafosse M, Perrin P, Koenig A, Cognard N, Levi C, **Gallais F**, Manière L, Rossolillo P, Soulier E, Pierre F, Ovize A, Morelon E, Defrance T, Fafi-Kremer S, Caillard S, Thaunat O. Infection or a third dose of mRNA vaccine elicit neutralizing antibody responses against SARS-CoV-2 in kidney transplant recipients. *Sci Transl Med*. 2022 Feb 1:eabl6141.
12. Planas D, Veyer D, Baidaliuk A, Staropoli I, Guivel-Benhassine F, Rajah MM, Planchais C, Porrot F, Robillard N, Puech J, Prot M, **Gallais F**, Gantner P, Velay A, Le Guen J, Kassis-Chikhani N, Edriss D, Belec L, Seve A, Courtellemont L, Péré H, Hocqueloux L, Fafi-Kremer S, Prazuck T, Mouquet H, Bruel T, Simon-Lorière E, Rey FA, Schwartz O. Reduced sensitivity of SARS-CoV-2 variant Delta to antibody neutralization. *Nature*. 2021 Aug;596(7871):276-280.
13. Panaget B, Velay A, Gontard L, Severac F, Meyer M, Antoni E, Kaltenbach G, Kling-Pillitteri L, Sammour Y, Hansmann Y, Hernandez C, Lavigne T, Lessinger JM, Gonzalez M, Wendling MJ, **Gallais F**, Kepka SG, Fafi-Kremer S. High severe acute respiratory coronavirus virus 2 (SARS-CoV-2) seroconversion rate among geriatric staff from Strasbourg University Hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2021 Sep 6:1-2.
14. Kaeuffer C, Le Hyaric C, Fabacher T, Mootien J, Dervieux B, Ruch Y, Hugerot A, Zhu YJ, Pointurier V, Clere-Jehl R, Greigert V, Kassegne L, Lefebvre N, **Gallais F**; Covid Alsace Study Group, Meyer N, Hansmann Y, Hirschberger O, Danion F; COVID Alsace Study Group. Clinical characteristics and risk factors associated with severe COVID-19: prospective analysis of 1,045 hospitalised cases in North-Eastern France, March 2020. *Euro Surveill*. 2020 Dec;25(48):2000895.



Contents lists available at ScienceDirect

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease

journal homepage: www.elsevier.com/locate/diagmicrobio

Evaluation of the performance of SARS-CoV-2 serological tools and their positioning in COVID-19 diagnostic strategies



Aurelie Velay^{a,b}, Floriane Gallais^{a,b}, Ilies Benotmane^{a,b}, Marie Josée Wendling^a, François Danion^c, Olivier Collange^d, Jérôme De Sèze^e, Catherine Schmidt-Mutter^e, Francis Schneider^f, Pascal Bilbault^g, Ferhat Meziani^{h,i}, Samira Fafi-Kremer^{a,b,*}

^a Laboratoire de Virologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

^b INSERM, UMR_S1109, LabEx TRANSPLANTEX, Centre de Recherche d'Immunologie et d'Hématologie, Faculté de Médecine, Fédération Hospitalo-Universitaire (FHU) OMICARE, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Université de Strasbourg, Strasbourg, France

^c Service des Maladies Infectieuses et Tropicales, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

^d Département d'Anesthésie et Réanimation Chirurgicale, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

^e Centre d'Investigation Clinique INSERM CIC-1434, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

^f Département de Médecine Intensive-Réanimation, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

^g Département des Urgences Médicales, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

^h Service de Médecine Intensive-Réanimation, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

ⁱ INSERM, UMR 1260, Regenerative Nanomedicine (RNLM), FMTS, Strasbourg, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 June 2020

Received in revised form 14 August 2020

Accepted 16 August 2020

Available online 21 August 2020

Keywords:

COVID-19

SARS-CoV-2

Serological diagnosis

Humoral response

ABSTRACT

Rapid and accurate diagnosis is crucial for successful outbreak containment. During the current coronavirus disease 2019 (COVID-19) public health emergency, the gold standard for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infection diagnosis is the detection of viral RNA. Additional diagnostic methods enabling the detection of current or past SARS-CoV-2 infection would be highly beneficial. We assessed 2 immunochromatographic lateral flow assays (LFA-1, LFA-2) and 2 enzyme-linked immunosorbent assay kits (IgA/IgG ELISA-1, IgM/IgG ELISA-2) using 325 samples: serum samples from polymerase chain reaction-confirmed COVID-19 hospitalized patients ($n = 55$) and healthcare workers ($n = 143$) and 127 samples from negative controls. Diagnostic performances were assessed according to days after symptom onset (dso) and the antigenic format used by manufacturers. Clinical sensitivities varied greatly among the assays, showing poor mutual agreement. After 15 dso, ELISA-1 (Euroimmun) and LFA-1 (Biosynex) combining IgM and IgG detection showed the best performances. A thorough selection of serological assays for the detection of ongoing or past infections is advisable.

© 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

A novel coronavirus named severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) causing coronavirus disease 2019 (COVID-19) has emerged as a major healthcare threat (World Health Organization (WHO), n.d.. Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases). At the beginning of the pandemic, the main healthcare objective was to stop the spread of the virus. A key aspect to achieve this goal was to ensure early and accurate infection diagnosis and appropriate quarantine for infected people. The gold standard for identifying SARS-CoV-2 infection relies on the detection of viral RNA by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)-based techniques. However, the large-scale routine

implementation of this approach has been hampered by its time-consuming nature (most often 4–6 h) and shortages of materials. Moreover, the presence of sufficient amounts of the viral genome at the site of sample collection is a prerequisite to allow genome detection. Missing the time window of active viral replication or low-quality sampling can lead to false-negative results, which would allow infected patients to spread the virus to their relatives and working environment. In such conditions, additional diagnostic methods would be highly beneficial to ensure timely diagnosis of all infected and recovered patients. Combining RT-PCR with the screening of the onset and strength of the humoral response against SARS-CoV-2 could enhance diagnostic sensitivity and accuracy. There are now several studies describing the kinetics of anti-SARS-CoV-2 IgM and IgG detection using laboratory enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) tests, most reporting that IgM is detectable as early as 5–14 days after the first clinical symptoms (Guo et al., 2020; Liu et al., 2020; Xu et al., 2020; Yong et al., 2020; Zhang

* Corresponding author. Tel.: +33-3-69-55-14-38; fax: +33-3-69-55-16-98.
E-mail address: samira.fafi-kremer@unistra.fr (S. Fafi-Kremer).

The social and clinical impact of the COVID-19 epidemic on the Strasbourg lung transplant cohort: A single-center retrospective cohort study

Benjamin Renaud-Picard^{1,2}  | Floriane Gallais³ | Marianne Riou^{1,2} | Eva Chatron^{1,2}  | Tristan Degot¹ | Sophie Freudenberger¹ | Michele Porzio^{1,2} | Armelle Schuller¹ | Julien Stauder¹ | Sandrine Hirschi¹ | Romain Kessler^{1,2}

¹Respiratory Medicine and Strasbourg Lung Transplant Program, Hôpitaux universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

²Faculty of Medicine, Federation of Translational Medicine (FMTS), Strasbourg, France

³Laboratory of Virology, Hôpitaux universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

*Correspondence:

Dr Benjamin Renaud-Picard, Department of Respiratory Diseases, Nouvel Hôpital Civil, University Hospital of Strasbourg, 1 Place de l'Hôpital, F- 67000 Strasbourg, France.
 Email: benjamin.renaudpicard@chru-strasbourg.fr

Funding information We do not have any funding to disclose for this study.

Abstract

The clinical and social impacts of the COVID-19 epidemic on lung transplant (LTx) recipients remain poorly known. We aimed to evaluate its social, clinical, and behavioral consequences on the LTx patients followed in Strasbourg university hospital. A questionnaire was used to collect details concerning patients' lifestyles, their protection methods used to avoid COVID-19 contamination, and clinical infection-related information for March 2020. A specific score was created to quantify patients' contacts and the associated risk of infectious contagion. Data were collected from 322 patients (91.2%). A majority reported a higher application than usual of social distancing and barrier measures. 43.8% described infectious-related symptoms and 15.8% needed an anti-infective treatment. There was no difference in symptom onset according to age, native lung disease, diabetes, or obesity. Nineteen patients were tested for COVID-19, and four were diagnosed positive, all with a favorable outcome. The infection risk contact score was higher for symptomatic patients ($p = 0.007$), those needing extra-medical appointments ($p < .001$), and those receiving anti-infective treatments ($p = .02$). LTx patients reported a careful lifestyle and did not seem at higher risk for COVID-19. Our score showed encouraging preliminary results and could become a useful tool for the usual infection-related follow-up of the LTx patients.

