

UNIVERSITÉ TOULOUSE III PAUL SABATIER
FACULTÉ DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ANNÉE : 2022

THÈSE 2022/TOU3/2091

THÈSE

POUR LE DIPLÔME DE DOCTEUR EN PHARMACIE
SPÉCIALITÉ BIOLOGIE MÉDICALE

Présentée et soutenue publiquement par

LIGNIER Gauthier

ÉVALUATION DE L'INTÉRÊT PRÉDICTIF DE LA CALPROTECTINE
SÉRIQUE DANS L'ÉVOLUTION D'UNE PRIMO-INFECTION À SARS-
CoV-2

Le 14 octobre 2022

Directrice de thèse : Madame la Docteure MAUPAS-SCHWALM Françoise

JURY

Madame la Professeure COUDERC Bettina : Présidente
Madame la Docteure MAUPAS-SCHWALM Françoise : 1^{ère} Assesseure
Monsieur le Professeur AUSSEIL Jérôme : 2^{ème} Assesseur
Monsieur le Professeur LEVADE Thierry : 3^{ème} Assesseur

PERSONNEL ENSEIGNANT
du Département des Sciences Pharmaceutiques de la Faculté de santé
au 4 avril 2022

Professeurs Emérites

Mme BARRE A.	Biologie Cellulaire
M. BENOIST H.	Immunologie
M. BERNADOU J.	Chimie Thérapeutique
M. CAMPISTRON G.	Physiologie
Mme NEPVEU F.	Chimie analytique
Mme ROQUES C.	Bactériologie - Virologie
M. ROUGE P.	Biologie Cellulaire
M. SALLES B.	Toxicologie

Professeurs des Universités

Hospitalo-Universitaires

Mme AYYOUB M.	Immunologie
M. CESTAC P.	Pharmacie Clinique
M. CHATELUT E.	Pharmacologie
Mme DE MAS MANSAT V.	Hématologie
M. FAVRE G.	Biochimie
Mme GANDIA P.	Pharmacologie
M. PARINI A.	Physiologie
M. PASQUIER C.	Bactériologie - Virologie
Mme ROUSSIN A.	Pharmacologie
Mme SALLERIN B.	Pharmacie Clinique
M. VALENTIN A.	Parasitologie

Universitaires

Mme BERNARDES-GENISSON V.	Chimie thérapeutique
Mme BOUTET E.	Toxicologie - Sémiologie
Mme COUDERC B.	Biochimie
M. CUSSAC D. (Vice-Doyen)	Physiologie
M. FABRE N.	Pharmacognosie
Mme GIROD-FULLANA S.	Pharmacie Galénique
M. GUIARD B.	Pharmacologie
M. LETISSE F.	Chimie pharmaceutique
Mme MULLER-STAUMONT C.	Toxicologie - Sémiologie
Mme REYBIER-VUATTOUX K.	Chimie analytique
M. SEGUI B.	Biologie Cellulaire
Mme SIXOU S.	Biochimie
M. SOUCHARD J-P.	Chimie analytique
Mme TABOULET F.	Droit Pharmaceutique

Maîtres de Conférences des Universités

Hospitolo-Universitaires		Universitaires	
M. DELCOURT N.	Biochimie	Mme ARELLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme JUILLARD-CONDAT B.	Droit Pharmaceutique	Mme AUTHIER H.	Parasitologie
Mme KELLER L.	Biochimie	M. BERGE M. (*)	Bactériologie - Virologie
M. PUISSET F.	Pharmacie Clinique	Mme BON C. (*)	Biophysique
Mme ROUCH L.	Pharmacie Clinique	M. BOUJILA J. (*)	Chimie analytique
Mme ROUZAUD-LABORDE C	Pharmacie Clinique	M. BROUILLET F.	Pharmacie Galénique
Mme SALABERT A.S.	Biophysique	Mme CABOU C.	Physiologie
Mme SERONIE-VIVIEN S (*)	Biochimie	Mme CAZALBOU S. (*)	Pharmacie Galénique
Mme THOMAS F. (*)	Pharmacologie	Mme CHAPUY-REGAUD S. (*)	Bactériologie - Virologie
		Mme COLACIOS C.	Immunologie
		Mme COSTE A. (*)	Parasitologie
		Mme DERAEEVE C. (*)	Chimie Thérapeutique
		Mme ECHINARD-DOUIN V.	Physiologie
		Mme EL GARAH F.	Chimie Pharmaceutique
		Mme EL HAGE S.	Chimie Pharmaceutique
		Mme FALLONE F.	Toxicologie
		Mme FERNANDEZ-VIDAL A.	Toxicologie
		Mme GADEA A.	Pharmacognosie
		Mme HALOVA-LAJOIE B.	Chimie Pharmaceutique
		Mme JOUANJUS E.	Pharmacologie
		Mme LAJOIE-MAZENC I.	Biochimie
		Mme LEFEVRE L.	Physiologie
		Mme LE LAMER A-C. (*)	Pharmacognosie
		M. LE NAOUR A.	Toxicologie
		M. LEMARIE A.	Biochimie
		M. MARTI G.	Pharmacognosie
		Mme MONFERRAN S	Biochimie
		M. PILLOUX L.	Microbiologie
		M. SAINTE-MARIE Y.	Physiologie
		M. STIGLIANI J-L.	Chimie Pharmaceutique
		M. SUDOR J. (*)	Chimie Analytique
		Mme TERRISSE A-D.	Hématologie
		Mme TOURRETTE-DIALLO A. (*)	Pharmacie Galénique
		Mme VANSTEELANDT M.	Pharmacognosie
		Mme WHITE-KONING M. (*)	Mathématiques

(*) Titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

Enseignants non titulaires

Assistants Hospitolo-Universitaires		Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche (ATER)	
M. AL SAATI A	Biochimie	Mme AMRANE Dubia	Chimie Thérapeutique
Mme BAKLOUTI S.	Pharmacologie		
Mme CLARAZ P.	Pharmacie clinique		
Mme CHAGNEAU C.	Microbiologie		
Mme LARGEAUD L	Immunologie		
M. LE LOUEDEC F.	Pharmacologie		
Mme STRUMIA M.	Pharmacie clinique		
Mme TRIBAUDEAU L.	Droit Pharmaceutique		

REMERCIEMENTS

À Madame la Professeure Bettina Couderc,

Je vous remercie d'avoir accepté de présider ce jury et de l'intérêt que vous avez voulu porter à mon travail. Soyez assurée de ma gratitude.

À Madame la Docteure Françoise Maupas-Schwalm,

Je vous suis très reconnaissant d'avoir voulu diriger ma thèse. Une présence et un suivi dont j'ai apprécié les échanges constructifs ainsi qu'un état d'esprit et une vision que je partage. Ce fut pour moi une très belle expérience dont je garderai un bon souvenir. Merci encore.

À Monsieur le Professeur Jérôme Ausseil,

Je vous suis très reconnaissant d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Merci pour vos enseignements et votre pédagogie lors de mon semestre en Biochimie.

À Monsieur le Professeur Thierry Levade,

Je suis très honoré que vous ayez accepté de siéger à ce jury et de l'intérêt que vous portez à mon travail. Je vous remercie pour votre disponibilité et votre bienveillance. Soyez assuré de mon plus profond respect.

À ma famille, à Nada, à ma belle-famille, à mes amis, à mes cointernes et toute l'équipe du laboratoire...

Table des matières

Table des matières	5
Figures	9
Tables	9
Revue	11
I- Structure générale du virus SARS-CoV-2 :	12
II- Mode de transmission du virus SARS-CoV-2 :	13
III- Incubation et symptomatologie du Covid-19 :	15
IV- Pronostic et létalité du Covid-19 :	16
1. Critères cliniques associés à la gravité du Covid-19 :	16
a) Facteurs socio-démographiques :	16
b) Antécédents médicaux et comorbidités :	17
c) Symptômes et atteintes organiques :	17
i) Symptômes respiratoires et autres signes cliniques fréquemment retrouvés :	17
ii) Fonction rénale :	18
iii) Fonction cardiaque :	19
2. Critères paracliniques :	20
a) Critères biologiques :	20
i) C Reactive protein (CRP) :	20
ii) Médiateurs de l'inflammation :	20
iii) Numération Formule Sanguine :	21
b) Données radiologiques :	21
3. Scores composites :	23
a) SOFA et quickSOFA :	23
b) Score de Fine :	24
c) SAPSII :	25
d) Score CALL :	25
e) Covid-Score :	26
V- Calprotectine :	28
1. Généralités :	28
2. Nomenclature et conformation :	28
3. Fonctions de la calprotectine :	28
4. Calprotectine et SARS-CoV-2 :	29
VI- But de l'étude :	30
Matériel et Méthodes :	31
I- Conception de l'étude :	31

1. Éthique :	31
2. Population de l'étude :	32
3. Schéma de la recherche :	33
a) Inclusion des patients et constitution d'une collection biologique temporaire :	33
b) Réalisation des dosages de Calprotectine sérique :	34
II- Collecte de données :	34
III- Variables étudiées :	35
1. Variable d'intérêt : Calprotectine sérique :	35
a) Fiche technique :	35
b) Validation de méthode :	36
2. Autres variables recueillies :	37
a) Données socio-démographiques :	37
b) Données cliniques :	37
c) Données biologiques et radiologiques :	39
d) Scores composites :	40
e) Analyse statistique :	41
Résultats	44
I- Répartition des patients de l'étude par diagnostic de gravité :	44
II- Dosage de la calprotectine sérique :	45
III- Détermination d'une valeur seuil d'intérêt de la calprotectine sérique :	47
1- Décès versus non décès :	47
2- Patients graves (décès, réanimation) versus les autres patients :	48
3- Patients graves (décès, réanimation) et pneumopathie oxygénorequérante versus les autres patients :	48
IV- Variables associées à une gravité clinique :	49
1- Variables socio-démographiques :	49
2- Variables cliniques :	50
3- Antécédents médicaux :	51
4- Traitements habituels et en pré-hospitalisation :	52
5- Variables biologiques et radiologiques :	53
V- Comparaison de la calprotectine sérique aux autres variables trouvées d'intérêt dans la prédiction de la gravité :	55
VI- Scores composites d'intérêt prédictif de gravité et comparaison à la calprotectine sérique :	57
Discussion	60
Conclusion et perspectives	63
Bibliographie	64

Liste des abréviations

- **OMS** : Organisation Mondiale de la Santé
- **kb** : kilobases
- **S** : Protéine de surface Spike ou S
- **M** : Protéine de membrane
- **E** : Protéine d'enveloppe
- **N** : Protéine de nucléocapside
- **HE** : Hémagglutinine-estérase
- **RBD** : Receptor Binding Domain
- **RBM** : Receptor Binding Motif
- **ORF** : Open Reading Frame
- **UTR** : Untranslated Region
- **ACE2** : Angiotensin Converting Enzyme
- **TMPRSS2** : Sérine protéase transmembranaire
- **ANSM** : Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé
- **PaO₂** : Pression partielle de l'oxygène dans le sang artériel
- **FiO₂** : Fraction inspirée en oxygène
- **SaO₂** : Saturation en oxygène
- **NYHA** : New-York Heart Association
- **NHC** : National Health Commission
- **SCA ST+** : Syndrome Coronarien Aigu avec sus-décalage du segment ST
- **IL** : Interleukine
- **CRP** : Protéine C-Réactive
- **PCT** : Procalcitonine
- **TDM** : Tomodensitométrie
- **SOFA** : Sepsis-related Organ Failure Assessment
- **qSOFA** : Quick SOFA
- **PAD** : Pneumopathie Acquise à Domicile
- **TA** : Tension Artérielle
- **T°** : Température
- **Na** : Sodium
- **K** : Potassium
- **SAPS** : Simplified Acute Physiology Score
- **LDH** : Lactate Déshydrogénase
- **IMC** : Indice de Masse Corporelle
- **PNN** : Polynucléaire Neutrophile
- **RIPH** : Recherche Impliquant la Personne Humaine
- **ANSM** : Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé
- **CPP** : Comité de Protection des Personnes
- **CNIL** : Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés
- **INDS** : Institut National des Données de Santé
- **CHU** : Centre Hospitalier Universitaire
- **PCR** : Polymerase Chain Reaction
- **PTA** : Plateau Technique Automatisé
- **ECMO** : Extracorporeal Membrane Oxygenation

- **AVC** : Accident Vasculaire Cérébral
- **BPCO** : Bronchopneumopathie Chronique Obstructive
- **SAOS** : Syndrome d'Apnées Obstructives du Sommeil
- **MTE** : Maladie Thrombo-Embolique
- **ATCD** : Antécédents médicaux
- **HTA** : Hypertension artérielle
- **Diab** : Diabète
- **K** : Cancer
- **TTT** : Traitement
- **Fr** : Fréquence respiratoire
- **Fc** : Fréquence cardiaque
- **IMC** : Indice de Masse Corporelle
- **CalpS** : Calprotectine sérique
- **DFG** : Débit de Filtration Glomérulaire
- **NFS** : Numération Formule Sanguine
- **PAS** : Pression Artérielle Systolique
- **AUC** : Area Under Curve
- **VP** : Vrai positif
- **VN** : Vrai négatif
- **FP** : Faux positif
- **FN** : Faux négatif
- **IC 95%** : Intervalle de confiance à 95%
- **Se** : Sensibilité
- **Spe** : Spécificité
- **+LR** : Rapport de vraisemblance positif
- **-LR** : Rapport de vraisemblance négatif
- **VPN** : Valeur prédictive négative
- **OR** : Rapport de cotes
- **PCA** : Analyse en composante principale
- **RR** : Risque Relatif