KEYWORDS

COVID-19, lifestyle factors, lung transplantation, protective measures

1 | INTRODUCTION

In late December 2019, a new virus from the coronavirus family (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 [SARS-CoV-2]) was identified as a worldwide epidemic (coronavirus disease 2019 [COVID-19]). Although the clinical impact of the disease on immunocompetent patients has been well described, its consequences

on populations treated with immunosuppressive (IS) drugs remain poorly understood, especially concerning solid organ transplant (SOT) recipients.^{1,2} To date, very few cases of lung transplant (LTx) patients affected by COVID-19 have been reported.³⁻⁵ After lung transplantation, a long-term maintenance IS treatment is prescribed. This can lead to an increased risk of infections, especially viral infections, which are sometimes more severe than in the general



Bilateral Acute Cardioembolic Limb Ischemia After Coronavirus Disease 2019 Pneumonia in a Lung Transplant Recipient: A Case Report

Benjamin Renaud-Picard^{a,*}, Floriane Gallais^b, Mickael Ohana^c, Floriane Zeyons^d, Benjamin Kretz^e, Jocelyn Andre^f, Laurent Sattler^g, Sandrine Hirschi^a, and Romain Kessler^a

^aPneumology Unit, Strasbourg Lung Transplant Program, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France; ^bLaboratory of Virology, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France; ^cDepartment of Radiology, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France; ^dDepartment of Cardiology, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France; ^eVascular and Endovascular Surgery, Hôpitaux Civils de Colmar, Colmar, France; ^fAnesthesiology and Intensive Care Unit, Hôpitaux Civils de Colmar, Colmar, France; and ^gLaboratory of Hematology, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

ABSTRACT

Very few cases of lung transplant patients affected by coronavirus disease 2019 (COVID-19) have been reported to date. A 31-year-old patient who underwent bilateral lung transplantation for cystic fibrosis in 2012 was admitted for severe acute lower limb pain. He had a confirmed exposure to COVID-19 and a 3-week history of upper respiratory tract infection. Whole-body computed tomography (CT) angiography revealed an occlusion of the 2 common femoral arteries. CT angiography detected an intracardiac thrombus in the left ventricle. Chest CT angiography showed ground-glass opacities consistent with COVID-19.

A bilateral femoral surgical embolectomy using Fogarty catheter was successfully performed. Specific reverse transcription polymerase chain reaction for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 performed on an extracted thrombus was negative, but IgM antibodies specific for COVID-19 were detected. Cardiac magnetic resonance imaging demonstrated a subendocardial and almost transmural late gadolinium enhancement in the mid and distal inferolateral and inferior wall segments, consistent with a nonrecent myocardial infarction and an apical centimetric thrombus adjacent to the lesion. Thrombophilia laboratory tests found the presence of a positive lupus anticoagulant.

Treatment with low-molecular-weight heparin and aspirin was prescribed. On day 13, the patient was discharged from the hospital.

This case underlines the need to be vigilant with respect to the thrombotic complications of COVID-19 and raises the issue of thrombosis prevention in COVID-19 patients.

IN late December 2019, the epidemic of a coronavirus disease 2019 (COVID-19) broke out in Wuhan, China, and then spread rapidly around the world. Although the clinical impact of the disease has been well described for immunocompetent patients, its consequences on populations treated with immunosuppressive (IS) drugs are still poorly understood, especially concerning solid organ transplant (SOT) recipients. Very few cases of lung transplant patients affected by COVID-19 have been reported to date [1].

This article describes the case of a young lung transplant patient with COVID-19 pneumonia, which was followed by acute limb ischemia. We hypothesize that this complication

*Address correspondence to Dr Benjamin Renaud-Picard, Department of Respiriology, Nouvel Hôpital Civil, University Hospital of Strasbourg, 1 Place de l'Hôpital, F- 67000 Strasbourg. Tel: +33 3 69 55 01 82. Fax: +33 369 55 18 74. E-mail: benjaminrenaud@free.fr



Available online at
ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



Letter to the Editor

Delayed pulmonary abscess following COVID-19 pneumonia: A case report



ARTICLE INFO

Keywords:
 COVID-19
 Pneumonia
 Pulmonary abscess

1. Letter to the editor

A 59-year-old woman with grade 2 obesity and a history of iodinated contrast media allergy, but without any other known comorbidity, was admitted to the Strasbourg University Hospital for severe dyspnea with a four-day history of fatigue, myalgia and a fever of up to 41 °C. When paramedics arrived at her home, the patient was in respiratory distress. Oxygen saturation was at 85% under 15 L/min of nasal oxygen, which required an immediate orotracheal intubation on-site.

Upon admission to the intensive care unit, oxygen saturation was 95% under FiO₂ 100%. Breath sounds were bilateral with bronchial rales. Laboratory tests revealed a slight neutrophilia (8.13 g/L), lymphopenia (0.73 g/L), a high biological inflammatory syndrome (C-reactive protein [CRP]: 114 mg/L). Prothrombin and activated partial thromboplastin times were normal. Liver function tests revealed a mild cytotoxicity (twice normal). The chest radiography showed bilateral diffuse ground-glass opacities that were consistent with a COVID-19 infection (Fig. 1A). A nasopharyngeal swab, using RT-PCR, tested positive for the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2).

Initial management consisted of treatment with lopinavir/ritonavir, combined with probabilistic intravenous amoxicillin-clavulanic acid and spiramycin for 5 days, with curative low-molecular weight heparin.

On day 7, two days after stopping antiviral and antibiotic treatments, the patient's respiratory condition deteriorated. A ventilator-associated pneumonia was suspected, despite negative results on all bacteriological respiratory samples and blood cultures. A nasopharyngeal swab and tracheal aspiration still revealed positive RT-PCR results for SARS-CoV-2. The patient then began 7-day probabilistic treatment with piperacillin-tazobactam and linezolid. Her respiratory status improved gradually, which enabled extubation on day 13.

On day 14, a nasopharyngeal swab and expectorations, using RT-PCR, tested negative for SARS-CoV-2.

On day 15, the patient was transferred to the pneumology department for further care and treatment. She had fully recovered rapidly, including the withdrawal of oxygen therapy, despite the persistence of bibasilar rales, without any other respiratory symptoms or fever. CRP decreased to 9.3 mg/L. Over the following days, chest radiography follow-up demonstrated a partial regression of the ground-glass opacities that were initially observed. Furthermore, diabetes mellitus was diagnosed during hospitalization (fasting glycemia 1.43 g/L [normal range, 0.74–1.06], glycated hemoglobin 6.7%).

Between days 8 and 25 of hospitalization, three specific serologies for SARS-CoV-2 were performed, all of which strongly demonstrated positive IgM and IgG levels (BIOSYNEX COVID-19 BSS rapid test, Strasbourg, France). The symptoms' onset had occurred more than 10 days before the first serology, which can explain these results.

After day 24, the patient was discharged from hospital. But the day after, she experienced intermittent fever (peak temperature of 39.5 °C) and complained of a dry cough and abundant purulent sputum production ("vomica") with halitosis. Her CRP rose to 219 mg/L. Chest radiography revealed the presence of diffuse bilateral ground-glass opacities and a rounded opacity surmounting the right diaphragm. A chest computed tomography (CT) scan revealed one pulmonary abscess (43 mm inner diameter) in the right lower lobe. This was associated with subpleural ground-glass opacities with basal and peripheral predominance and linear alveolar condensations, consistent with partially resolved moderate-to-severe COVID-19 pneumonia (involving approximately 50% of pulmonary parenchyma) (Fig. 1B). One RT-PCR test for SARS-CoV-2 on a nasopharyngeal swab returned weakly positive, but the next control samples remained negative.

All bacteriological cultures (expectorations, hemocultures), aspergillus serology, and antigenemia that were performed were negative. Maxillary sinuses and dental radiographies performed to investigate an extra-thoracic infectious cause were normal. A specific clinical evaluation found a mild dysphagia, which was probably secondary to the intubation.

Finally, the patient fully recovered after a 14 days-intravenous treatment with piperacillin-tazobactam and levofloxacin, followed with at home-treatment with amoxicillin-clavulanic acid and levofloxacin for seven more days (Fig. 2).

Clinical follow-up at one-month post-discharge revealed no symptoms and chest radiography was normalized.

Several studies and clinical observations have put forth the potential association between COVID-19 and high thrombotic risk [1]. The main thrombotic manifestations described until now include pulmonary embolism, acute coronary syndrome, and stroke. In our case, we did not perform a V/Q lung scintigraphy, believing that it would be hard to differentiate a pulmonary abscess

Abbreviations: CRP, C-Reactive Protein; CT, Computed Tomography; SARS-CoV-2, Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2.

<https://doi.org/10.1016/j.resmer.2020.100776>
 2590-0412/© 2020 SPLF and Elsevier Masson SAS. All rights reserved.



Available online at
ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com/en



Original article

COVID-19 exposure in SARS-CoV-2-seropositive hospital staff members during the first pandemic wave at Strasbourg University Hospital, France



Aurélie Velay^{a,b,*}, Floriane Gallais^{a,b}, Marie-Josée Wendling^a, Sophie Bayer^c, Nathalie Reix^c, Anne Schneider^d, Ludovic Glady^c, Nicolas Collongues^e, Jean-Marc Lessinger^c, Yves Hansmann^f, Laurence Kling-Pillitteri^g, Jérôme De Sèze^e, Maria Gonzalez^{g,h}, Catherine Schmidt-Mutter^e, Nicolas Meyerⁱ, Samira Fafi-Kremer^{a,b}

^a Virology Laboratory and INSERM UMR.S 1109, Strasbourg University Hospital, 3, rue Koeberlé, 67000 Strasbourg, France

^b Strasbourg University, INSERM, IRM UMR-S 1109, 67000 Strasbourg, France

^c CHU de Strasbourg, Laboratoire de Biochimie Clinique et Biologie Moléculaire, 67091 Strasbourg, France

^d CHU de Strasbourg, Département de Génétique Moléculaire du cancer, 67091 Strasbourg, France

^e Centre d'investigation Clinique INSERM 1434, CHU Strasbourg, Strasbourg, France

^f CHU de Strasbourg, Service des maladies infectieuses et tropicales, 67091 Strasbourg, France

^g CHU de Strasbourg, Service de santé au travail du personnel hospitalier, 67091 Strasbourg, France

^h CHU de Strasbourg, Service de Pathologies Professionnelles, Strasbourg, France

ⁱ CHU de Strasbourg, Service de santé Publique, GMRC, 67091 Strasbourg, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 June 2021

Received in revised form 23 August 2021

Accepted 9 November 2021

Available online 11 November 2021

ABSTRACT

Objectives: Strasbourg University Hospital faced an important COVID-19 first wave from early March 2020. We performed a longitudinal prospective cohort study to describe clinical and virological data, exposure history to COVID-19, and adherence to strict hygiene standards during the first pandemic wave in 1497 workers undergoing a SARS-CoV-2 serological test at our hospital, with a follow up of serology result three months later.

Patients and Methods: A total of 1497 patients were enrolled from April 6 to May 7, 2020. Antibody response to SARS-CoV-2 was measured, and COVID-19 exposure routes were analyzed according to SARS-CoV-2 serological status.

Results: A total of 515 patients (34.4%) were seropositive, mainly medical students (13.2%) and assistant nurses (12.0%). A history of COVID-19 exposure in a professional and/or private setting was mentioned by 83.1% of seropositive subjects ($P < 0.05$; odds ratio [OR]: 2.5; 95% confidence interval [CI]: 1.8–3.4). COVID-19 exposure factors associated with seropositive status were non-professional exposure (OR: 1.9, 95% CI: 1.3–2.7), especially outside the immediate family circle (OR: 2.2, 95% CI: 1.2–3.9) and contact with a COVID-19 patient (OR: 1.6; 95% CI: 1.1–2.2). Among professionally exposed workers, systematic adherence to strict hygiene standards was well observed, except for the use of a surgical mask ($P < 0.05$, OR: 1.9, 95% CI: 1.3–2.8). Of those who reported occasionally or never wearing a surgical mask, nurses (25.7%), assistant nurses (16.2%), and medical students (11.7%) were predominant.

Conclusion: Infection of staff members during the first pandemic wave in our hospital occurred after both professional and private COVID-19 exposure, underlining the importance of continuous training in strict hygiene standards.

1. Introduction

In early December 2019, the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) emerged in the city of Wuhan,

in China's Hubei Province. This highly contagious virus, mainly transmitted via droplets, is the causative agent of the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) [1]. Given the current COVID-19 pandemic, infection of medical and nursing staff is a common occurrence. Shortly after the first wave of the pandemic, the occupational risk of contamination among healthcare workers (HCWs) was well identified [2–4], with contamination rates ranging from 3.5% to 29% amongst hospitals in Wuhan [5].

* Corresponding author at: Virology Laboratory and INSERM UMR.S 1109, Strasbourg University Hospital, 3, rue Koeberlé, 67000 Strasbourg, France.
 E-mail address: aurelie.velay@chru-strasbourg.fr (A. Velay).



Contents lists available at ScienceDirect

Clinical Microbiology and Infection

journal homepage: www.clinicalmicrobiologyandinfection.com

Letter to the Editor

Outbreak of SARS-CoV-2 infection in a long-term care facility after COVID-19 BNT162b2 mRNA vaccination

Martin Martinot^{1,*}, Stéphane Carnein², Christian Kempf³, Pierre Gantner^{4,5},
Floriane Gallais^{4,5}, Samira Fafi-Kremer^{4,5}

¹ Infectious Diseases Department, Hôpitaux Civils de Colmar 68000 France

² Centre Départemental de Repos et de Soins 68000 Colmar France

³ Clinical Research Department Hôpitaux Civils de Colmar, Colmar, France

⁴ Virology Laboratory, Strasbourg University Hospital, Strasbourg, France

⁵ Strasbourg University, INSERM, IRM UMR-S 1109, F-67000 Strasbourg, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 May 2021

Received in revised form

22 June 2021

Accepted 26 June 2021

Available online 7 July 2021

Editor: L. Leibovici

To the Editor

Coronavirus disease 2019 (COVID-19) is a life-threatening disease, especially for older individuals and people with multiple risk factors. Geriatric environments are therefore at high risk of COVID-19 outbreaks with increased mortality [1]. We describe an outbreak of nosocomial COVID-19 in a long-term care facility (LTCF) in Eastern France, starting 1 month after a double-dose vaccination campaign with the BNT162b2 mRNA vaccine.

The 93 residents of the LTCF included 66 females and 27 males with a median age of 88 years (range 63–99 years), none of them immunocompromised. Seventy residents (75.3%) and 38 HCWs (52.1%) were fully vaccinated with two doses of the BNT162b2 mRNA vaccine on 25th January and 15th February 2021. Among the other 23 residents (24.7%) not vaccinated at the beginning of the outbreak, 11 were not vaccinated due to the residents' decision, two received one dose of vaccine, and ten received two doses on 9th April and 30th April each during the outbreak.

Between 15th March and 6th May 2021, 40 subjects tested positive for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

(SARS-CoV-2) infection using either rapid antigen detection ($n = 18$) (Biosynex COVID-19 BSS IgG/IgM) and/or real-time reverse transcriptase PCR (RT-PCR) tests (Biosynex) ($n = 22$) on nasopharyngeal swabs. These COVID-19 cases included 24/93 residents (25.8%) and 16/73 healthcare workers (HCWs) (21.9%) (Fig. 1). Positive residents were older and more frequently male than their uninfected counterparts: age 91 years (range 72–99 years) and 87 years (range 63–97 years), and of these 10/24 (41.7%) and 17/69 (24.66%) were male, respectively. COVID-19 cases were more frequent among residents who were not fully vaccinated (12/23, 52.2%) than among fully vaccinated residents (12/70, 17.1%). Residents who were vaccinated versus those not fully vaccinated were asymptomatic (four versus two) or displayed mild (four versus three), moderate (four versus four) or severe (none versus three) symptoms. One unvaccinated 83-year-old woman died 1 month after being hospitalized, and a 98-year-old fully vaccinated female resident died of sudden death.

Variant screening by RT-PCR (Seegene Inc., Seoul, Korea) and Sanger sequencing of the spike protein gene identified the SARS-CoV-2 α variant in all positive samples. Quantitative measurement of anti-spike (S) IgG (Abbott SARS-CoV-2 IgG II Quant assay) was carried out for 79 residents on 6th April, including 62 fully vaccinated residents who all except one displayed positive serology. Three vaccinated residents were infected after that date despite previous high anti-S IgG titres (1452, 4842 and 2861 AU/mL, respectively) (Fig. 1).