Figures

Figure 1 : Structure schématisée du SARS-CoV-2(5)	12
Figure 2 : Structure schématisée du génome du SARS-CoV-2(5)	13
Figure 3 : Le cycle de multiplication intracellulaire du SARS-CoV-2(5).....	14
Figure 4 : Éléments de calcul du Covid-Score en fonction du sexe et de l'âge (56). 27	
Figure 5 : Organisation de la recherche biomédicale en France après la loi Jardé ..	31
Figure 6 : Schématisation du dosage de la calprotectine sérique par immunoturbidimétrie	35
Figure 7 : Validation du non impact de la congélation à -80°C sur les valeurs de la calprotectine sur sept échantillons.....	37
Figure 8 : Modèle de courbe ROC.....	42
Figure 9 : Répartition des patients selon leur gravité en fonction du diagnostic retenu à l'issue de leur hospitalisation	44
Figure 10 : Valeurs de calprotectine sérique chez les patients inclus.....	45
Figure 11 : Répartition des valeurs de calprotectine sérique en fonction des groupes de patients.....	46
Figure 12 : Évaluation de la corrélation entre les valeurs de CalpS et la gravité clinique	46
Figure 13 : Représentation graphique d'une courbe ROC déterminée à partir des valeurs de CalpS mesurées chez des patients du groupe 1 comparés aux patients des groupes 2,3,4,5,6,7.....	47
Figure 14 : Représentation graphique d'une courbe ROC déterminée à partir des valeurs de CalpS mesurées chez des patients des groupes 1,2,3 comparé aux patients des groupes 4,5,6,7	48
Figure 15 : Représentation graphique d'une courbe ROC déterminée à partir des valeurs de CalpS mesurées chez des patients des groupes 1,2,3,4 comparé aux patients des groupes 5,6,7.....	49
Figure 16 : Répartition de l'âge en fonction des groupes de patients	49
Figure 17 : Répartition des variables cliniques d'intérêt en fonction des groupes de patients.....	50
Figure 18 : Répartition des antécédents médicaux d'intérêt en fonction des groupes de patients.....	51
Figure 19 : Répartition des traitements d'intérêt en fonction des groupes de patients	52
Figure 20 : Répartition des variables biologiques et radiologiques d'intérêt en fonction des groupes de patients.....	54
Figure 21 : Courbes ROC cumulées de la calprotectine sérique et des variables d'intérêt dans la prédiction du risque des patients présentant une primo-infection à SARS-CoV-2.....	55
Figure 22 : Analyse en composante principale (PCA) de la calprotectine sérique, des variables biologiques et radiologiques d'intérêt ainsi que l'âge.....	56
Figure 23 : Répartition des scores clinico-biologiques d'intérêt prédictif de gravité en fonction des groupes de patients.....	57
Figure 24 : Courbes ROC cumulées de la calprotectine et des scores d'intérêt dans la prédiction du risque des patients présentant une primo-infection à SARS-CoV-2	58
Figure 25 : Analyse en composante principale (PCA) des scores d'intérêt et de la calprotectine sérique.....	59

Tables

Tableau 1 : Paramètres et valeurs permettant le calcul du score SOFA (41).....	23
Tableau 2 : Évaluation de la probabilité de mortalité d'une PAD à 30 jours en fonction du nombre de points obtenus selon les paramètres composant le score de Fine (53)	24
Tableau 3 : Paramètres composant le score de Fine et points à attribuer en fonction des résultats (53)	24
Tableau 4 : Probabilité de mortalité des patients admis en unité de soins intensifs en fonction du score SAPSII (54).....	25
Tableau 5 : Paramètres composant le score CALL et points à attribuer en fonction de la cotation du paramètre (55)	26
Tableau 6 : Valeurs attendues des contrôles haut et bas issues du fournisseur	35
Tableau 7 : Répétabilité initiale des contrôles qualité effectuée sur 10 points	36
Tableau 8 : Reproductibilité des contrôles qualité effectuée sur 13 et 14 points	36
Tableau 9 : Constitution des groupes de patients pour le calcul de la sensibilité et de la spécificité.....	41

Revue

Le SARS-CoV-2 appartient à la famille des coronavirus dont le nom provient des protéines de structure qui forment une couronne à la surface du virus. Il subsiste toujours un doute au sujet de l'origine exacte du virus (1), cependant le virus a été identifié officiellement dans la province chinoise de Wuhan en novembre 2019.

Un mois plus tard, les autorités chinoises recensent une dizaine de cas, principalement des travailleurs du marché de fruits de mer de Huanan. Ces personnes sont hospitalisées pour pneumopathie à l'hôpital de Wuhan et l'origine de l'agent pathogène ne parvient pas à être identifié malgré l'utilisation d'un kit diagnostic ciblant 18 virus et 4 bactéries respiratoires.(2)

Le 31 décembre 2019, les autorités chinoises informent officiellement l'OMS qu'une pneumonie d'origine inconnue est apparue à Wuhan et 44 cas sont recensés au 3 janvier 2020.(3)

L'OMS décrit les modes de transmission de ce nouveau virus et établi en janvier 2021 que cette maladie peut se transmettre entre humains, bien que la contamination puisse être comparable aux autres coronavirus.(4)

Cette épidémie est considérée au 30 janvier par l'OMS comme une urgence de santé publique de portée internationale et nomme officiellement cette maladie « maladie à coronavirus 2019 » (Covid-19) le 11 février.

Le directeur général de l'OMS annonce via une allocution le 11 mars 2020 que la Covid-19 est une pandémie, une première dans l'histoire des coronavirus.

Dans cette revue générale, nous aborderons plusieurs points : tout d'abord un point sur la structure générale du virus, puis nous détaillerons les modes de transmission de cette maladie et enfin, nous parlerons de l'incubation du virus et de sa symptomatologie chez l'homme.

Ensuite, nous aborderons le pronostic et la létalité du Covid-19 à travers des critères cliniques, paracliniques et certains scores pronostiques.

Puis nous parlerons par la calprotectine : son dosage en routine au niveau fécal en tant que biomarqueur des maladies inflammatoires du tube digestif ainsi que la calprotectine sérique qui est un marqueur innovant, non utilisé en pratique courante. L'expression de cette protéine dans le sérum lors d'un processus inflammatoire nous a poussé à étudier son intérêt dans l'infection au SARS-CoV-2.

Enfin, nous ferons un point sur le but de l'étude.

I- Structure générale du virus SARS-CoV-2 :

Il s'agit d'un virus à ARN enveloppé simple brin à polarité positive dont le génome (30kb) code pour 15 gènes dont 4 correspondent à des protéines de structure :

- 1 protéine de surface (protéine *SPIKE* ou S)
- 1 protéine de membrane (M)
- 1 protéine d'enveloppe (E)
- 1 protéine de nucléocapside (N)
- On retrouve également une hémagglutinine-estérase (HE)

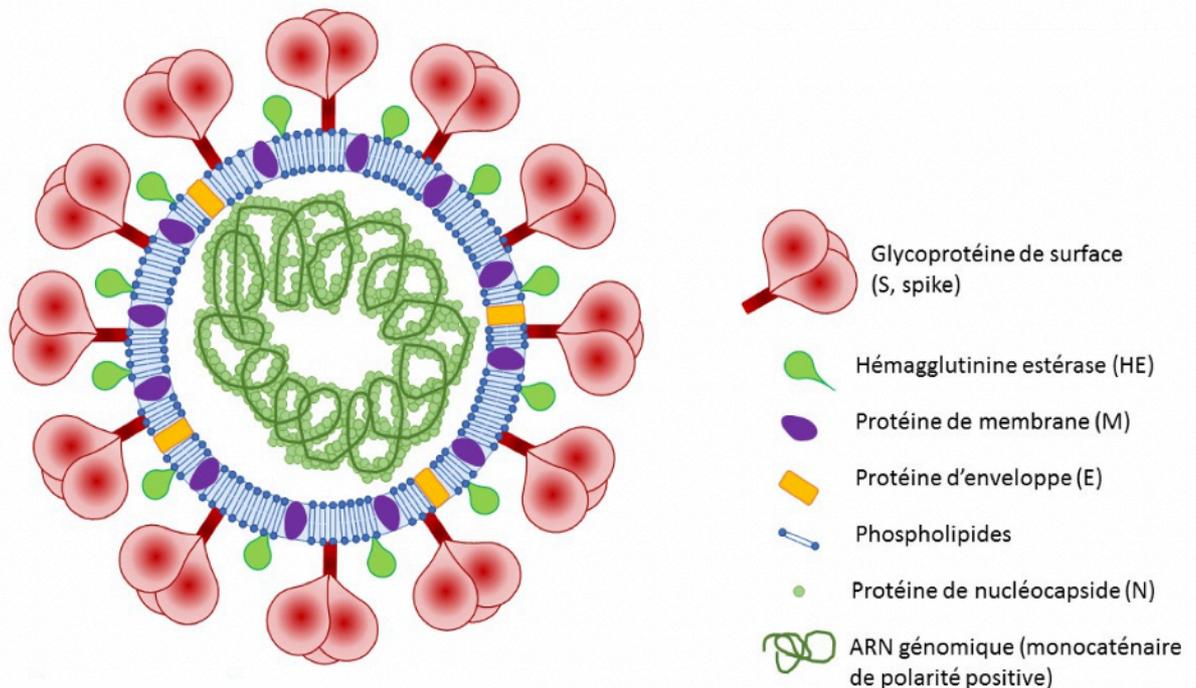


Figure 1 : Structure schématisée du SARS-CoV-2(5)

La protéine S est composée de deux sous-unités, S1 et S2. On retrouve le domaine de liaison au récepteur (RBD) contenant le motif de liaison au récepteur (RBM) dans la sous-unité S1 et le peptide de fusion dans la sous-unité S2.

Cette protéine S induit la production d'anticorps neutralisants pour le sujet infecté. Le génome du SARS-CoV-2 comporte environ 30 kb comprenant 10 cadres de lecture ouverts (ORF) et code 30 protéines. En 5', on retrouve une séquence non codante et l'ORF1ab codant une polyprotéine non structurale, scindée en 16 protéines non structurales, dont l'ARN polymérase ARN dépendante, les gènes codant les protéines de structure S, E, M et N. L'ORF1a code les protéines 1 à 11 et l'ORF1b celles de 12 à 16.(6)(7)(8)(9)

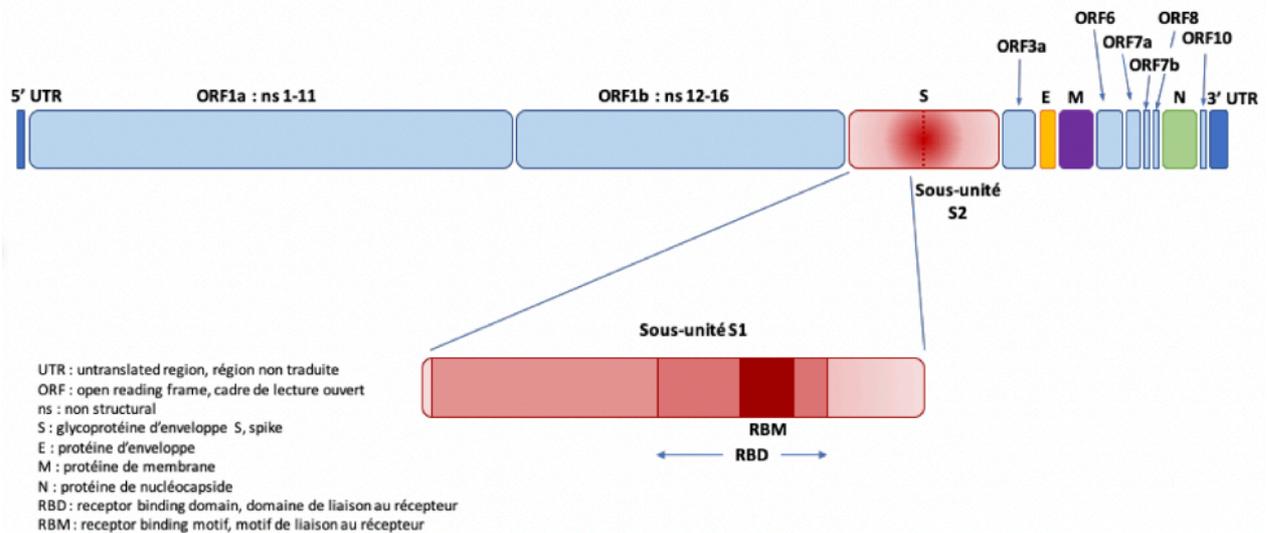


Figure 2 : Structure schématisée du génome du SARS-CoV-2(5)

II- Mode de transmission du virus SARS-CoV-2 :

Le SARS-CoV-2 est principalement transmis par voie aérienne (micro-gouttelettes et aérosols) et par contact direct avec la personne infectée ou une surface contaminée. Une partie de sa protéine de surface (la région RBD) se fixe au récepteur ACE2 exprimé à la surface des cellules des voies respiratoires mais également à celle de nombreuses cellules de l'organisme humain : épithélium du nez, de la trachée, des bronches, des glandes séreuses bronchiques, des alvéoles pulmonaires, des monocytes et macrophages alvéolaires, des cellules endothéliales et des myocytes des vaisseaux sanguins, des entérocytes de l'intestin grêle, des cellules épithéliales des tubules rénaux et des neurones.(10)

Après le clivage de la protéine S en sous-unités S1 et S2 par la TMPRSS2 (protéase transmembranaire sérine 2), S1 se fixe sur le récepteur ACE2 via RBD et RBM. S2 permet la fusion entre la membrane plasmique et l'enveloppe virale. Le virus entre dans la cellule par endocytose. Après fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de la vésicule d'endocytose, la nucléocapside est relarguée dans le cytoplasme et l'ARN viral est libéré par décapsidation. Les ORF1a et b sont traduites en polyprotéines 1a et 1b qui vont être clivées par des protéases issues de 1a pour former le complexe de ARN réplicase-transcriptase, constitué de 16 protéines non structurales. Ce complexe permet la synthèse d'ARN de polarité négative servant de

matrice pour la synthèse de nombreux ARN génomiques de polarité positive et d'ARN messagers. Au cours de la transcription, 7 à 9 ARN génomiques messagers sont produits, incluant ceux des protéines structurales. Les nucléocapsides sont assemblées à partir des nouveaux génomes et de la protéine N de capsid. Les protéines de l'enveloppe virale viennent se fixer dans les membranes de l'appareil de Golgi. Les virions produits se déplacent de la lumière de l'appareil de Golgi vers la surface cellulaire, la vésicule d'endocytose fusionne avec la membrane plasmique et les virions passent dans le milieu extracellulaire par exocytose.(7)

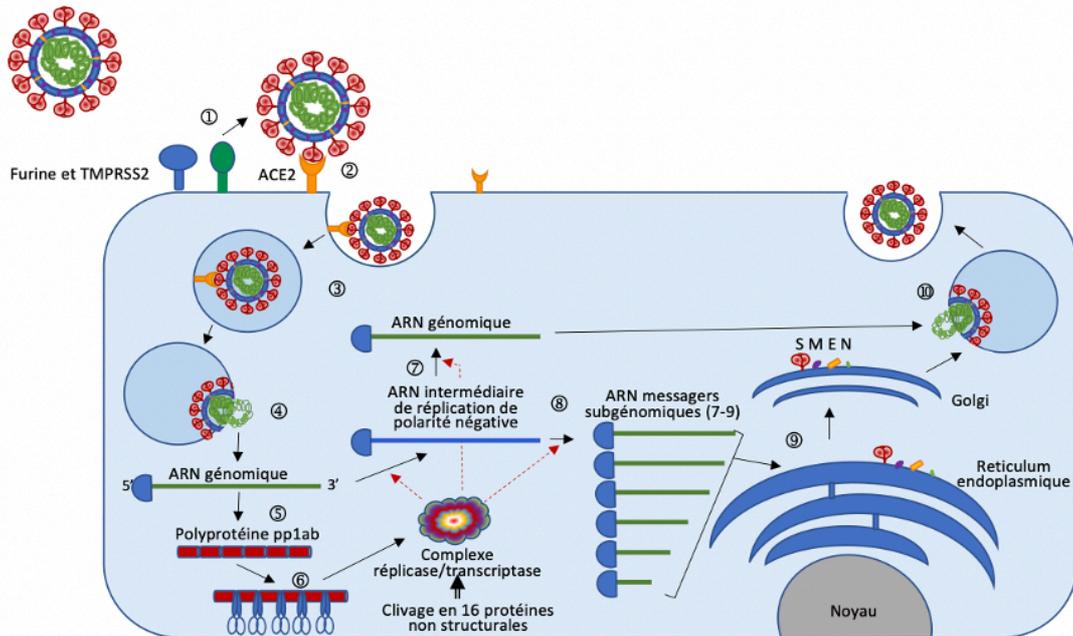


Figure 3 : Le cycle de multiplication intracellulaire du SARS-CoV-2(5)

TMPRSS2 : sérine protéase transmembranaire 2 ; ACE2 : angiotensin converting enzyme 2 ; S : protéine spike ; M : protéine de membrane ; E protéine d'enveloppe ; N : protéine de nucléocapside

- ① Activation de la protéine S par clivage par la protéase sérine 2 transmembranaire TMPRSS2 cellulaire en sous-unités S1 et S2.
- ② Fixation de S1 sur le récepteur ACE2 via la région RBD (receptor binding domain). S2 facilite la fusion entre la membrane plasmique et l'enveloppe virale.
- ③ Entrée du virion par endocytose.
- ④ Fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de la vésicule d'endocytose. Décapsidation et libération de l'ARN génomique.
- ⑤ Traduction des ORF1a et 1b en polyprotéine pp1ab.
- ⑥ Clivage de la pp1ab en 16 protéines non structurales NSP1 à NSP16 par une protéase virale et formation du complexe réplicase / transcriptase.
- ⑦ Réplication de l'ARN génomique viral de polarité positive grâce à l'ARN polymérase ARN dépendante avec passage par un ARN intermédiaire de réplication de polarité négative.
- ⑧ Synthèse des ARN subgénomiques messagers à partir de l'ARN intermédiaire de réplication.
- ⑨ Traduction des ARN subgénomiques messagers en protéines de structure.
- ⑩ Maturation et assemblage des nouveaux virions à partir des génomes et des protéines néoformées dans le reticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Sortie des nouveaux virions de la cellule par exocytose.

III- Incubation et symptomatologie du Covid-19 :

La période d'incubation se définit comme le délai entre la contamination et l'apparition des premiers symptômes et varie de 3 à 7 jours, dans certains cas elle peut atteindre 14 à 24 jours (<1% des cas). La médiane se situe à 5 jours.

On décrit trois types de malades :

- Ceux présentant peu de signes cliniques, avec une charge virale nasale élevée et très contagieux
- Un deuxième groupe composé de malades ayant des symptômes légers au départ et qui s'aggravent autour du dixième jour avec l'apparition d'un syndrome respiratoire aigu sévère malgré une diminution de la charge virale
- Les derniers sont des patients qui s'aggravent rapidement vers un syndrome respiratoire aigu et persistance d'une charge virale élevée dans les voies aériennes supérieures ainsi que l'apparition d'une virémie sanguine qui provoque une défaillance multiviscérale conduisant au décès. Cela concerne principalement les personnes âgées.(11)

Une analyse de l'OMS (12) menée auprès de 55 924 cas confirmés en Chine a établi les signes cliniques les plus fréquents et le pourcentage des personnes qui en ont souffert :

- Fièvre : 88%
- Anosmie : 70 à 86%
- Agueusie : 54 à 88%
- Toux sèche : 68%
- Fatigue : 38%
- Expectorations : 33%
- Essoufflement : 19%
- Douleurs osseuses ou articulaires : 15%
- Maux de gorge : 14%
- Maux de tête : 14%
- Frissons : 11%
- Nausées/vomissements : 5%
- Obstruction nasale : 5%
- Diarrhée : 4%
- Hémoptysie : 1%
- Gonflement des paupières : 1%

Les symptômes des formes graves sont les suivants selon l’OMS(12) :

- Essoufflement
- Perte d’appétit
- État confusionnel
- Douleurs/sensations d’oppression persistantes dans la poitrine
- Température élevée > 38°C

Dans 80% des cas, les symptômes restent légers à modérés et disparaissent entre 5 et 14 jours.

IV- Pronostic et létalité du Covid-19 :

La plupart des formes graves se développent dans la 2e semaine suivant l’apparition des symptômes, lorsqu’un syndrome hyperinflammatoire survient suite à l’infection des voies respiratoires : on parle d’orage cytokinique, ce dernier induisant une réponse immunitaire incontrôlée pouvant mettre en jeu le pronostic vital et imposer un passage en réanimation.

En France, lors de la première vague, près de 3% des patient ont dû être hospitalisés dont 0,8% en soins critiques avec une mortalité d’environ 0,5%.

Pour éviter une surcharge du système de santé, il a fallu identifier des critères objectifs qu’ils soient cliniques ou paracliniques, afin de diagnostiquer mais aussi pronostiquer la maladie.

L’objectif est d’identifier les patients à risque de complications afin de prédire la gravité de la maladie et son évolution, ainsi que mettre en place les moyens nécessaires en termes de capacités d’accueil dans les services de soins critiques.

Cependant, malgré de nombreuses études, aucune n’a permis de prédire avec certitude la gravité de l’infection ainsi que son pronostic évolutif.

Nous allons donc passer en revue certains critères (cliniques, paracliniques ou scores composites) utilisés aujourd’hui, qu’ils soient spécifiques ou non du SARS-CoV-2, et qui pourraient répondre à cet objectif.

1. Critères cliniques associés à la gravité du Covid-19 :

a) Facteurs socio-démographiques :

En 2021 une étude (13) menée par l’ANSM, l’Assurance Maladie et Epi-Phare sur 87800 personnes hospitalisées pour infection à SARS-CoV-2 et dont 15660 en sont décédés à l’hôpital, a retrouvé une différence significative entre les deux sexes : les hommes ont 1,4 fois plus de risque d’être hospitalisés et 2,1 fois plus de risque de décès.

L'étude a montré que les personnes âgées sont les plus vulnérables face au virus : par rapport aux 40-44 ans, le risque d'hospitalisation est doublé chez les 60-64 ans, triplé chez les 70-74 ans, multiplié par 6 chez les 80-84 ans et par 12 chez les plus de 90 ans.

Concernant la ventilation, une étude (14) portée sur 57420 patients infectés par le virus et qui présentent une détresse respiratoire nécessitant une ventilation mécanique invasive, a montré un taux de mortalité plus élevé chez les personnes de plus de 80 ans (84%) en comparaison avec les patients de moins de 40 ans (48%).

b) Antécédents médicaux et comorbidités :

Les antécédents médicaux et les comorbidités sont des éléments pronostiques importants du risque de développer une forme grave ou de décéder d'une infection au SARS-CoV-2.

Une méta-analyse (15) effectuée sur 32 articles a permis de détecter parmi toutes les comorbidités les plus fréquemment observées dans les formes graves et les décès liés au Covid-19 que l'hypertension artérielle a la prévalence la plus élevée (46%) et la prévalence la plus faible correspondant à l'asthme (3%).

c) Symptômes et atteintes organiques :

i) Symptômes respiratoires et autres signes cliniques fréquemment retrouvés :

L'hypotension artérielle, la tachycardie, la dyspnée, l'anorexie et la tachypnée sont des signes cliniques associés à un mauvais pronostic.(16)(17)

En revanche, l'anosmie a été décrite (18) comme un facteur de bon pronostic et elle est associée à une diminution du taux d'hospitalisation, d'entrée en soins intensifs, d'intubation et de syndrome de détresse respiratoire aiguë en comparaison avec l'absence de perte d'odorat. Sa prévalence varie, selon les études et la population étudiée, de 5,1% à 98,3%.(19)(20)

Cependant, une étude rétrospective (21) effectuée sur 214 patients infectés au SARS-CoV-2 contredit ces données : les symptômes les plus couramment retrouvés étaient l'anosmie et la dysgueusie et ces derniers n'avaient pas d'impact significatif sur la gravité de la maladie.

Également, un rapport $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200$ mmHg ainsi que la présence d'une insuffisance respiratoire aiguë à l'admission ont été indépendamment associés à un risque accru de mortalité à l'hôpital.

Ainsi, les critères de gravité suivants sont classiquement retenus :

- Fréquence respiratoire supérieure à 30 par minute
- Saturation en oxygène (SaO₂) au repos inférieure à 93%
- Rapport pression en oxygène sur concentration en oxygène (PaO₂/FiO₂) inférieur à 300 mmHg

Les personnes à risque de développer une forme grave sont, d'après le ministère des Solidarités et de la Santé français.(22)

- Les personnes âgées de 70 ans et plus
- Les patients présentant une insuffisance rénale chronique dialysée, ou une insuffisance cardiaque stade NYHA III ou IV
- Les malades atteints de cirrhose au score de Child-Pugh B minimum (encéphalopathie de grade 1 et 2, légère ascite, bilirubine entre 2-3 mg/dL, albumine entre 2,8-3,5 g/dL et INR entre 1,7-2,3)
- Les patients aux antécédents cardiovasculaires : hypertension artérielle, antécédent d'accident vasculaire cérébral ou de coronaropathie, chirurgie cardiaque
- Les diabétiques insulino-dépendants ou présentant des complications secondaires à leur pathologie (micro ou macro angiopathie)
- Les insuffisants respiratoires chroniques sous oxygénothérapie ou asthme ou mucoviscidose ou toute pathologie chronique respiratoire susceptible de décompenser lors d'une infection virale
- Les personnes avec une immunodépression congénitale ou acquise :
 - Médicamenteuses (chimiothérapie anti-cancéreuse, immunothérapie, corticothérapie à dose immunosuppressive...)
 - Consécutives à une greffe d'organe solide ou de cellules souches hématopoïétiques
 - Hémopathie maligne en cours de traitement
 - Cancer métastasé
- Les personnes présentant une obésité morbide > 40 kg/m²

ii) Fonction rénale :

Le SARS-CoV-2 se lie à la protéine Spike par l'intermédiaire du récepteur ACE2. Ce récepteur est retrouvé à la surface des cellules rénales mais aussi des cellules alvéolaires pulmonaires de type 2, ce qui explique la symptomatologie rénale et respiratoire de l'infection au virus SARS-CoV-2.(23)

De plus, on a constaté dans certaines formes graves de Covid-19 que les patients développaient une insuffisance rénale aiguë.(24)

Pour corroborer ces résultats, deux méta-analyses (25)(26) ont établi un lien entre l'augmentation de la créatinine plasmatique et le risque de développer une forme grave de la maladie.

iii) Fonction cardiaque :

Le cœur et les vaisseaux sont des cibles privilégiées du virus en raison de la présence de l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 au niveau des cellules endothéliales vasculaires cardiaques.

En Chine, il a été observé des complications cardiovasculaires chez les premiers malades du Covid-19 avec une prédominance des lésions myocardiques aiguës. Leur prévalence est variable selon les groupes de patients : de 7 à 17% chez les patients hospitalisés dont 22% pour ceux ayant un passage en réanimation et 59% chez les décédés.(27)(28)(29)(30)

De plus, la commission nationale de la santé de Chine (NHC) a décrit une symptomatologie cardiaque (palpitations, douleurs thoraciques) comme étant le tableau clinique initial dominant chez des patients infectés par le virus SARS-CoV-2.(31)

Une étude a estimé la prévalence de la myocardite (maladie inflammatoire du muscle cardiaque) chez les malades Covid-19 à 7%.(32)

Les études prospectives, à ce jour, n'ont pas évalué l'incidence des syndromes coronariens aigus avec sus-décalage du segment ST (SCA ST+) apparus lors d'une infection au Covid-19. L'absence de comparaison entre les patients développant des complications cardiaques suite à l'infection Covid-19 et ceux dont les problèmes cardiaques préexistants (parfois méconnus) s'aggravent à cause du virus SARS-CoV-2, rend complexe la mise en place de conclusions fiables. De plus, le tableau clinique du SCA est parfois difficile à distinguer de celui de l'infection à SARS-CoV-2 (dyspnée, douleur thoracique).

Une étude rétrospective d'une cohorte en Chine (30) a calculé l'incidence de l'insuffisance cardiaque chez les patients décédés d'une infection au Covid-19 et chez ceux qui ont été infectés par le SARS-CoV-2 mais non décédés : on trouve une incidence de 52% dans le premier groupe et une incidence de 12% dans le deuxième. Cependant, on retrouve la même problématique qu'avec le SCA ST+ devant la difficulté de savoir si la cardiopathie était préexistante ou non.