To assess the effectiveness of the BNT162b2 mRNA vaccine, we conducted a time-to-event analysis using a multivariate proportional hazard Cox model with vaccination status, age, and gender as covariates. The hazard of developing a SARS-CoV-2 infection was, for fully vaccinated residents, 0.32 times that of subjects who were not fully vaccinated (95%CI 0.14–0.73, $p = 0.006$). Male residents were at significantly higher risk of developing COVID-19 (HR 2.79, 95%CI 1.18–6.59, $p = 0.02$), as were older subjects with an HR of 1.62 for a 5-year increase in age (95%CI 1.16–2.27, $p = 0.005$). The adjusted hazard ratio (HR) for fully versus not fully vaccinated residents was

* Corresponding author. Martin Martinot, Hôpitaux Civils de Colmar, 39 Avenue de la Liberté, 68024 Colmar, France.

E-mail address: martin.martinot@ch-colmar.fr (M. Martinot).

<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.06.038>

1198-743X/© 2021 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Sex Differences in the Evolution of Neutralizing Antibodies to Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2

Ludvine Grzelak,^{1,2,a} Aurélie Velay,^{3,4,a} Yoann Madec,^{5,a} Floriane Gallais,^{3,4} Isabelle Staropoli,¹ Catherine Schmidt-Mutter,⁶ Marie-Josée Wendling,^{3,4} Nicolas Meyer,⁷ Cyril Planchais,⁸ David Rey,⁹ Hugo Mouquet,⁹ Nathalie Reix,¹⁰ Ludovic Glad,¹⁰ Yves Hansmann,¹¹ Timothée Bruel,¹ Jérôme De Sèze,^{6,12} Arnaud Fontanet,⁵ Maria Gonzalez,¹³ Olivier Schwartz,^{1,14,b} and Samira Fafi-Kremer^{3,4,b}

¹Virus and Immunity Unit, Department of Virology, Institut Pasteur, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) Unité mixte de recherche (UMR) 3569, Paris, France; ²Sorbonne Paris Cité, Université de Paris, Paris, France; ³Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Laboratoire de virologie, Strasbourg, France; ⁴Université de Strasbourg, Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM), Immuno-Rhumatologie Moléculaire (IRM) UMR_S 1109, Strasbourg, France; ⁵Emerging Diseases Epidemiology Unit, Department of Global Health, Institut Pasteur, Paris, France; ⁶Centre d'Investigation Clinique INSERM 1434, CHU Strasbourg, France; ⁷CHU de Strasbourg, Service de Santé Publique, Groupe de Méthodes en Recherche Clinique (GMRC), Strasbourg, France; ⁸Laboratory of Humoral Immunology, Department of Immunology, Institut Pasteur, INSERM U1222, Paris, France; ⁹CHU de Strasbourg, Pôle Pôle Spécialités Médicales - Ophtalmologie (SMO), le Trait d'Union, Strasbourg, France; ¹⁰CHU de Strasbourg, Laboratoire de Biochimie Clinique et Biologie Moléculaire, Strasbourg, France; ¹¹CHU de Strasbourg, Service des Infectieuses et Tropicales, Strasbourg, France; ¹²CHU de Strasbourg, Service de Neurologie, Strasbourg, France; ¹³CHU de Strasbourg, Service de Pathologies Professionnelles, Strasbourg, France; and ¹⁴Vaccine Research Institute, Faculté de Médecine, INSERM U955, Université Paris-Est Créteil, Créteil, France

We measured anti-spike (S), nucleoprotein (N), and neutralizing antibodies in sera from 308 healthcare workers with a positive reverse-transcription quantitative polymerase chain reaction result for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 and with mild disease, collected at 2 timepoints up to 6 months after symptom onset. At month 1, anti-S and -N antibody levels were higher in male participants aged >50 years and participants with a body mass index (BMI) >25 kg/m². At months 3–6, anti-S and anti-N antibodies were detected in 99% and 59% of individuals, respectively. Anti-S antibodies and neutralizing antibodies declined faster in men than in women, independent of age and BMI, suggesting an association of sex with evolution of the humoral response.

Keywords. SARS-CoV-2; antibodies; sex-related differences; COVID-19.

Received 15 December 2020; editorial decision 2 March 2021; accepted 4 March 2021; published online March 7, 2021.

^aL. G., A. V., and Y. M. contributed equally to this work as co-first authors.

^bO. S. and S. F.-K. contributed equally to this work as co-last authors.

Correspondence: Olivier Schwartz, PhD, 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France, +33(0)1 45688353 (olivier.schwartz@pasteur.fr).

The Journal of Infectious Diseases® 2021;224:983–8

© The Author(s) 2021. Published by Oxford University Press for the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. For permissions, e-mail: journals.permissions@oup.com. DOI: 10.1093/infdis/jiab127

The duration of humoral immune responses to severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is debated. Patients with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) produce more antibodies than asymptomatic or mildly symptomatic individuals [1–3]. Some studies showed a rapid decrease in convalescents regardless of disease severity, and others reported stable antibody titers within the first 3 months [1–7]. Anti-spike (S) antibody amounts correlate with neutralization capacity, since S is the main, if not unique, target for neutralizing antibodies. Neutralizing antibody titers also vary depending on the time post-onset of symptoms (POS) and disease severity [1–3, 8]. Little is known about the influence of sex, age, or body mass index (BMI) on the longevity of anti-SARS-CoV-2 antibodies, particularly in mildly symptomatic individuals, who represent the majority of COVID-19 cases.

MATERIALS AND METHODS

Study Design and Participants

We assessed the persistence of anti-SARS-CoV-2 antibodies in sera from mild COVID-19 healthcare workers in Strasbourg University Hospital. Three hundred eight donors with reverse-transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)-confirmed SARS-CoV-2 infection were enrolled in the study, with samples longitudinally collected at month 1 (M1) (median, 31 days [range, 11–58 days]) and months 3 to 6 (M3–6) (median, 107 days [range, 78–172 days]) POS (Supplementary Table 1).

SARS-CoV-2 RT-PCR testing on nasopharyngeal swabs was performed at least 10 days before inclusion. Participants completed a questionnaire covering sociodemographic characteristics, virological findings, and clinical data including myalgia, difficulty of breathing, fever, asthenia, rhinitis/pharyngitis, cough, headache, anosmia/dysgeusia, and diarrhea.

Ethics Committee Approval

Results are part of an ongoing prospective, interventional, monocentric, longitudinal, cohort study enrolling staff from the Strasbourg University Hospitals (ClinicalTrials.gov identifier NCT04441684). The protocol was approved by the institutional review board of Strasbourg University Hospitals.

Serological Assays

Commercial Assays. The Biosynex (COVID-19 BSS immunoglobulin G [IgG]/immunoglobulin M [IgM]) lateral flow assay (LFA) detects IgM and IgG against the receptor-binding domain with 99% specificity and 96% sensitivity after 22 days POS [9]. The EDI Novel Coronavirus COVID-19



ORIGINAL RESEARCH

Refining “Long-COVID” by a Prospective Multimodal Evaluation of Patients with Long-Term Symptoms Attributed to SARS-CoV-2 Infection

Marc Scherlinger · Renaud Felten · Floriane Gallais · Charlotte Nazon · Emmanuel Chatelus · Luc Pijnenburg · Amaury Mengin · Adrien Gras · Pierre Vidailhet · Rachel Arnould-Michel · Sabrina Bibi-Triki · Raphaël Carapito · Sophie Trouillet-Assant · Magali Perret · Alexandre Belot · Seiamak Bahram · Laurent Arnaud · Jacques-Eric Gottenberg · Samira Fafi-Kremer · Jean Sibilia

Received: April 27, 2021 / Accepted: June 15, 2021 / Published online: July 10, 2021
© The Author(s) 2021

ABSTRACT

Introduction: COVID-19 long-haulers, also described as having “long-COVID” or post-acute COVID-19 syndrome, represent 10% of COVID-19 patients and remain understudied.

Marc Scherlinger, Renaud Felten, Floriane Gallais, Samira Fafi-Kremer and Jean Sibilia participated equally in the study.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s40121-021-00484-w>.