Concernant la troponine, les études (33)(28)(30) convergent vers une valeur pronostique négative de l'élévation de ce marqueur dans la maladie Covid-19. On

constate une augmentation linéaire des valeurs de troponine et des marqueurs de l'inflammation tels que la CRP et l'IL-6.(34) La souffrance du myocarde paraît être associée à la gravité de l'infection virale en lien avec une réponse inflammatoire systémique est inductrice et qui accélère cette souffrance.

De plus, il s'agit d'un marqueur prédictif indépendant de la mortalité de l'infection au Covid-19.(35)(36)

2. Critères paracliniques :

a) Critères biologiques :

i) C Reactive protein (CRP) :

La CRP est une protéine synthétisée par le foie via l'induction par l'interleukine (IL) 6. Elle est utilisée comme marqueur de l'inflammation et notamment de l'infection Covid-19.

Il a été observé (37) que les patients qui ont une CRP élevée (> 41,8 mg/L) seraient les plus à risque de développer une forme grave de Covid-19.

Toutefois cette notion est discutée. Une étude a montré que l'augmentation de la CRP chez les patients infectés n'était pas un reflet de la sévérité de la maladie.(14)

Cependant, une autre étude (38) est venue apporter une information contradictoire : les patients décédés d'une infection au Covid-19 avaient une CRP plus élevée que les patients qui ont survécus, mais également que des valeurs de CRP plus importantes sont retrouvées à mesure que la gravité de la maladie augmente.

ii) Médiateurs de l'inflammation :

Chez les patients dont l'évolution de l'infection est favorable, les leucocytes et notamment les lymphocytes ainsi que les cytokines comme l'IL-2, IL-6, IL-7 et le TNF α se normalisent.(39) Inversement, la persistance de valeurs anormales de ces marqueurs semble associée à un pronostic plus péjoratif chez les patients.

Pour illustrer cette observation, l'orage cytokinique est observé chez certains patients graves, d'où cette association entre augmentation des taux de cytokines et mauvais pronostic.(37)

Les taux d'IL-6, de CRP et de procalcitonine (PCT) ont été mesurés chez 140 patients (37) à l'admission pour une infection au Covid-19 : une augmentation de l'IL-6 est notée chez 95 patients (67,9%), 91 patients pour la CRP (65,0%) et 8 patients pour la PCT (5,7%). Les malades qui ont développé les formes les plus graves de la maladie avaient les valeurs les plus élevées, de manière significativement proportionnelle à la gravité, en comparaison des patients dont l'issue était la plus favorable. Il a de plus été observé que chez les patients dont les taux d'IL-6 étaient supérieurs à 32,1 pg/mL le risque de complications graves était le plus important.

iii) Numération Formule Sanguine :

La lymphopénie et la thrombopénie ont été corrélés aux formes sévères de la maladie, comme reporté dans une méta-analyse.(26)

Concernant la lymphopénie, il s'agirait d'une réponse immunitaire provoquée lors des lésions pulmonaires induites par le virus SARS-CoV-2 et qui produisent de manière précoce une importante libération de cytokines.(40) Ces cytokines provoqueraient l'apoptose des cellules et en particulier des lymphocytes. De plus, la cytotoxicité du virus lui-même se traduit par une réplication active au sein de lymphocytes infectés et entraîne également une lymphopénie.(41)

De manière générale, les patients qui sont admis à l'hôpital lors d'une infection à SARS-CoV-2 ont une numération plaquettaire normale ou basse, cependant ces valeurs ont tendance à changer durant leur séjour à l'hôpital.

Les numérations plaquettaires des patients atteints d'une forme grave de Covid-19 sont inférieures à celles des patients non graves. Le même constat est observé chez les patients décédés comparativement aux patients ayant survécu à l'infection. Ces résultats découlent d'une méta-analyse (42) réalisée sur 7613 patients positifs au Covid-19.

Une autre étude (43) a rapporté une valeur numérique de plaquettes inférieure à 100 G/L dans les 24h précédant le décès a été retrouvée chez 60% des patients.

b) Données radiologiques :

La tomodensitométrie (TDM) est un examen paraclinique permettant d'aider au diagnostic de l'infection et au pronostic du patient atteint.(44)

Après apparition des symptômes, la majorité des patients ont l'atteinte pulmonaire la plus grave autour des 10 jours après l'apparition des premiers symptômes de la maladie. De plus, c'est environ au 14^{ème} jour suivant l'apparition des premiers symptômes que la tomodensitométrie montre une amélioration de l'atteinte pulmonaire.(44)

Certains aspects de l'atteinte pulmonaire à l'imagerie sont considérés (45) comme étant de mauvais pronostic tels que :

- Nombreux foyers de condensation alvéolaires
- Image en verre dépoli (principalement sous-pleurale)
- Épanchement des séreuses (plèvre, péricarde)

Une étude (46) rétrospective portant sur 501 patients hospitalisés en unité Covid-19 a classé les données du TDM (étendue des lésions, présence de lésions en verre dépoli, de condensations, d'épanchement pleural et la répartition des lésions) selon le délai depuis l'apparition des premiers symptômes :

- Stade 1 : 0 à 7 jours
- Stade 2 : 8 à 14 jours
- Stade 3 : > 14 jours

On retrouve la lésion en verre dépoli de manière prédominante (97,7%) avec une fréquence stable lors des 3 stades. On retrouve plutôt les condensations au cours du stade 2 (77,1%), tandis que la présence d'épanchement pleural augmente de stade 1 au stade 3, tout comme l'étendue moyenne des lésions.

Le principal signe de gravité au TDM est l'étendue des lésions parenchymateuses (47)(48)(49), c'est pour cela que la Société d'Imagerie Thoracique (SIT) recommande de grader l'atteinte parenchymateuse selon une classification (50) visuelle en 5 stades, basée sur le pourcentage de poumon lésé :

- Minime : < 10%
- Modérée : 10-25%
- Importante : 25-50%
- Sévère : 50-75%
- Critique : > 75%

3. Scores composites :

a) SOFA et quickSOFA :

Le score Sepsis-related Organ Failure Assessment (SOFA) a été créé en 1994 (51) afin de quantifier le degré de dysfonctionnement d'organe chez les patients atteints de septicémie. Pouvant s'appliquer à d'autres cas que la septicémie et notamment pour évaluer le degré de dysfonctionnement d'organe, il a été rebaptisé Séquentiel Organ Failure Assesement Score.

Le calcul de ce score est présenté dans le tableau suivant :

Système	Score				
	0	1	2	3	4
Respiration					
PaO ₂ /FiO ₂ , mmHg (kPa)	≥ 400 (53,3)	<400 (53,3)	< 300 (40)	<200 (26,7) avec soutien ventilatoire	< 100 (13,3) avec soutien ventilatoire
Coagulation					
Plaquettes, x10 ³ /μl	≥ 150	< 150	< 100	< 50	< 20
Foie					
Bilirubine, μmol/l (mg/dl)	<1,2 (20)	1,2-1,9 (20-32)	2,0-5,9 (33-101)	6,0-11,9 (102-204)	>12,0 (204)
Cardiovasculaire					
PAM ≥ 70 mmHg	PAM ≥ 70 mmHg	PAM < 70 mmHg	Dopamine < 5 ou dobutamine (toute dose)*	Dopamine 5,1-15 ou adrénaline ≤ 0,1 ou noradrénaline ≤ 0,1*	Dopamine <15 ou adrénaline >0,1 ou noradrénaline >0,1*
Système nerveux central					
Glasgow Coma Scale	15	13-14	10-12	6-9	<6
Rénal					
Créatinine, μmol/l (mg/dl)	<1,2 (110)	1,2-1,9 (110-170)	2,0-3,4 (171-299)	3,5-4,9 (300-400)	> 5 (440)
Diurèse, ml/j				<500	<200

Tableau 1 : Paramètres et valeurs permettant le calcul du score SOFA (41)

Un score supérieur ou égal à deux est associé à un risque de mortalité hospitalière de 10% chez les patients pour lesquels une infection Covid-19 est suspectée.

En février 2016, un score rapide de SOFA, nommé quickSOFA, a été introduit afin d'identifier les patients ayant une infection et présentant un risque élevé de s'aggraver. Il est calculé selon 3 critères :

- Pression artérielle systolique ≤ 100 mm Hg : 1 point
- Fréquence respiratoire ≥ 22/minute : 1 point
- Altération de la conscience (Score de Glasgow ≤ 14) : 1 point

Le score varie de 0 à 3 points. Un score ≥ 2 points en début d'infection est associé à une mortalité élevée.(52)

b) Score de Fine :

Le Pneumoniae Severity Score de Fine (53) est un score pronostique des pneumopathies communautaires notamment en évaluant la probabilité de mortalité à 30 jours d'une pneumonie acquise à domicile (PAD). Son utilisation principale reste l'orientation du patient entre le milieu hospitalier ou ambulatoire.

Score de Fine	Mortalité
Classe I : patient < 50 ans sans maladie associée ni signe d'examen anormal	0,1 %
Classe II : score ≤ 70	0,6 %
Classe III : 71 < score ≤ 90	0,9 %
Classe IV : 91 < score ≤ 130	9,5 %
Classe V : score > 130	26,7 %

Tableau 2 : Évaluation de la probabilité de mortalité d'une PAD à 30 jours en fonction du nombre de points obtenus selon les paramètres composant le score de Fine (53)

Les éléments de calcul du score sont les suivants :

Facteurs démographiques	Points
Âge Hommes Femmes Vie en institution	= Âge en années = Âge-10 + 10
Comorbidités	
Maladie néoplasique	+ 30
Maladie hépatique	+ 20
Insuffisance cardiaque congestive	+ 10
Maladie cérébro-vasculaire	+ 10
Maladie rénale	+ 10
Données de l'examen physique	
Atteinte des fonctions supérieures	+ 20
Fréquence respiratoire > 30/min	+ 20
TA systolique < 90 mmHg	+ 20
T° < 36 °C ou > 40 °C	+ 15
Fréquence cardiaque ≥ 125/min	+ 10
Données radiologiques et biologiques	
pH artériel < 7,35	+ 30
Urée ≥ 11 mmol/l	+ 20
Na < 130 mmol/l	+ 20
Hématocrite < 30 %	+ 10
PaO ₂ < 60 mmHg	+ 10
Épanchement pleural	+ 10

Tableau 3 : Paramètres composant le score de Fine et points à attribuer en fonction des résultats (53)

c) SAPSII :

Le Simplified Acute Physiology Score (SAPS) (54) (= IGS II : Indice de gravité simplifié) a été conçu pour mesurer la gravité de la maladie chez les patients admis dans les unités de soins intensifs âgés de 18 ans ou plus.

24 heures après l'admission dans l'unité de soins intensifs, la mesure a été effectuée et a abouti à un score en points de 0 à 163 points ainsi qu'à une mortalité prédite comprise entre 0 et 100 %. Aucun nouveau score ne peut être calculé pendant le séjour. Si un patient sort de l'unité de soins intensifs et est réadmis, un nouveau score SAPS II peut être calculé.

Il tient compte des éléments suivants : âge, mode d'admission à l'hôpital, existence de certaines maladies chroniques, température, PAS, fréquence cardiaque, Glasgow, bicarbonate, PAO_2/FiO_2 , Na, K, urée, fonction rénale, bilirubine, leucocytes.

SAPS II score	Le Gall et al. 1993
10	1.0%
20	3.7%
30	10.6%
40	24.7%
50	46.1%
60	68.1%
70	83.8%
80	92.5%
90	96.7%
100	98.5%

Tableau 4 : Probabilité de mortalité des patients admis en unité de soins intensifs en fonction du score SAPSII (54)

d) Score CALL :

Le score CALL (55) est utilisée chez les patients atteints du SARS-CoV-2 sans critère de gravité initiale (fréquence respiratoire $\geq 30/mn$, $SaO_2 \leq 93\%$, $PaO_2/FiO_2 \leq 300mmHg$, ventilation mécanique) et pouvant avoir un risque d'aggravation secondaire.

Il se calcule comme suit :

		Points
Comorbidités	Non	1
	Oui	4
Âge	≤ 60 ans	1
	≥ 60 ans	3
Lymphopénie	Non	1
	Oui (lymphocytes ≤ 1000/mm ³)	3
LDH	≤ 250U/L	1
	> 250 U/L et ≤ 500 U/L	2
	> 500 U/L	3

Tableau 5 : Paramètres composant le score CALL et points à attribuer en fonction de la cotation du paramètre (55)

Il existe 3 niveaux reflétant le risque d'aggravation secondaire :

→ Faible (<10%)

→ Intermédiaire (10-40%)

→ Élevé (≥ 50%)

e) Covid-Score :

Ce score a été développé par l'Institut Pasteur de Lille afin d'évaluer le risque pour un individu de contracter le coronavirus et d'en développer une forme grave.

Il s'adresse à des personnes non atteintes de maladies chroniques (maladies cardiovasculaires/respiratoires, cancers, diabète, déficit immunitaire etc...) et n'ayant pas d'obésité très sévère (définie par un IMC>40) ni de grossesse en cours. Auquel cas, le risque de développer une forme grave considéré comme élevé se traduit par un classement rouge au Covid-Score.

Cet outil présente l'avantage d'un code couleur qui permet une lecture facilitée pour le clinicien : du vert pour le risque le moins élevé, au rouge pour le risque le plus élevé.

Il prend en compte le sexe, l'âge et l'indice de masse corporelle :



Figure 4 : Éléments de calcul du Covid-Score en fonction du sexe et de l'âge (56)

Si l'on obtient un score ≤ 1 (couleur vert clair), le risque de contracter la maladie et d'en décéder est inférieur ou égal à celui de la population générale, tandis que si le score est ≥ 1 (couleur jaune, orange ou rouge), le patient est considéré comme plus à risque que la population générale. De manière générale, plus le score est élevé, plus la personne risque de contracter le virus et de développer une forme grave.

Selon le résultat obtenu à ce score, des conseils personnalisés associés à la couleur obtenue peuvent être formulés tels que des mesures de protection au niveau de l'entourage, la prise d'un rendez-vous chez le médecin traitant, la possibilité de reprendre des activités et des visites familiales...

Les limites principales de ce score résident dans l'absence d'avis du Conseil scientifique malgré la présentation à ce dernier et dans l'absence de distinction entre deux risques : celui de contracter le Covid-19 et celui de décéder du virus. Il ne peut être considéré comme un outil validé et utilisable en pratique courante.

V- Calprotectine :

1. Généralités :

Lors d'une inflammation, on observe tout d'abord le recrutement des polynucléaires neutrophiles et des monocytes/macrophages. Il s'agit d'un recrutement actif dont la régulation se fait via des molécules d'adhésion (sélectines, intégrines) ainsi que des facteurs d'activation cellulaire tels que les chémokines, cytokines et alarmines.

La calprotectine qui est une protéine hétérodimérique nommée S100A8/A9, a un rôle important dans l'inflammation notamment en raison de son expression dans les cellules myéloïdes (57) telles que les PNN (40% du contenu cytosolique protéique) et les monocytes/macrophages (5% du contenu cytosolique protéique). On retrouve l'expression de cette protéine par les kératinocytes et les cellules épithéliales lors d'un processus inflammatoire.(58)

Lorsque l'inflammation a lieu dans le tube digestif, les neutrophiles sécrètent de grandes quantités de calprotectine qui se retrouve dans les selles. Une augmentation significative de ce marqueur signe un processus inflammatoire localisé au niveau digestif (maladie de Crohn, colite...) sans préciser sa cause ou sa localisation et cette augmentation est proportionnelle à la sévérité de l'inflammation. Le dosage de la calprotectine fécale est utilisé en routine au laboratoire de biochimie, tandis que le dosage de la calprotectine sérique est actuellement uniquement proposé comme biomarqueur en innovation, non utilisé dans le cadre du soin usuel des patients.

2. Nomenclature et conformation :

Les protéines S100 doivent leur nom à leurs propriétés chimiques, en particulier leur solubilité dans le sulfate d'ammonium 100% saturé, et ont été découvertes dans les années 1960 dans le cerveau bovin.(59) On en dénombre actuellement plus d'une vingtaine différente.(60)

Dans la littérature, on retrouve d'autres noms pour les protéines S100 A8 et A9 comme la Myeloid Related Protein (MRP) 8 et 14 ainsi que la Calgranuline A et B. Ces protéines ont une haute affinité pour le calcium et la liaison de ces cations divalents a pour conséquence un changement conformationnel de la protéine et un changement de fonction.(61)(57) L'ensemble forme un hétérodimère appelé calprotectine. Des formes tétramériques existent mais elles semblent dénuées d'activité biologique.

3. Fonctions de la calprotectine :

La libération au niveau extracellulaire de calprotectine par les cellules myéloïdes se fait de façon active via le calcium et de façon passive par le phénomène de NETose (processus cellulaire immunitaire touchant les polynucléaires neutrophiles et libérant des fibres d'ADN et de protéines qui vont piéger les micro-organismes pathogènes) ou lors d'une mort cellulaire par nécrose.(62)

Dans le cas d'une libération active, la calprotectine joue de second messenger pour l'hôte lors d'un processus inflammatoire. La transcription de S100A8 et de S100A9 est alors induite par le TNF-alpha ou l'IL-1 beta et les cytokines pro-inflammatoires. La calprotectine ainsi libérée au niveau extracellulaire va recruter des PNN de la moelle osseuse et activer leur TLR-4 qui permet la synthèse de cytokines pro-inflammatoires et l'expression de l'alpha 2 intégrine.(63)(64) L'alpha 2 intégrine ralentit le phénomène de roulement des PNN le long des cellules endothéliales. Par conséquent, on observe une extravasation vers le site inflammatoire du PNN puis une adhésion à la cellule endothéliale.

Cette calprotectine extracellulaire est pro-inflammatoire notamment sur les lymphocytes et les cellules endothéliales en se liant aux récepteurs des produits finaux avancés de glycosylation et aux récepteur TLR-4. Ces événements conduisent à une réponse inflammatoire pro-thrombogène, une activation des caspases responsables de la mort cellulaire des cellules endothéliales et une augmentation de la perméabilité vasculaire permettant l'extravasation de cellules immunitaires.(65)

Au niveau des monocytes, il a été observé que la calprotectine induisait l'expression du Cd11b qui augmente l'adhérence au fibrinogène et participe au recrutement des monocytes sur le site de l'inflammation.

La calprotectine possède des propriétés antimicrobiennes notamment grâce à sa capacité de fixation à des cations divalents tels que le Ca^{2+} , le Mn^{2+} , le Cu^{2+} et le Zn^{2+} et modifie la concentration de ces cations tant au niveau intracellulaire qu'extracellulaire. La calprotectine, en chélatant les ions Zn^{2+} et Mn^{2+} , entraîne une carence en nutriments extracellulaires pour les bactéries qui par conséquent, meurent. (66)

L'activité intracellulaire de la calprotectine induit des modifications de la tubulaire du cytosquelette et participe donc au phénomène de phagocytose.(67)

La défense antibactérienne est aussi assurée par la voie des radicaux libres oxygénés puisque la calprotectine est capable de potentialiser l'activité de la NADPH oxydase.

4. Calprotectine et SARS-CoV-2 :

L'analyse de cellules sanguines de patients atteints d'une forme grave du SARS-CoV-2 par cytométrie en flux montre la libération de cellules myéloïdes correspondant à des polynucléaires neutrophiles immatures aux propriétés immunosuppressives. Cette libération pourrait être corrélée à un taux élevé de calprotectine qui précède l'orage cytokinique et indiquerait donc que la calprotectine sérique serait associée à une forme grave de cette affection.(10)

Toutefois, il n'existe actuellement pas d'étude évaluant l'intérêt du dosage de la calprotectine sérique comme élément prédictif d'une forme grave de Covid-19.

VI- But de l'étude :

En fonction des résultats précédemment publiés (10) associant un taux élevé de calprotectine sérique aux formes graves de Covid-19, nous nous posons la question d'évaluer l'intérêt de réaliser un dosage précoce de la calprotectine sérique lors des 24 premières heures d'hospitalisation afin de déterminer si ce marqueur est prédictif de mauvaise évolution d'une primo-infection à SARS-CoV-2.

Pour tenter de répondre à cette question, une étude « COVID-Calprotectine », a été réalisée dans le service de biochimie de l'hôpital de Ranguel.

L'objectif principal de cette étude était de déterminer si la concentration de calprotectine sérique dosée dans les 24 premières heures d'hospitalisation de patients présentant une primo-infection à SARS-CoV-2 pouvait être prédictive d'une évolution défavorable des patients. Pour cela, nous avons dosé ce marqueur dans le sérum de patients répartis dans différents groupes de patients (classés en fonction de la gravité du diagnostic établi à l'issue de l'hospitalisation initiale) afin de l'évaluer comme critère de gravité et d'établir un seuil à partir duquel ce marqueur représente un risque significatif de développer une forme grave.

Les objectifs secondaires de cette étude étaient de comparer ce marqueur à d'autres facteurs (socio-démographiques, cliniques, biologiques, radiologiques et scores d'intérêt) afin de savoir si la calprotectine sérique est plus pertinente dans la prédiction des formes graves que d'autres marqueurs et si ce dosage pouvait apporter une information supplémentaire en combinaison d'autres marqueurs prédictifs.

Après avoir présenté le matériel et les méthodes utilisés, nous présenterons les résultats obtenus pour la calprotectine sérique ainsi que les autres marqueurs, puis nous discuterons de l'étude et de ses limites, en comparant avec d'autres études publiées. Enfin nous concluons cette étude afin de répondre à la problématique posée et d'établir des perspectives.

Matériel et Méthodes :

I- Conception de l'étude :

1. Éthique :

Les recherches menées sur la personne humaine doivent répondre à des critères organisationnels et éthiques, encadrés par la loi, pour garantir la sécurité des participants.

La loi Jardé (2012) a pour but de simplifier le cadre juridique en adaptant les réglementations en fonction des risques encourus pour les personnes participant à des recherches. Les recherches interventionnelles et non interventionnelles sont classées dans des catégories en fonction de leurs niveaux de risque et du degré d'intervention pour les participants.

	Recherches impliquant la Personne Humaine (RIPH) Article R 1121-1-1 du csp : « Sont des recherches impliquant la personne humaine au sens du présent titre les recherches organisées et pratiquées sur des personnes volontaires saines ou malades, en vue du développement des connaissances biologiques ou médicales... »			Recherches non RIPH
	Recherches Interventionnelles		Recherches non Interventionnelles	Recherches non Interventionnelles
	RIPH de Catégorie 1	RIPH de Catégorie 2	RIPH de Catégorie 3	
	Recherches interventionnelles qui comportent une intervention sur la personne non justifiée par sa prise en charge habituelle	Recherches interventionnelles qui ne comportent que des risques et des contraintes minimales, dont la liste est fixée par arrêté	Recherches non interventionnelles dans lesquelles tous les actes sont pratiqués et les produits utilisés de manière habituelle, sans procédure supplémentaire ou inhabituelle de diagnostic, de traitement ou de surveillance	Sont concernées les recherches dans le domaine de la santé qui relèvent du chapitre IX de la loi Informatique et Libertés et qui n'appartiennent pas aux recherches impliquant la personne humaine. Sont en particulier visés les projets reposant sur la réutilisation de données de santé à caractère personnel
Autorité compétente	Obtention d'une autorisation de l'ANSM	Informar l'ANSM de l'étude et de l'avis favorable du CPP	Informar l'ANSM de l'étude et de l'avis favorable du CPP	- Autorisation de l'ANSM non exigée - Information de l'ANSM non exigée
Comité d'éthique	Obtention d'un avis favorable d'un CPP	Obtention d'un avis favorable d'un CPP	Obtention d'un avis favorable d'un CPP	- Avis d'un CPP non exigé. A des fins de publication dans une revue scientifique, il est recommandé de soumettre à un comité d'éthique Recherche (Ex. : CERAR)
Personne / Patient	- Information - Obtention du consentement libre, éclairé et écrit	- Information - Obtention du consentement libre, éclairé et exprès	- Information - Non opposition de la personne ou du patient	- Information - Non opposition de la personne ou du patient
Traitement des données	- Engagement MR001* ou - Obtention avis CNIL	- Engagement MR001 ou - Obtention avis CNIL	- Engagement MR003 ou - Obtention avis CNIL	- Engagement MR004** ou - Obtention avis CNIL

* MR = Méthodologie de Référence

Figure 5 : Organisation de la recherche biomédicale en France après la loi Jardé

L'étude réalisée, appelée COVID-Calprotectine, est issue d'une recherche non interventionnelle visant à évaluer l'intérêt pronostic de différents biomarqueurs dans le cadre d'une primo-infection à SARS-CoV-2 : projet « COVID Bio Pronostic » promu par le CHU de Toulouse et dont l'investigateur principal est le Dr Maupas-Schwalm. Il s'agit d'une étude rétrospective sur des données personnelles, cliniques et biologiques.

Le dosage de la calprotectine sérique est réalisé sur des reliquats de tubes de sang conservés réglementairement pour des rajouts de dosages biologiques au laboratoire central du CHU.

L'étude COVID-Calprotectine appartient à la catégorie de recherches non RIPH (dite de catégorie 4, « hors loi Jardé »).

Les patients ont été informés de la possibilité d'une utilisation de leurs données, sauf opposition de leur part, via une note d'information (NI) communiquée dans le cadre de l'étude « Covid-Clinic-Toul », référençant de manière exhaustive tous les patients atteints de COVID hospitalisés au CHU de Toulouse. Cette NI convient pour l'étude COVID Bio Pronostic et est utilisée avec accord des investigateurs de Covid-Clinic-Toul. La NI est enregistrée sur Orbis (logiciel permettant de regrouper les bases de données médicales du CHU) dans le dossier du patient. Par ailleurs, les patients sont informés d'une possible utilisation de leurs données à des fins de recherche, sauf opposition, dans le livret d'accueil des personnes hospitalisées et sur le site du CHU.

Il s'agit d'une étude non financée, la société Gentian® a fourni gracieusement les réactifs, contrôles et calibrants pour le dosage de 400 tests de Calprotectine sérique. Cette société n'a pas accès à la base de données des patients y compris anonymisée, et n'a pas été impliquée dans l'analyse des résultats.

Les données sont conservées en accord avec la réglementation actuelle (cf. « collecte des données »)

2. Population de l'étude :

Les patients ont été inclus du 21 juin 2020 au 28 octobre 2020.

Les critères d'inclusion et d'exclusion correspondent à ceux de l'étude COVID Bio Pronostic dont l'étude COVID-Calprotectine est une partie.

Il s'agit d'une étude pilote dont l'effectif nécessaire à permettre des conclusions a été évalué, en fonction du profil habituel d'études pilotes sur des biomarqueurs innovants, au minimum à 250 patients. Selon les possibilités de mise à disposition des réactifs et de recrutement des patients, l'étude COVID-Calprotectine porte sur un effectif de 308 patients.

Les critères d'inclusion sont :

- Personne majeure
- Présentant un diagnostic de primo-infection à Sars-CoV-2 attesté par une PCR réalisée au CHU et confirmée après analyse du dossier médical
- Pour laquelle au moins un tube hépariné, a été prélevé dans les 24h contemporaines de la PCR et conservé à 4°C.

Les critères d'exclusion sont :

- Recueil d'une opposition à l'utilisation des données dans le dossier médical
- Grossesse
- Conditions pré-analytiques concernant le reliquat sanguin ne permettant pas d'envisager un dosage satisfaisant des biomarqueurs de l'étude : ictémie, hémolyse ou lactescence évaluées par des indices IHL élevés au-delà des valeurs définies par le fournisseur de réactif
- Tube hépariné conservé au laboratoire du CHU depuis plus de 3 jours
- Volume du reliquat insuffisant

3. Schéma de la recherche :

a) Inclusion des patients et constitution d'une collection biologique temporaire :

Une extraction des dossiers a initialement été réalisée sur Molis *via* le code « VDNCOV » qui correspond aux tests PCR SARS-CoV2, au fil du temps, dès que le résultat du test PCR était accessible.