M. Scherlinger (✉) · R. Felten · E. Chatelus · L. Pijnenburg · R. Arnould-Michel · L. Arnaud · J.-E. Gottenberg · J. Sibilia (✉)
Rheumatology Department, Centre Hospitalier Universitaire de Strasbourg, 1 Avenue Molière, 67098 Strasbourg, France
e-mail: marc.scherlinger@chru-strasbourg.fr | J. Sibilia
e-mail: jean.sibilia@chru-strasbourg.fr

M. Scherlinger · R. Felten · E. Chatelus · L. Pijnenburg · R. Arnould-Michel · L. Arnaud · J.-E. Gottenberg · J. Sibilia
Centre National de Référence Des Maladies Auto-Immunes Et Systémiques Rares, Est/Sud-Ouest (RESO), Service de Rhumatologie du CHU de Strasbourg, 1 Avenue Molière, 67200 Strasbourg Cedex, France

F. Gallais · C. Nazon · S. Fafi-Kremer
Virology Diagnostic Laboratory, Centre Hospitalier Universitaire de Strasbourg, 3 Rue Koeberlé, 67000 Strasbourg, France

Methods: In this prospective study, we recruited 30 consecutive patients seeking medical help for persistent symptoms (> 30 days) attributed to COVID-19. All reported a viral illness compatible with COVID-19. The patients underwent a multi-modal evaluation, including clinical, psychologic, virologic and specific immunologic assays and were followed longitudinally. A group of 17 convalescent COVID-19 individuals without persistent symptoms were included as a comparison group.

Results: The median age was 40 [interquartile range: 35–54] years and 18 (60%) were female.

A. Mengin · A. Gras · P. Vidailhet
Centre Hospitalier Universitaire de Strasbourg, 1 Avenue Molière, 67098 Strasbourg, France

S. Bibi-Triki · R. Carapito · S. Bahram · L. Arnaud · S. Fafi-Kremer · J. Sibilia
Laboratoire D’ImmunoRhumatologie Moléculaire, Institut National de La Santé Et de La Recherche Médicale (INSERM) UMR_S 1109, Institut Thématique Interdisciplinaire (ITI) de Médecine de Précision de Strasbourg, Transplantex NG, Faculté de Médecine, Fédération Hospitalo-Universitaire OMICARE, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Université de Strasbourg, Strasbourg, France

S. Trouillet-Assant · M. Perret · A. Belot
National Reference Centre for Rare Rheumatic and Autoimmune Diseases in childrEn RAISE, Hospices Civils de Lyon, CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, Inserm, U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, ENS de Lyon, 69007 Lyon, France

Strong antibody response after a first dose of a SARS-CoV-2 mRNA-based vaccine in kidney transplant recipients with a previous history of COVID-19

To the Editor:

A recent study demonstrated that a single dose of a severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) mRNA-based vaccine is sufficient to mount a robust immunological response in immunocompetent subjects with a previous history of coronavirus disease 2019 (COVID-19).^{1,2} While research has suggested that immunocompromised kidney transplant recipients (KTRs) who received mRNA-based vaccines show low immunization rates,³⁻⁵ the question as to whether this also applies to KTRs with a past history of COVID-19 remains unanswered. The aim of this study was to describe the results of immunization after one dose of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine in KTRs who were already seropositive at baseline because of previous exposure to SARS-CoV-2.

All KTRs ($n = 41$) tested positive for anti-SARS-CoV-2 antibodies on the day of vaccination. Of them, 11 were diagnosed by chance based on the results of serology testing. For the remaining 30 patients, the median interval between infection and vaccination was 306 days (interquartile range [IQR]: 171–316 days). The serological response was assessed after a median of 28 days (IQR: 28–31 days) from vaccination using the ARCHITECT IgG II Quant test (Abbott). Titers >50 arbitrary units (AUs)/mL were considered positive (detection range: 6.8–80000 AUs/mL). This assay has been reported to correlate with in vitro neutralization of SARS-CoV-2.¹ The study protocol was approved by the local Ethics Committee (approval DC-2013-1990), and written informed consent was obtained.

KTRs were mainly men (74%) with a median age of 59 years (IQR: 51–66 years). Maintenance immunosuppression was based on the use of calcineurin inhibitors (95%), antimetabolites (86%), and steroids (57%). According to the WHO classification, 22 patients were asymptomatic or had mild disease and were managed at home. Nineteen patients were hospitalized (13 with moderate COVID-19 and six with critical/severe disease). Immunosuppression was reduced in 20 patients during the course of COVID-19. However, it was subsequently reintroduced and all of the participants were regularly receiving their immunosuppressive therapy at the time of vaccination.

The median baseline antibody titer was 842 AUs/mL (IQR: 249–2234 AUs/mL), with a significant postvaccination increase being evident (median antibody titer: 22801 AUs/mL; IQR: 10768–78339 AUs/mL, $p < 0.0001$; Figure 1A). After vaccination,

KTRs who required hospitalization ($n = 19$) had a higher antibody titer compared with those who were managed at home ($n = 22$; median antibody titer: 49531 AUs/mL vs. 14334 AUs/mL, respectively, $p = 0.04$, Figure 1B). However, no significant differences in prevaccination antibody titers were observed between the two groups (median antibody titer: 842 vs. 958 AUs/mL, respectively, $p = 0.7$). For comparison purposes, we also analyzed the antibody response of 22 health-care workers with a history of COVID-19 who received either the BNT162b2 ($n = 19$) or the mRNA-1273 vaccine ($n = 3$). This group mainly consisted of women (75%) with a median age of 47 years (IQR: 35–57 years). The antibody titer of health-care workers after a median of 19 days (IQR: 21–28 days) from vaccination did not differ significantly (median antibody titer: 27191 AUs/mL; IQR: 9370–42729 AUs/mL, $p = 0.34$, Figure 1C) from that observed in KTRs.

Despite their immunosuppression burden, KTRs with previous exposure to SARS-CoV-2 showed a marked increase in antibody titers even after a single-dose vaccine. Notably, the postvaccination antibody titers observed in these immunosuppressed patients were similar to those of immunocompetent subjects. A preexisting B cell memory in recovered individuals is likely to play a key role in this phenomenon²—which suggests that the immune response of KTRs to SARS-CoV-2 is similar to that observed in immunocompetent individuals. This response is strikingly different from that described for SARS-CoV-2-naïve KTRs who received SARS-CoV-2 mRNA-based vaccines.³⁻⁵ An “antigen dose” phenomenon may account for these discrepancies.

DISCLOSURE

The authors of this manuscript have conflicts of interest to disclose as described by the *American Journal of Transplantation*. Dr Caillard reports personal fees and nonfinancial support from Novartis, nonfinancial support from Sanofi, and nonfinancial support from Astellas, unrelated to the current study. The other authors have no conflict of interest to disclose.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

Data supporting the findings from this study are available from the corresponding author upon reasonable request.



Received: 18 June 2020 | Revised: 23 July 2020 | Accepted: 29 July 2020

DOI: 10.1111/ajt.16251

BRIEF COMMUNICATION

AJT

In-depth virological assessment of kidney transplant recipients with COVID-19

Ilies Benotmane^{1,2,3} | Gabriela Gautier-Vargas¹ | Marie-Josée Wendling² | Peggy Perrin^{1,3} | Aurélie Velay^{2,3} | Xavier Bassand¹ | Dimitri Bedo¹ | Clément Baldacini¹ | Mylène Sagnard¹ | Dogan-Firat Bozman¹ | Margaux Della-Chiesa¹ | Morgane Solis^{2,3} | Floriane Gallais^{2,3} | Noëlle Cognard¹ | Jérôme Olagne¹ | Héloïse Delagrèverie² | Louise Gontard² | Baptiste Panaget² | David Marx¹ | Françoise Heibel¹ | Laura Braun-Parvez¹ | Bruno Moulin^{1,3} | Sophie Caillard^{1,3,*} | Samira Fafi-Kremer^{2,3,*}

¹Department of Nephrology and Transplantation, Strasbourg University Hospital, Strasbourg, France

²Department of Virology, Strasbourg University Hospital, Strasbourg, France

³INSERM U1109, LabEx TRANSPLANTEX, Strasbourg, France

Correspondence

Samira Fafi-Kremer
Email: samira.fafi-kremer@unistra.fr

Funding information

Strasbourg University Hospital (COVID-HUS study-HUS N°7760)

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) has spread widely, causing coronavirus disease 2019 (COVID-19) and significant mortality. However, data on viral loads and antibody kinetics in immunocompromised populations are lacking. We aimed to determine nasopharyngeal and plasma viral loads via reverse transcription-polymerase chain reaction and SARS-CoV-2 serology via enzyme-linked immunosorbent assay and study their association with severe forms of COVID-19 and death in kidney transplant recipients. In this study, we examined hospitalized kidney transplant recipients with nonsevere (n = 21) and severe (n = 19) COVID-19. SARS-CoV-2 nasopharyngeal and plasma viral load and serological response were evaluated based on outcomes and disease severity. Ten recipients (25%) displayed persistent viral shedding 30 days after symptom onset. The SARS-CoV-2 viral load of the upper respiratory tract was not associated with severe COVID-19, whereas the plasma viral load was associated with COVID-19 severity ($P = .010$) and mortality ($P = .010$). All patients harbored antibodies during the second week after symptom onset that persisted for 2 months. We conclude that plasma viral load is associated with COVID-19 morbidity and mortality, whereas nasopharyngeal viral load is not. SARS-CoV-2 shedding is prolonged in kidney transplant recipients and the humoral response to SARS-CoV-2 does not show significant impairment in this series of transplant recipients.