Si le résultat était positif et noté comme correspondant à un primodiagnostic de COVID sur le dossier Molis, une vérification qu'au moins un tube hépariné ait été prélevé dans les 24h après le test PCR a été réalisée. Les conditions préanalytiques concernant ce tube hépariné ont été vérifiées.

Quand toutes ces conditions étaient réunies, les tubes héparinés ont été sortis de l'emplacement réfrigéré du service de biochimie de Ranguail ou de Purpan, les tubes de Purpan transférés à Ranguail selon les conditions habituelles de transport d'échantillons biologiques.

Des aliquots des reliquats de tubes héparinés ont été préparés et anonymisés pour être placés dans une collection biologique temporaire conservée à -80°C dans un congélateur réservé à la recherche situé dans une salle de Biochimie à Ranguail et surveillé par une sonde de température.

Dans le même temps, une base de données permettant la correspondance entre identité et anonymisation était générée. Elle comporte l'emplacement précis des différents aliquotes conservés.

b) Réalisation des dosages de Calprotectine sérique :

Le dosage de Calprotectine sérique n'est pas réalisé en routine sur le Plateau Technique Automatisé (PTA) en Biochimie à Rangueil. Après accord de la société Roche qui fournit les automates Cobas du PTA, les réactifs ont été embarqués sur un module du Cobas 1 de Biochimie, pour un dosage en canal ouvert, après installation de la procédure informatique de dosage par D. Tayac, ingénieur qualité du PTA, assisté d'un ingénieur d'application Roche® et d'une référente pour la société Gentian®, et validation de la méthode de dosage sur site. Les dosages de Calprotectine ont été réalisés à la fin de la période d'inclusion, par séries encadrées par 2 niveaux de contrôles selon les procédures de dosage définies par la société Gentian®.

II- Collecte de données :

Les données personnelles et médicales de chaque patient ont été recueillies dans les jours suivants la constitution de la collection biologique à partir du dossier médical des patients hospitalisés au CHU, accessible sur Orbis pour les données cliniques et sur Molis pour les données biologiques.

Une vérification que chaque patient présentait bien les critères d'inclusion et une absence de critères d'exclusion a été réalisée à ce stade. N'ont été définitivement inclus que les patients répondant à ces critères.

Les données non anonymisées ont été regroupées sur un tableau Excel, enregistré sur un ordinateur hospitalier verrouillé avec un mot de passe, le fichier Excel est lui-même protégé par un mot de passe. Les mots de passe sont connus uniquement de l'investigatrice principale de l'étude COVID Bio Pronostic. Ces données sont conservées 10 ans avant destruction.

Une fois constituée, la base de données initiale a été copiée en un second fichier Excel duquel l'identité des patients est supprimée. Cette base de données anonymisée est utilisée pour réaliser le travail d'analyse statistique. Elle est conservée par l'investigatrice principale dans un PC professionnel sécurisé par mot de passe.

III- Variables étudiées :

1. Variable d'intérêt : Calprotectine sérique :

a) Fiche technique :

La calprotectine sérique est un marqueur innovant dont le dosage n'est pas réalisé en routine. Sa mesure dans le plasma hépariné au lithium et dans le sérum est utilisée dans le diagnostic de l'inflammation.

Le principe de l'essai consiste à mélanger un échantillon de plasma humain à l'héparine de lithium ou un échantillon de sérum humain avec des immunoparticules de calprotectine. La calprotectine de l'échantillon réagit avec les anticorps de calprotectine de la solution d'immunoparticules et l'agglutination augmente la turbidité du mélange réactionnel. Le complexe créé absorbe la lumière et, par turbidimétrie, l'absorption est liée à la concentration de calprotectine par interpolation sur une courbe d'étalonnage établie.

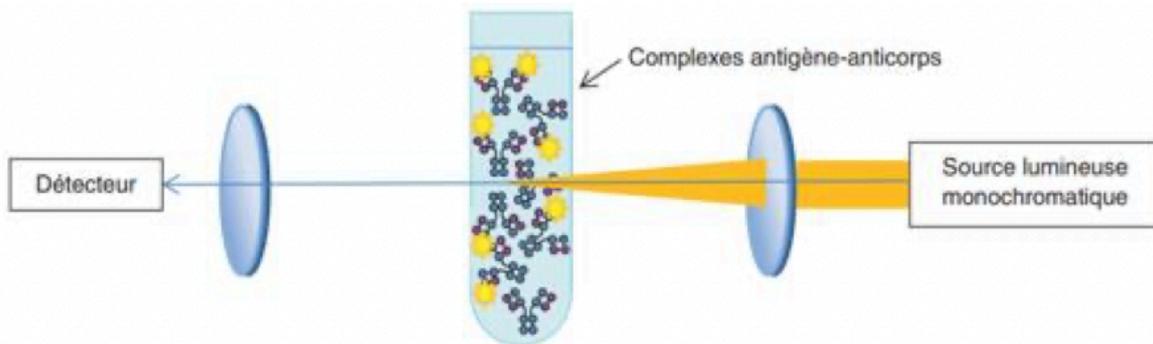


Figure 6 : Schématisation du dosage de la calprotectine sérique par immunoturbidimétrie

Les contrôles bas et haut de l'immunodosage de la calprotectine de Gentian® doivent être analysés avant le dosage de tout échantillon afin de valider la courbe d'étalonnage.

Échantillon	Valeur (mg/L)	CV (%)
Contrôle bas	1,04	6,73
Contrôle haut	10,07	0,86

Tableau 6 : Valeurs attendues des contrôles haut et bas issues du fournisseur

Des études de précision ont été menées par le laboratoire Gentian® avec 2 échantillons de plasma à l'héparine de lithium, 5 fois sur 3 jours avec 5 répétitions.

La limite de détection est définie comme la plus petite quantité d'un analyte que la méthode peut détecter de manière fiable pour déterminer la présence ou l'absence de l'analyte. La limite de détection a été mesurée à 0,16 mg/l pour le plasma à l'héparine de lithium.

La limite de quantification est définie comme la plus faible concentration d'un analyte qui peut être détectée de manière fiable. Elle a été déterminée comme étant de 0,34 mg/L dans le plasma.

Les substances suivantes n'ont montré aucune interférence cliniquement significative aux concentrations spécifiées :

- Hémoglobine à 8 g/L
- Ictémie à 600 mg/L
- Lactescence à 10 g/L

b) Validation de méthode :

La plage de mesure minimale de l'immunodosage de la calprotectine de Gentian® est d'environ 0,4-20 mg/L. Les échantillons peuvent être automatiquement dilués et mesurés jusqu'à au moins 60 mg/L.

La répétabilité a été calculée sur le PTA de Biochimie à Ranguel à partir de contrôles qualité (niveau 1 et niveau 2) sur 10 échantillons. Elle a été établie avant de réaliser les dosages des patients.

	Moyenne (mg/L)	Écart-Type	Coefficient de variation (%)
Contrôle qualité 1	0,98 (1)	0,07	7,34
Contrôle qualité 2	9,9 (10,02)	0,05	0,55

Tableau 7 : Répétabilité initiale des contrôles qualité effectuée sur 10 points

Les valeurs obtenues sont jugées conformes en référence à la fiche technique. La reproductibilité a été calculée à partir des résultats des contrôles de début et de fin de série, *a posteriori* du dosage des patients.

	Moyenne (mg/L)	Écart-Type	Coefficient de variation (%)
Contrôle qualité 1	1,06 (1)	0,09	8,2
Contrôle qualité 2	10,16 (10,02)	0,21	2,06

Tableau 8 : Reproductibilité des contrôles qualité effectuée sur 13 et 14 points

Les valeurs obtenues sont également conformes à la fiche technique de la calprotectine sérique.

Nous avons également voulu tester l'impact de la décongélation des échantillons sur les résultats obtenus, étant donné que le surnageant de nos tubes étaient conservés à -80°C avant de réaliser les dosages souhaités.

La courbe a été construite sur 7 échantillons, à partir de patients ayant des valeurs de CRP différentes (hautes, intermédiaires et basses), afin de représenter différents degrés d'inflammation.

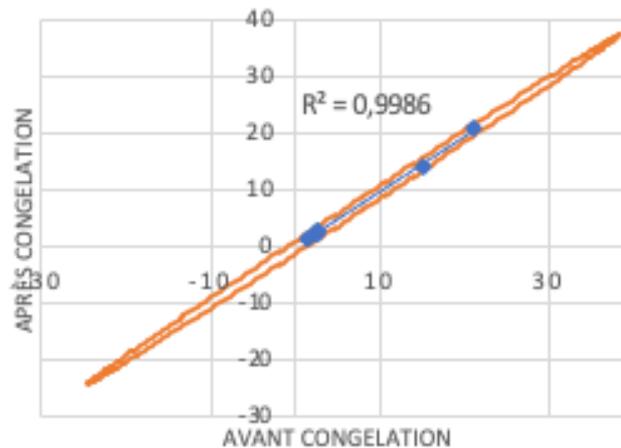


Figure 7 : Validation du non impact de la congélation à -80°C sur les valeurs de la calprotectine sur sept échantillons

Nous pouvons constater le non impact de la décongélation sur nos résultats de calprotectine sérique.

2. Autres variables recueillies :

Les variables qui vont suivre ont été récupérées dans le dossier médical du patient.

a) Données socio-démographiques :

Nous avons recueilli l'âge des patients (années) ainsi que le genre (masculin ou féminin).

b) Données cliniques :

Concernant les variables cliniques, nous avons retenu le diagnostic à l'issue de l'hospitalisation initiale et nous avons groupé les patients en fonction de leur gravité :

- Groupe 1 : Décès
- Groupe 2 : Intubation oro-trachéale ou oxygénation par membrane extra-corporelle (ECMO)

- Groupe 3 : Ventilation non invasive ou oxygène à haut débit
- Groupe 4 : Oxygénorequérant
- Groupe 5 : Etiologie pulmonaire sans addition d'oxygène
- Groupe 6 : Hospitalisation pour une étiologie non pulmonaire
- Groupe 7 : Retour à domicile dans les 24 heures

On peut considérer que 1,2,3 sont les groupes les plus graves (décès ou réanimation). Les groupes 1,2,3,4 correspondent à un état grave allant du décès à une atteinte pulmonaire liée au Covid-19 ne nécessitant pas forcément une hospitalisation en réanimation mais oxygénorequérant.

Le groupe 7 est le groupe le moins grave, équivalent à un groupe de consultants.

Au cours de cette hospitalisation initiale, il a été également noté si le patient a développé une maladie thrombo-embolique.

Différents types de durées et de délais ont été relevés :

- Durée d'hospitalisation totale (secteurs et soins intensifs/réanimation) en jours
- Durée d'hospitalisation uniquement soins intensifs/réanimation (inclus dans la durée d'hospitalisation totale) en jours
- Délai entre l'admission initiale et l'admission en soins intensifs ou réanimation, en jours
- Délai entre l'apparition des symptômes et la réalisation de la PCR, en jours

Concernant les antécédents médicaux, nous nous sommes intéressés à l'hypertension artérielle, au diabète, aux cancers solides non hématologiques, aux maladies hématologiques chroniques non cancéreuses, aux hémopathies malignes, aux dyslipidémies, aux coronaropathies, à l'insuffisance cardiaque, aux artériopathies, aux troubles du rythme, aux AVC, aux antécédents neurologiques sans AVC, aux antécédents psychiatriques, aux antécédents pneumologiques ou à la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO), au syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAOS), à la transplantation d'organes, à l'insuffisance rénale chronique, aux maladies hépatiques chroniques, aux maladies inflammatoires chroniques et aux maladies endocrinologiques.

En parallèle, nous avons noté si les patients avaient des traitements habituels et en pré-hospitalisation, tels que les antiagrégants plaquettaires, les antagonistes calciques, les statines, les antidiabétiques, les anticoagulants, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion, les sartans, les bêtabloquants, les diurétiques, la cordarone, la Flécaïne®, les antiarythmiques, le Lévothyrox® et l'oméprazole.

Nous avons également recueilli la fréquence respiratoire (Fr) mesurée aux urgences (cycles/minute) et la fréquence cardiaque (Fc) (battements/minute).

Enfin, nous avons noté un certain nombre de paramètres cliniques issus de l'examen initial réalisé aux urgences dès l'admission tels que :

- La surface corporelle calculée selon l'équation de Boyd et validée chez les obèses en m²
- Le poids en kilogrammes
- La taille en mètres
- L'Indice de Masse Corporelle (IMC) : Poids/Taille²
- La température

c) Données biologiques et radiologiques :

Les données biologiques et radiologiques sont des données obtenues par analyse du dossier médical des 24 premières heures d'hospitalisation du patient.

Les variables biologiques se rapportant à la fonction respiratoire que nous avons recueillies sont les suivantes :

- La saturation mesurée par capteur transcutané aux urgences (SaO₂)
- PaO₂ des gaz du sang initiaux, FiO₂ notée dans la demande sur la gazométrie (PaO₂/FiO₂). Le ratio permet de définir des classes organisées pour permettre d'évaluer l'état respiratoire du patient :
 - 1 : PaO₂/FiO₂ < 100
 - 2 : PaO₂/FiO₂ 100 à 99
 - 3 : PaO₂/FiO₂ 200 à 299 ou SaO₂ de 85 à 89%
 - 4 : PaO₂/FiO₂ 300 à 399 ou SaO₂ de 90 à 94 %
 - 5 : PaO₂/FiO₂ ≥ 400 ou SaO₂ ≥ 95%

Nous nous intéresserons également à la fonction rénale des patients, et notamment le Débit de Filtration Glomérulaire (DFG) calculée selon la formule CKD EPI :

$(141 \times \min(\text{Scr}/K, 1)^a \times \max(\text{Scr}/K, 1)^{-1,209} \times 0,993^{\text{Age}} \times 1,018$ (si sexe = femme))

Avec pour K : 62 si femme, 80 si homme

Et a : -0,329 pour les femmes et -0,411 pour les hommes

Puis nous avons sélectionné un certain nombre d'informations de la Numération Formule Sanguine (NFS) :

- Numération des leucocytes à l'admission
- Première numération des lymphocytes
- Rapport lymphocytes/leucocytes

Au niveau radiologique, nous avons réalisé une classification en 5 niveaux des données scannographiques en fonction de l'étendue des lésions COVID pulmonaires ou la gravité notées par le radiologue, ou selon l'absence de réalisation de l'examen TDM :

- 1 : > 50% de surface atteinte ou grave
- 2 : de 25 à 50% ou modéré
- 3 : < 25% ou peu grave
- 4 : COVID négatif
- 5 : pas de TDM réalisé

d) Scores composites :

Nous avons sélectionné certains scores composites clinico-biologiques prédictifs de gravité, qui nous ont semblé pertinents pour cette étude :

- quickSOFA (qSOFA) : de 0 à 3
 - Pression artérielle systolique ≤ 100 : 1 point
 - Fréquence respiratoire ≥ 22 :1 point
 - Score de Glasgow ≤ 14 : 1 point

- SAPSII : de 0 à 77

Ce score tient compte des éléments suivants : âge, mode d'admission à l'hôpital, existence de certaines maladies chroniques, température, PAS, fréquence cardiaque, Glasgow, bicarbonate, PAO_2/FiO_2 , Na, K, urée, fonction rénale, bilirubine, leucocytes.

- Score de Fine : de 0 à plus de 130

Ce score tient compte des éléments suivants : âge, existence de certaines ATCD, fréquence respiratoire, température, PAS, fréquence cardiaque, PAO_2 , SaO_2 , PH, Glasgow, bicarbonate, PAO_2/FiO_2 , Na, glycémie, urée, DFG, hématicrite.

e) Analyse statistique :

Concernant les données descriptives, le nombre de patients concernés est exprimé sous forme d'effectifs, de pourcentages et de nombre de patients impliqués pour la variable (permettant de visualiser les données manquantes). Les variables clinico-biologiques des patients sont exprimées en moyenne arithmétique \pm écart-type pour les variables quantitatives et en % pour les variables qualitatives.

Concernant les calculs statistiques, une p value < 0.05 est considérée comme statistiquement significative.

En analyse univariée, pour les variables qualitatives, une analyse ANOVA permet de comparer plusieurs groupes, ou 2 groupes sont comparés à l'aide du test du khi. Pour les variables quantitatives continues de distribution normale nous utilisons le test de Student remplacé par le test non paramétrique de Mann-Whitney pour les variables quantitatives continues de distribution asymétrique.

Des courbes ROC, avec calcul de l'aire sous la courbe (AUC) (avec un intervalle de confiance de 95% (IC 95%)) ont été réalisées pour les paramètres intéressants dans l'évaluation pronostique des patients. Ces courbes ROC sont construites en fonction de la sensibilité et de la spécificité.

	Graves (a)	Non graves (b)
Test positif	VP	FP
Test négatif	FN	VN

Tableau 9 : Constitution des groupes de patients pour le calcul de la sensibilité et de la spécificité

La sensibilité (Se) est la probabilité que le test soit positif sachant que le sujet est malade. Elle mesure donc la capacité d'un test à détecter les malades.

$$Se = VP/VP+FN$$

La spécificité (Spe) est la probabilité que le test soit négatif sachant que le sujet est sain. Elle mesure donc la capacité d'un test à détecter les individus sains.

$$Spe = VN/VN+FP$$

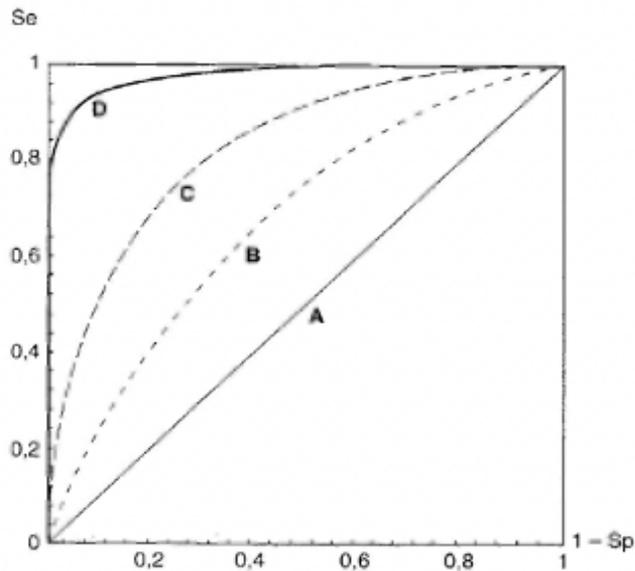


Figure 8 : Modèle de courbe ROC

La courbe ROC est ainsi tracée à partir de la Se et de $1 - Sp$ obtenues pour chaque valeur que prend la variable. Elle permet de déterminer une valeur seuil d'intérêt de la variable, correspondant à la combinaison de Se et Sp les meilleures et définie sur la courbe par :

- Le point le plus proche de l'idéal (0 ; 1)
- Le point le plus loin de la diagonale

La valeur seuil d'intérêt peut aussi être déterminée par le calcul de l'index de Youden (= $Se + Sp - 1$) : il mesure de la précision de la méthode de diagnostic. Il dépend de la spécificité et de la sensibilité du test, mais pas de la prévalence de la maladie. Il est compris entre 0 (la méthode de diagnostic n'est pas efficace) et 1 (la méthode est parfaite).

Nous pouvons calculer les rapports de vraisemblance ainsi que la valeur prédictive négative, correspondant à une valeur donnée de la variable testée, afin de déterminer l'intérêt putatif de cette valeur dans le contexte étudié.

- Rapport de vraisemblance positif : égal au taux de tests positifs chez les malades (soit la Se) sur le taux de tests positifs chez les non malades ($1 - Sp$) :
 $+LR = Se / (1 - Sp)$
 Il quantifie le gain diagnostique d'un test positif, un individu malade ayant LR fois plus de chance d'avoir un test positif qu'un individu sain.
- Rapport de vraisemblance négatif : égal au taux de tests négatifs chez les malades ($1 - Se$) sur le taux de tests négatifs chez les sujets sains (soit la Sp) :
 $-LR = (1 - Se) / Sp$

Il quantifie le gain diagnostique d'un test négatif, un individu malade ayant -LR fois plus de chance d'avoir un test négatif qu'un individu sain.

- Valeur prédictive négative : probabilité qu'un test négatif soit réellement négatif. Elle dépend de la sensibilité et de la spécificité d'un test et de la prévalence de la condition d'étude :
VPN : $VN/VN+FN$

Certains tests de corrélation ont été utilisés, avec une représentation graphique de Bland et Altman.

Une régression logistique a été effectuée en utilisant une variable de classification dichotomique (positive ou négative par rapport à la valeur seuil) et un rapport de cotes (OR) (statistique qui quantifie la force d'association entre deux événements A et B) est calculé avec un IC à 95%.

Certaines représentations ont été réalisées après analyse en composante principale PCA.

Une analyse multivariée selon le modèle de régression à risques proportionnels de Cox impliquant toutes les variables cliniques et biologiques de notre étude qui ont montré une valeur pronostique dans l'analyse univariée ($F \text{ ratio} > 5$) a été réalisée.

Les analyses ont été effectuées à l'aide des logiciels Sigma stat Life Science® (Systat Software Asia Pacific Ltd) et Medcalc® (Medcalc Software, Mariakerke, Belgium).

Résultats

I- Répartition des patients de l'étude par diagnostic de gravité :

Nous avons précédemment précisé la classification en groupes de patients constitués en fonction du diagnostic à l'issue de leur hospitalisation initiale, numérotés de 1 à 7 selon une gravité clinique décroissante.

Nous présentons la répartition des patients retenus pour l'étude dans ces groupes :

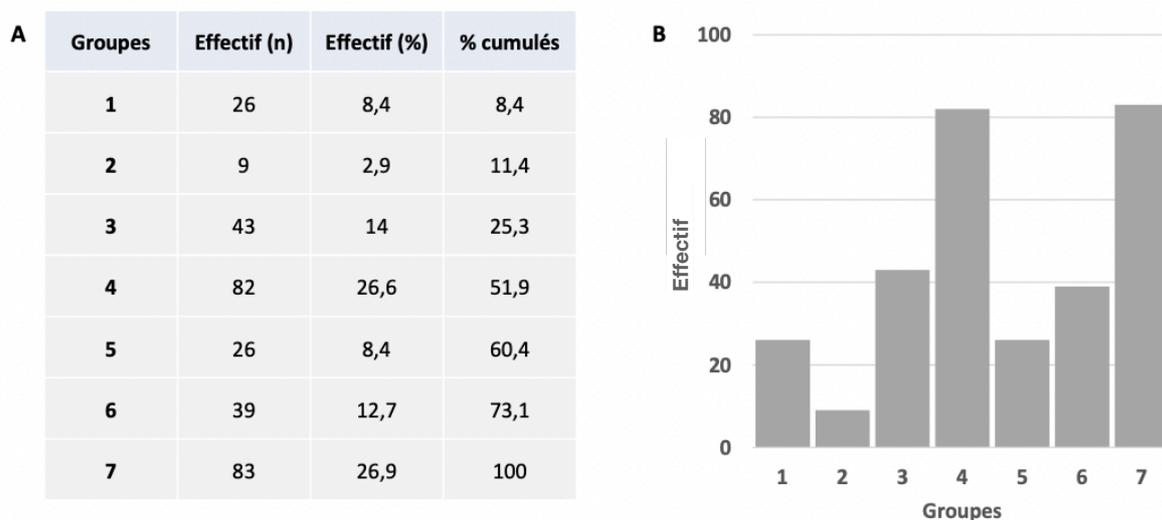


Figure 9 : Répartition des patients selon leur gravité en fonction du diagnostic retenu à l'issue de leur hospitalisation

A : Tableau de répartition des effectifs de patients ; B : Histogramme de répartition des effectifs par groupe

Groupes : 1 : Décès ; 2 : Intubation oro-trachéale ou oxygénation par membrane extra-corporelle (ECMO) ; 3 : Ventilation non invasive ou oxygène à haut débit ; 4 : Oxygénorequérant ; 5 : Etiologie pulmonaire sans addition d'oxygène ; 6 : Hospitalisation pour une étiologie non pulmonaire ; 7 : Retour à domicile dans les 24 heures

Nous pouvons constater que les 2 groupes les plus représentés en termes d'effectif sont les groupes 4 (patients oxygénorequérants) et 7 (retour à domicile dans les 24 heures) (figure 9).

L'effectif le plus faible est retrouvé dans le groupe 2 (patients ayant subi une intubation oro-trachéale ou une oxygénation par membrane extra-corporelle). A noter que pour certains calculs statistiques, en raison du faible effectif de ce groupe 2 et de la gravité voisine de ces patients avec les patients du groupe 3, les patients des groupes 2 et 3 seront considérés comme appartenant à un groupe commun 2&3.

II- Dosage de la calprotectine sérique :

Concernant la fréquence de répartition des valeurs de calprotectine sérique (CalpS) mesurées chez les patients inclus dans l'étude, cette répartition ne correspond pas à une distribution suivant une loi normale (*figure 10A*).

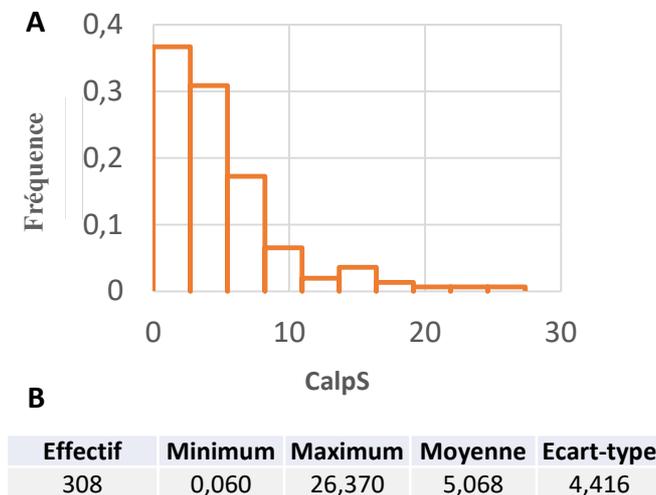


Figure 10 : Valeurs de calprotectine sérique chez les patients inclus

A : Fréquence de répartition des valeurs dans la population de patients inclus ; B : Quelques valeurs d'intérêt

CalpS : calprotectine sérique

Les valeurs de CalpS sont comprises entre 0,060 et 26,370 mg/L (*figure 10B*) avec une majorité de valeurs comprises entre 0 et 10 mg/L (*figure 10A*).

La moyenne des valeurs est de 5,068 mg/L avec un écart type de 4,416 (*figure 10B*).

En analysant les concentrations de calprotectine sérique dans chaque groupe de patients (*figure 11*), nous constatons que les valeurs les plus hautes se trouvent chez les patients du groupe 2 ($9,05 \pm 6,8$ mg/L), avec une décroissance progressive de ces valeurs pour les patients des groupes les moins graves notamment le groupe 7 ($3,42 \pm 2,63$ mg/L) (*figure 11A*). En associant les patients des groupes 2 et 3 (*figure 11B*) le profil de distribution est sensiblement identique avec une valeur de calprotectine sérique en moyenne légèrement supérieure à 5 mg/L pour ce groupe 2&3 et une diminution de l'écart-type.

Les valeurs de calprotectine sérique mesurées dans le groupe 1 ($6,35 \pm 5,17$ mg/L) sont supérieures à celles des groupes les moins graves mais un peu inférieures à celles du groupe 2 (*figure 11A*) et sensiblement identiques à celles du groupe de patients de réanimation (groupe 2&3 ; *figure 11B*).

L'analyse ANOVA montre qu'il existe une différence significative de concentration de calprotectine sérique entre les groupes de patients ($p < 0,001$; $F = 6,456$).