KEYWORDS

clinical research/practice, complication: infectious, immune deficiency, infection and infectious agents – viral, infectious disease, kidney transplantation/nephrology

Abbreviations: CNI, calcineurin inhibitor; COVID-19, coronavirus disease 2019; CT, computed tomography; D, day after symptom onset; ICU, intensive care unit; Ig, immunoglobulin; IL, interleukin; KTR, kidney transplant recipients; MPA, mycophenolic acid; ROC, receiver operating characteristic; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2.

*Sophie Caillard and Samira Fafi-Kremer contributed equally to this work.

© 2020 The American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons

Cite as: X. Charmetant *et al.*, *Sci. Transl. Med.*
10.1126/scitranslmed.abl6141 (2022).

CORONAVIRUS

Infection or a third dose of mRNA vaccine elicit neutralizing antibody responses against SARS-CoV-2 in kidney transplant recipients

Xavier Charmetant^{1,†}, Maxime Espi^{1,†}, Ilies Benotmane^{2,3,4,†}, Véronique Barateau¹, Françoise Heibel², Fanny Buron⁵, Gabriela Gautier-Vargas², Marion Delafosse⁵, Peggy Perrin², Alice Koenig^{1,5,6}, Noëlle Cognard², Charlene Levi⁵, Floriane Gallais^{3,4}, Louis Manière⁵, Paola Rossolillo⁷, Eric Soulier⁴, Florian Pierre⁴, Anne Ovize⁸, Emmanuel Morelon^{1,5,6}, Thierry Defrance¹, Samira Fafi-Kremer^{3,4,†}, Sophie Caillard^{2,3,4,†}, Olivier Thauinat^{1,5,6,†,*}

¹CIRI, INSERM U1111, Université Claude Bernard Lyon I, CNRS UMR5308, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Univ. Lyon, 21 avenue Tony Garnier, 69007 Lyon, France. ²Department of Nephrology and Transplantation, Strasbourg University Hospital, 67000 Strasbourg, France. ³Department of Virology, Strasbourg University Hospital, 67000 Strasbourg, France. ⁴Inserm UMR S1109, LabEx Transplantex, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Université de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France. ⁵Hospices Civils de Lyon, Edouard Herriot Hospital, Department of Transplantation, Nephrology and Clinical Immunology, 5, place d'Arsonval, 69003 Lyon, France. ⁶Claude Bernard University (Lyon 1), 43 boulevard du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne France. ⁷Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), UMR 7104, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U1258, Université de Strasbourg, 67400 Illkirch, France. ⁸Eurofins Biomnis Laboratory, 69007 Lyon, France.

†These authors contributed equally to this work

‡These authors contributed equally to this work

*Corresponding author. Email: olivier.thauinat@chu-lyon.fr

Transplant recipients, who receive therapeutic immunosuppression to prevent graft rejection, are characterized by high coronavirus disease 2019 (COVID-19)-related mortality and defective response to vaccines. We observed that previous infection with severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), but not the standard two-dose regimen of vaccination, provided protection against symptomatic COVID-19 in kidney transplant recipients. We therefore compared the cellular and humoral immune responses of these two groups of patients. Neutralizing anti-Receptor Binding Domain (RBD) IgG antibodies were identified as the primary correlate of protection for transplant recipients. Analysis of virus-specific B and T cell responses suggested that the generation of neutralizing anti-RBD IgG may have depended upon cognate T-B cell interactions that took place in germinal center, potentially acting as a limiting checkpoint. High dose mycophenolate mofetil, an immunosuppressive drug, was associated with fewer antigen-specific B and T follicular helper (Tfh) cells after vaccination; this was not observed in patients recently infected with SARS-CoV-2. Finally, we observed that, in two independent prospective cohorts, administration of a third dose of SARS-CoV-2 mRNA vaccine restored neutralizing titers of anti-RBD IgG in about 40% of individuals who had not previously responded to two doses of vaccine. Together, these findings suggest that a third dose of SARS-CoV-2 mRNA vaccine improves the RBD-specific responses of transplant patients treated with immunosuppressive drugs.

INTRODUCTION

In December 2019, an outbreak of apparently viral pneumonia of unknown etiology emerged in the city of Wuhan in the Chinese province of Hubei (1). On 9 January 2020, the World Health Organization (WHO) announced the discovery of a novel coronavirus officially named severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), which is the pathogen responsible for coronavirus disease 2019 (COVID-19). The disease quickly disseminated from Wuhan and as at 13 January 2022, more than 307 million cases have been confirmed in 218 countries (2), leading the WHO to consider

COVID-19 as the first pandemic triggered by a coronavirus.

Among the various alarms raised by the pandemic was its impact on the population of patients receiving organ transplants, whose COVID-19-related mortality was estimated at about 20%, several magnitudes higher than that of the general population (3–7). This vulnerable population of patients was therefore prioritized for vaccination against SARS-CoV-2 by health authorities (8). However, prevention of allograft rejection requires life-long immunosuppression regimens, which non-specifically inhibit T and B cells in transplant recipients, resulting in reduced response rates to vaccines in

Article

Reduced sensitivity of SARS-CoV-2 variant Delta to antibody neutralization

<https://doi.org/10.1038/s41586-021-03777-9>

Received: 26 May 2021

Accepted: 29 June 2021

Published online: 8 July 2021

 Check for updates

Delphine Planas^{1,2}, David Veyer^{3,4}, Artem Baidaliuk⁵, Isabelle Staropoli¹, Florence Guivel-Benhassine¹, Maaran Michael Rajah^{1,6}, Cyril Planchais⁷, Françoise Porrot¹, Nicolas Robillard⁴, Julien Puech⁴, Matthieu Prot⁵, Floriane Gallais^{8,9}, Pierre Gantner^{8,9}, Aurélie Velay^{8,9}, Julien Le Guen¹⁰, Najiby Kassis-Chikhani¹¹, Dhiaeddine Edriss⁴, Laurent Belec⁴, Aymeric Seve¹², Laura Courtellemont¹², Hélène Péré³, Laurent Hocqueloux¹², Samira Fafi-Kremer^{8,9}, Thierry Prazuck¹², Hugo Mouquet⁷, Timothée Bruel^{1,2,14}✉, Etienne Simon-Lorière^{5,14}, Felix A. Rey^{13,14} & Olivier Schwartz^{1,2,14}✉

The SARS-CoV-2 B.1.617 lineage was identified in October 2020 in India^{1–5}. Since then, it has become dominant in some regions of India and in the UK, and has spread to many other countries⁶. The lineage includes three main subtypes (B.1.617.1, B.1.617.2 and B.1.617.3), which contain diverse mutations in the N-terminal domain (NTD) and the receptor-binding domain (RBD) of the SARS-CoV-2 spike protein that may increase the immune evasion potential of these variants. B.1.617.2—also termed the Delta variant—is believed to spread faster than other variants. Here we isolated an infectious strain of the Delta variant from an individual with COVID-19 who had returned to France from India. We examined the sensitivity of this strain to monoclonal antibodies and to antibodies present in sera from individuals who had recovered from COVID-19 (hereafter referred to as convalescent individuals) or who had received a COVID-19 vaccine, and then compared this strain with other strains of SARS-CoV-2. The Delta variant was resistant to neutralization by some anti-NTD and anti-RBD monoclonal antibodies, including bamlanivimab, and these antibodies showed impaired binding to the spike protein. Sera collected from convalescent individuals up to 12 months after the onset of symptoms were fourfold less potent against the Delta variant relative to the Alpha variant (B.1.1.7). Sera from individuals who had received one dose of the Pfizer or the AstraZeneca vaccine had a barely discernible inhibitory effect on the Delta variant. Administration of two doses of the vaccine generated a neutralizing response in 95% of individuals, with titres three- to fivefold lower against the Delta variant than against the Alpha variant. Thus, the spread of the Delta variant is associated with an escape from antibodies that target non-RBD and RBD epitopes of the spike protein.

The SARS-CoV-2 Delta variant (B.1.617.2) has been detected in many countries. It has become predominant in the Indian state of Maharashtra and probably other Indian regions⁴, and represented 77% of the sequenced viruses circulating in the UK between 2 June and 9 June 2021⁶. It has been classified as a variant of concern (VOC) and is believed to be 60% more transmissible than the Alpha variant (B.1.1.7). Little is known about the sensitivity of the Delta variant to the humoral immune response. Recent reports have indicated that members of the B.1.617 lineage exhibit a reduced sensitivity to

certain monoclonal and polyclonal antibodies compared to the Alpha variant^{1–5,7–9}.

Isolation and characterization of the Delta variant

We isolated the Delta variant from a nasopharyngeal swab of a symptomatic individual a few days after his return to France from India. The virus was amplified by two passages on Vero E6 cells. Sequences of the swab and the outgrown virus were identical, and identified the Delta

¹Virus and Immunity Unit, Department of Virology, Institut Pasteur, CNRS UMR 3569, Paris, France. ²Vaccine Research Institute, Creteil, France. ³INSERM, Functional Genomics of Solid Tumors (FunGeST), Centre de Recherche des Cordeliers, Université de Paris and Sorbonne Université, Paris, France. ⁴Laboratoire de Virologie, Service de Microbiologie, Hôpital Européen Georges Pompidou, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Paris, France. ⁵G5 Evolutionary Genomics of RNA Viruses, Department of Virology, Institut Pasteur, Paris, France. ⁶Université de Paris, Sorbonne Paris Cité, Paris, France. ⁷Laboratory of Humoral Immunology, Department of Immunology, Institut Pasteur, INSERM U1222, Paris, France. ⁸CHU de Strasbourg, Laboratoire de Virologie, Strasbourg, France. ⁹Université de Strasbourg, INSERM, IRM UMR_S1109, Strasbourg, France. ¹⁰Service de Gériatrie, Hôpital Européen Georges Pompidou, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Paris, France. ¹¹Unité d'Hygiène Hospitalière, Service de Microbiologie, Hôpital Européen Georges Pompidou, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Paris, France. ¹²CHR d'Orléans, Service de Maladies Infectieuses, Orléans, France. ¹³Structural Virology Unit, Department of Virology, Institut Pasteur, CNRS UMR 3569, Paris, France. ¹⁴These authors contributed equally: Timothée Bruel, Etienne Simon-Lorière, Felix A. Rey, Olivier Schwartz. ✉e-mail: timothee.brue@pasteur.fr; olivier.schwartz@pasteur.fr

Letter to the Editor

High severe acute respiratory coronavirus virus 2 (SARS-CoV-2) seroconversion rate among geriatric staff from Strasbourg University Hospitals

Baptiste Panaget¹, Aurélie Velay PharmD, PhD^{1,2}, Louise Gontard¹, François Severac MD³, Maxence Meyer MD⁴, Elisabeth Antoni⁵, Georges Kaltenbach MD, PhD⁴, Laurence Kling-Pillitteri MD⁶, Yasmine Sammour MD⁷, Yves Hansmann MD, PhD⁸, Céline Hernandez MD⁹, Thierry Lavigne MD, PhD⁹, Jean-Marc Lessinger PharmD, PhD¹⁰, Maria Gonzalez MD, PhD^{6,11}, Marie-Josée Wendling MD¹, Floriane Gallais PharmD^{1,2}, Sabrina Garnier Kepka MD¹² and Samira Fafi-Kremer PharmD, PhD^{1,2}

¹Laboratoire de Virologie, CHU de Strasbourg, Strasbourg, France, ²INSERM, Strasbourg University, Strasbourg, France, ³Service de Santé Publique, CHU de Strasbourg, Strasbourg, France, ⁴Service de Gériatrie, CHU de Strasbourg, Strasbourg, France, ⁵Pôle de Biologie, CHU de Strasbourg, Strasbourg, France, ⁶Service de santé au travail du personnel hospitalier, CHU de Strasbourg, Strasbourg, France, ⁷Direction, CHU de Strasbourg, Strasbourg, France, ⁸Service des maladies infectieuses et tropicales, CHU de Strasbourg, Strasbourg, France, ⁹Service d'hygiène hospitalière, CHU de Strasbourg, Strasbourg, France, ¹⁰Laboratoire de Biochimie Clinique et Biologie Moléculaire, CHU de Strasbourg, Strasbourg, France, ¹¹Service de Pathologies Professionnelles, CHU de Strasbourg, Strasbourg, France and ¹²Service d'Urgences Medico-Chirurgicales Adultes, CHU de Strasbourg, Strasbourg, France

To the Editor—The severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) emerged in China at the end of 2019 and spread worldwide, leading to the current pandemic. During the first pandemic wave in France, the northeastern region was one of the first and most affected areas. Thus, healthcare workers (HCWs) in the Strasbourg University Hospitals (SUH) were early and intensively exposed to SARS-CoV-2. This exposure varied between hospital departments, notably at the beginning of the pandemic. Some departments were rapidly dedicated to the care of SARS-CoV-2 patients, with earlier implementation and use of personal protective equipment (PPE). In this study, we evaluated SARS-CoV-2 seroprevalence in hospital staff according to department in SUH.

From June 22, 2020, to November 1, 2020, SARS-CoV-2 serology was offered to all hospital staff at SUH. Each participant completed a questionnaire collecting data about their occupational department and the onset of symptoms (ie, type of symptoms and delay expressed in weeks between onset and serum sampling time). Serum samples were tested using an immunochromatographic lateral flow assay (Biosynex COVID-19 BSS, Switzerland, Fribourg) detecting IgM and IgG directed against the receptor binding domain of SARS-CoV-2 spike protein (Supplementary Fig. 1 online). This assay was reported to have overall estimated sensitivity of 93% and clinical specificity of 99%.¹

Univariable and multivariable analyses were performed using R version 4.0.4 software (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Statistical significance was set at $P < .05$. Hospital departments were grouped together according to staff exposure risk

for multivariable analysis (see Supplementary Material online for statistical analysis detail). This study was approved by the local ethics review committee (record CE-2021-79).

In total, 5,694 HCWs participated in this study. Participant characteristics and serological results of the cohort are presented in Supplementary Table 1 (online). The mean age was 40.4 years (SD, ± 11.7). In total, 482 participants had positive serology (8.5%) and among them, 422 participants answered about the onset of symptoms, including 48% of asymptomatic subjects (Supplementary Fig. 2 and Supplementary Table 1 online). The seropositive and symptomatic subjects predominantly reported anosmia (29.2%) and ageusia (27.2%).

The departments in the “geriatric group” showed the highest seroprevalence rate (27.7%) (Supplementary Table 2 online) and a strong association with seropositive status (OR, 5.3; 95% CI, 3.5–8.2; $P < .05$) (Supplementary Table 3 online and Fig. 1). Seroprevalence rates in the frontline departments were all lower than in the geriatric group: internal medicine department (which contains the infectious disease department, 15%), department of thoracic pathology (11.6%), anesthesia and reanimation department (7.9%), and emergency departments (8.1%).

However, the seroprevalence rate of 8.5% was concordant with those reported in the literature in Europe,² and we found a high rate of asymptomatic infections (48%). Remarkably, working in a geriatric department was associated with positive serology. The high rate of seroconversion among staff in the geriatric department contrasted with low seroconversion rates among staff in departments on the frontline from the start of the pandemic.

Many contributing factors could explain this high seroprevalence. First, the onset of 2 clusters of contamination in geriatric departments, from the beginning of March 2020, led to contamination of caregivers. At the onset of the pandemic, no guidelines were in place for systematically wearing a surgical mask (ie, this obligation was implemented on March 23, 2020). Second, even when the wearing

Author for correspondence: Samira Fafi-Kremer, E-mail samira.fafi-kremer@chru-strasbourg.fr

Cite this article: Panaget B, et al. (2021). High severe acute respiratory coronavirus virus 2 (SARS-CoV-2) seroconversion rate among geriatric staff from Strasbourg University Hospitals. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, <https://doi.org/10.1017/ice.2021.402>

RESEARCH

Clinical characteristics and risk factors associated with severe COVID-19: prospective analysis of 1,045 hospitalised cases in North-Eastern France, March 2020

Charlotte Kaeuffer¹, Coralie Le Hyaric^{1,2}, Thibaut Fabacher^{2,3}, Joy Mootien⁴, Benjamin Dervieux⁵, Yvon Ruch¹, Antonin Hugerot¹, Yves-Jean Zhu¹, Valentin Pointurier⁴, Raphael Clere-Jehl⁶, Valentin Greigert⁷, Loïc Kassegne⁸, Nicolas Lefebvre¹, Floriane Gallais⁹, Covid Alsace Study Group¹⁰, Nicolas Meyer^{3,11}, Yves Hansmann¹, Olivier Hirschberger⁵, François Danion¹

1. CHU de Strasbourg, Department of Infectious and Tropical Diseases; Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

2. These authors contributed equally

3. Université de Strasbourg, ICube, équipe IMAGeS, UMR7357, Strasbourg, France

4. Groupe Hospitalier Régional Mulhouse Sud Alsace, Intensive Care Unit, Mulhouse, France

5. Groupe Hospitalier Régional Mulhouse Sud Alsace, Department of Internal Medicine, Mulhouse, France

6. CHU de Strasbourg, Medical Intensive Care Unit, Nouvel Hôpital Civil, Strasbourg, France

7. CHU de Strasbourg, Department of Internal Medicine, Nouvel Hôpital Civil, Strasbourg, France

8. CHU de Strasbourg, Department of Pneumology, Strasbourg

9. CHU de Strasbourg, Department of Virology, Fédération de Médecine Translationnelle, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

10. The members of the Covid Alsace Study Group are listed at the end of the article

11. CHU de Strasbourg, Department of Public Health, GMRC, Strasbourg, France

Correspondence: François Danion (francois.danion@chru-strasbourg.fr)

Investigator group:

COVID Alsace Study Group: Hamid Merdji, Paul-Michel Mertes, Walid Oulehri, Charles Tacquard, Olivier Collange, Pierre-Olivier Ludes, Sophie Diemunsch, Francis Schneider, Thomas Lemmet, Anne-Sophie Damour, Martin Behr, Pierrick Le Borgne, Emmanuel Chatelus, Renaud Felten, Adrien Zecchi, Flavie Maitrepierre, Jean-Edouard Terrade, Louis Boehn, Abrar Ahmad Zulfiqar, Aurélien Guffroy, Vincent Poindron, Sylvain Lescuyer, Elise Schmitt, Cédric Waechter, Cécile Ronde-Oustau, Frédéric De Blay, Philippe Fraisse, Peggy Perrin, Nicolas Keller, Mary Pontvianne, Fanny De Marcillac, Philippe Deruelle, Marie-Laure Legris, Mégane Wehr, Floriane Zeyons, Jean-Jacques Von Hunolstein, Pierre Leyendecker, Mickael Ohana, Aïssam Labani, Clémence Risser, Thibaut Goetsch, Noémie Leclerc Du Sablon, Marion Ehret, Frederic Vinee, Myriam Bernard, Clémence Koch, Arnaud Waegell, Léa Dormegnny, Alexandra Daguet, Stéphanie Deboscker, Thierry Lavigne, Samira Fafi-Kremer, Aurélie Velay, Morgane Solis, Marie-Josée Wendling, Héloïse Delagreverie, Ilies Benotmane, Elise Dicop, Lionel Martzolf, Pierre Oudeville

Citation style for this article:

Both L, Botgros R, Cavaleri M. Analysis of licensed over-the-counter (OTC) antibiotics in the European Union and Norway, 2012. Euro Surveill. 2015;20(34):pii=30002. DOI: <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2015.20.34.30002>

Article submitted on 11 May 2020 / accepted on 14 Aug 2020 / published on 03 Dec 2020

Background: In March 2020, the COVID-19 outbreak was declared a pandemic by the World Health Organization. **Aim:** Our objective was to identify risk factors predictive of severe disease and death in France. **Methods:** In this prospective cohort study, we included patients ≥ 18 years old with confirmed COVID-19, hospitalised in Strasbourg and Mulhouse hospitals (France), in March 2020. We respectively compared patients who developed severe disease (admission to an intensive care unit (ICU) or death) and patients who died, to those who did not, by day 7 after hospitalisation. **Results:** Among 1,045 patients, 424 (41%) had severe disease, including 335 (32%) who were admitted to ICU, and 115 (11%) who died. Mean age was 66 years (range: 20–100), and 612 (59%) were men. Almost 75% of patients with body mass index (BMI) data ($n=897$) had a BMI ≥ 25 kg/m² ($n=661$). Independent risk factors associated with severe disease were advanced age (odds ratio (OR): 1.1 per 10-year increase; 95% CrI (credible interval): 1.0–1.2), male sex (OR: 2.1; 95% CrI: 1.5–2.8), BMI of 25–29.9 kg/m² (OR: 1.8; 95% CrI: 1.2–2.7) or ≥ 30 (OR: 2.2; 95% CrI: 1.5–3.3), dyspnoea (OR: 2.5; 95% CrI: 1.8–3.4) and inflammatory parameters (elevated C-reactive protein and neutrophil count, low lymphocyte count). Risk factors associated

with death were advanced age (OR: 2.7 per 10-year increase; 95% CrI: 2.1–3.4), male sex (OR: 1.7; 95% CrI: 1.1–2.7), immunosuppression (OR: 3.8; 95% CrI: 1.6–7.7), diabetes (OR: 1.7; 95% CrI: 1.0–2.7), chronic kidney disease (OR: 2.3; 95% CrI: 1.3–3.9), dyspnoea (OR: 2.1; 95% CrI: 1.2–3.4) and inflammatory parameters. **Conclusions:** Overweightness, obesity, advanced age, male sex, comorbidities, dyspnoea and inflammation are risk factors for severe COVID-19 or death in hospitalised patients. Identifying these features among patients in routine clinical practice might improve COVID-19 management.

Introduction

An outbreak of pneumonia linked to a new coronavirus termed severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) was first reported in Wuhan, China, in December 2019 [1]. Coronavirus disease 2019 (COVID-19), which is caused by this virus, then rapidly spread globally resulting in a pandemic. On 13 March 2020, the World Health Organization (WHO) declared Europe the new epicentre of the pandemic, as more cases and deaths were reported there at that time compared to other areas of the world [2]. Among European countries, Italy, France, Spain and the United Kingdom

Étude fonctionnelle de l'immunité adaptative post-infectieuse et post-vaccinale dirigée contre le SARS-CoV-2

Résumé

L'immunité adaptative développée contre le SARS-CoV-2 après infection ou vaccination est le facteur clé dans la protection contre de nouveaux épisodes de COVID-19.

Au cours de ce travail, après avoir montré la possibilité d'une réponse cellulaire sans anticorps suite à l'exposition au virus, une étude de cohorte a révélé que les anticorps développés après infection évoluaient différemment en fonction du sexe et persistaient plus d'un an. Un défaut de réponse humorale a été observé chez des patients immunodéprimés traités par rituximab dans les 6 mois précédents ainsi que chez des patients transplantés pulmonaires, en particulier ceux avec une charge virale élevée de TTV reflétant une profonde immunodépression. Enfin, l'étude de 2 cas d'infection post-vaccinale a souligné l'implication possible de différents mécanismes. Ces résultats enrichissent nos connaissances de l'immunité dirigée contre le SARS-CoV-2, cruciales dans la gestion de la pandémie et dans notre projection dans l'avenir.

Mots-clés : SARS-CoV-2, immunité adaptative, anticorps, COVID-19, vaccination

Abstract

The adaptive immunity developed against SARS-CoV-2 after infection or vaccination is the key factor for the protection against other COVID-19 episodes.

In this work, after we showed that an isolated cellular response could be found without antibodies after exposure to the virus, a cohort study revealed that antibodies induced by infection evolve differently according to sex and persist more than one year. A lack of humoral response was observed in patients treated by rituximab over the last 6 months and in lung transplant recipients, particularly in those with a high TTV DNA load reflecting a deep immunosuppression. Finally, the exploration of 2 cases of breakthrough infection in immunocompetent individuals highlighted the possible involvement of distinct mechanisms.

These results improve our knowledge of the immunity directed against SARS-CoV-2, which is crucial for the management of the pandemic and for our projection into the future.

Keywords: SARS-CoV-2, adaptive immunity, antibodies, COVID-19, vaccination