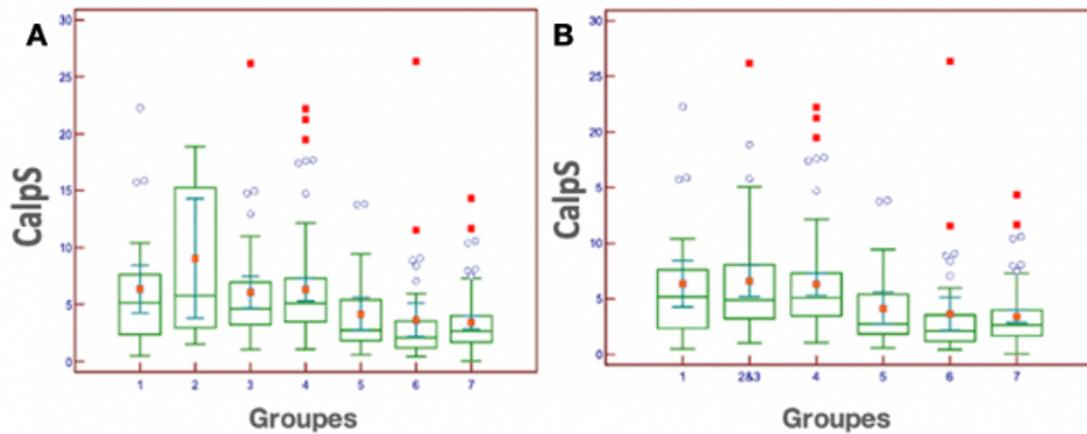


Figure 11 : Répartition des valeurs de calprotectine sérique en fonction des groupes de patients

A : Valeurs de CalpS dans les différents groupes classés selon leur diagnostic à l'issue de l'hospitalisation ; B : les patients des groupes 2 et 3 ont été associés (groupe 2&3).

Groupes : 1 : Décès ; 2 : Intubation oro-trachéale ou oxygénation par membrane extra-corporelle (ECMO) ; 3 : Ventilation non invasive ou oxygène à haut débit ; 4 : Oxygénorequérant ; 5 : Etiologie pulmonaire sans addition d'oxygène ; 6 : Hospitalisation pour une étiologie non pulmonaire ; 7 : Retour à domicile dans les 24 heures.

CalpS : calprotectine sérique

Valeurs exprimées en moyenne (carré rouge dans la box), médiane (trait horizontal vert dans la box). La limite inférieure de la box correspond à la valeur du 1^{er} quartile, supérieure du 3^{eme} quartile. L'écart type est représenté par les traits horizontaux verts centrés par la moyenne. L'intervalle de confiance (IC95) autour de la médiane est schématisé par les traits horizontaux verts les plus extérieurs de la box. Les valeurs de concentration de CalpS extérieures aux limites sont représentées par des carrés rouges et des cercles bleus.

La valeur de significativité statistique retenue est $p < 0,05$

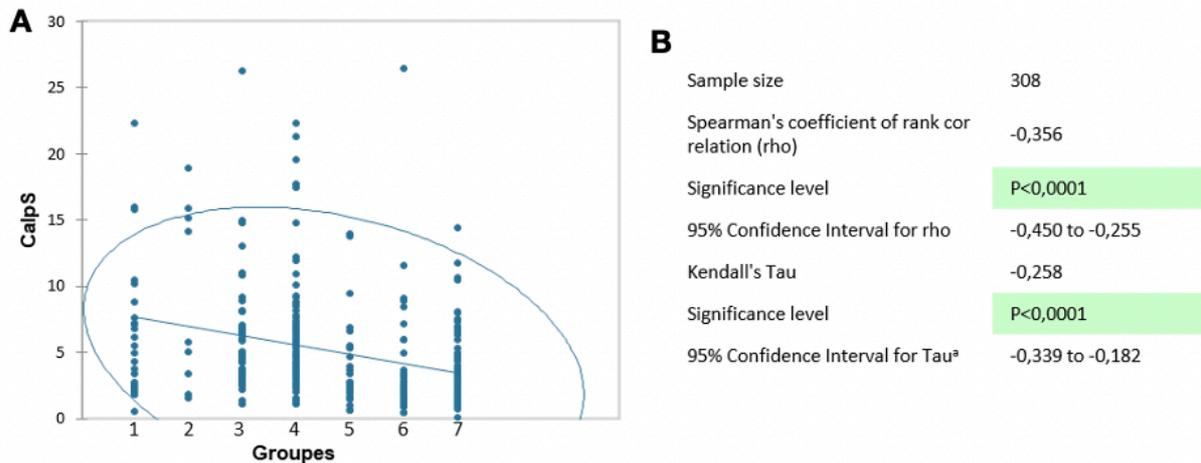


Figure 12 : Évaluation de la corrélation entre les valeurs de CalpS et la gravité clinique

A : Profil de répartition des différentes valeurs dans chaque groupe de patients ; B : Calcul des coefficients de corrélation.

Groupes : 1 : Décès ; 2 : Intubation oro-trachéale ou oxygénation par membrane extra-corporelle (ECMO) ; 3 : Ventilation non invasive ou oxygène à haut débit ; 4 : Oxygénorequérant ; 5 : Etiologie pulmonaire sans addition d'oxygène ; 6 : Hospitalisation pour une étiologie non pulmonaire ; 7 : Retour à domicile dans les 24 heures.

CalpS : calprotectine sérique

La valeur de significativité statistique retenue est $p < 0,05$

Une évaluation de la corrélation entre les valeurs de calprotectine sérique et la gravité clinique des patients montre que la corrélation est significative et inversement corrélée (les valeurs les plus hautes sont significativement associées avec les groupes de bas chiffre, donc les patients les plus graves (*figure 12*).

III- Détermination d'une valeur seuil d'intérêt de la calprotectine sérique :

Nous avons montré une différence significative des valeurs de calprotectine sérique dans les différents groupes de patients, nous allons maintenant déterminer les valeurs seuils d'intérêt.

Pour cela, nous avons réalisé une détermination sans a priori, en réunissant de plusieurs façons les groupes de patients afin d'établir la sensibilité et la spécificité de chaque valeur de calprotectine.

La comparaison de cette valeur avec les autres marqueurs d'intérêt sera réalisée dans un second temps.

1- Décès versus non décès :

Pour cette analyse, les patients du groupe 1 ont été comparé aux patients des groupes 2,3,4,5,6 et 7.

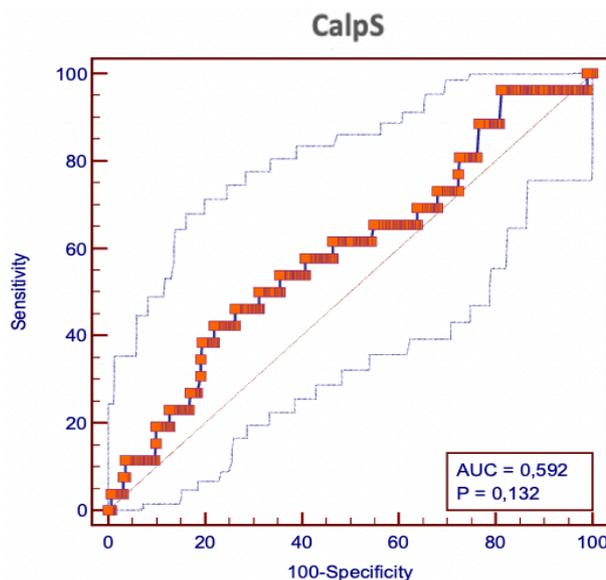


Figure 13 : Représentation graphique d'une courbe ROC déterminée à partir des valeurs de CalpS mesurées chez des patients du groupe 1 comparés aux patients des groupes 2,3,4,5,6,7

CalpS : calprotectine sérique ; AUC : Aire sous la courbe
La valeur de significativité statistique retenue est $p < 0,05$

Pour cette courbe ROC, l'AUC à 59,2% n'est pas significativement supérieure à 50% (*figure 13*).

Le meilleur index de Youden est trouvé pour une valeur de calprotectine sérique supérieure à 6,77 mg/L pour laquelle on trouve une sensibilité de 42,31% et une spécificité de 78,01%.

2- Patients graves (décès, réanimation) versus les autres patients :

Pour cette analyse, les patients des groupes 1,2,3 ont été comparés aux patients des groupes 4,5,6 et 7.

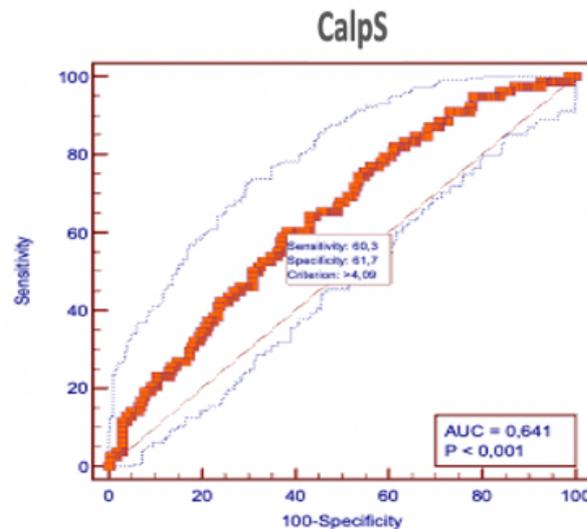


Figure 14 : Représentation graphique d'une courbe ROC déterminée à partir des valeurs de CalpS mesurées chez des patients des groupes 1,2,3 comparé aux patients des groupes 4,5,6,7

CalpS : calprotectine sérique ; AUC : Aire sous la courbe
La valeur de significativité statistique retenue est $p < 0,05$

L'AUC de la courbe ROC est à 64,1%, ce qui est statistiquement significativement supérieur à 50% (figure 14) ($p < 0,001$).

Le meilleur index de Youden est trouvé pour une valeur de calprotectine sérique supérieure à 4,09 mg/L pour laquelle on trouve une sensibilité de 60,26 % et une spécificité de 61,74 %.

3- Patients graves (décès, réanimation) et pneumopathie oxygénorequérante versus les autres patients :

Pour cette analyse, les patients des groupes 1,2,3,4 ont été comparés aux patients des groupes 5,6 et 7.

Nous avons une courbe ROC dont l'AUC à 73,5 % est significativement supérieur à 50% (figure 15).

Le meilleur index de Youden est trouvé pour une valeur de calprotectine sérique supérieure à 3,7 mg/L pour laquelle on trouve une sensibilité de 67,50 % et une spécificité de 72,30 %.

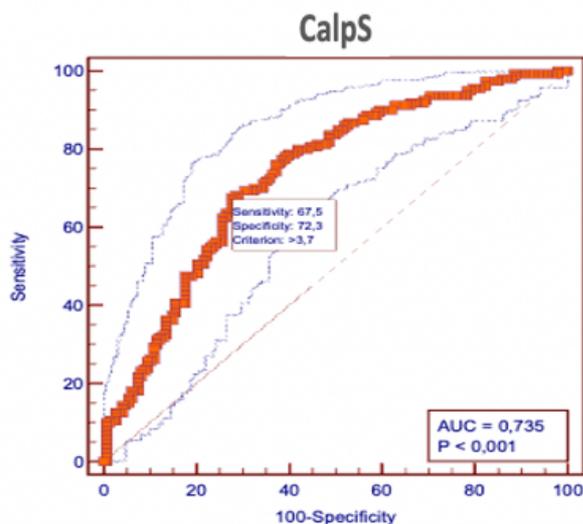


Figure 15 : Représentation graphique d'une courbe ROC déterminée à partir des valeurs de CalpS mesurées chez des patients des groupes 1,2,3,4 comparé aux patients des groupes 5,6,7

CalpS : calprotectine sérique ; AUC : Aire sous la courbe
La valeur de significativité statistique retenue est $p < 0,05$

IV- Variables associées à une gravité clinique :

1- Variables socio-démographiques :

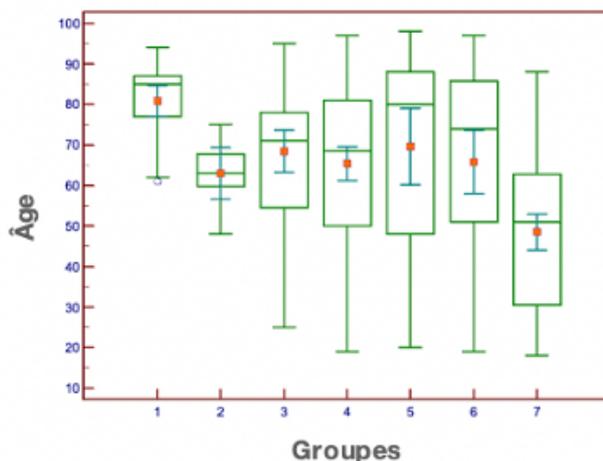


Figure 16 : Répartition de l'âge en fonction des groupes de patients

Groupes : 1 : Décès ; 2 : Intubation oro-trachéale ou oxygénation par membrane extra-corporelle (ECMO) ; 3 : Ventilation non invasive ou oxygène à haut débit ; 4 : Oxygénorequérant ; 5 : Etiologie pulmonaire sans addition d'oxygène ; 6 : Hospitalisation pour une étiologie non pulmonaire ; 7 : Retour à domicile dans les 24 heures.

Valeurs exprimées en moyenne (carré rouge dans la box), médiane (trait horizontal vert dans la box). La limite inférieure de la box correspond à la valeur du 1^{er} quartile, supérieure du 3^{eme} quartile. L'écart type est représenté par les traits horizontaux verts centrés par la moyenne. L'intervalle de confiance (IC95) autour de la médiane est schématisé par les traits horizontaux verts les plus extérieurs de la box. Les valeurs d'âge extérieures aux limites sont représentées par des carrés rouges et des cercles bleus.

La valeur de significativité statistique retenue est $p < 0,05$

Le groupe de patients présentant la moyenne d'âge la plus élevée (81 ± 9 ans) est celui dont l'hospitalisation s'est traduite par un décès alors que le groupe le moins âgé (48 ± 20 ans) est celui du retour à domicile dans les 24 heures (*figure 16*).

2- Variables cliniques :

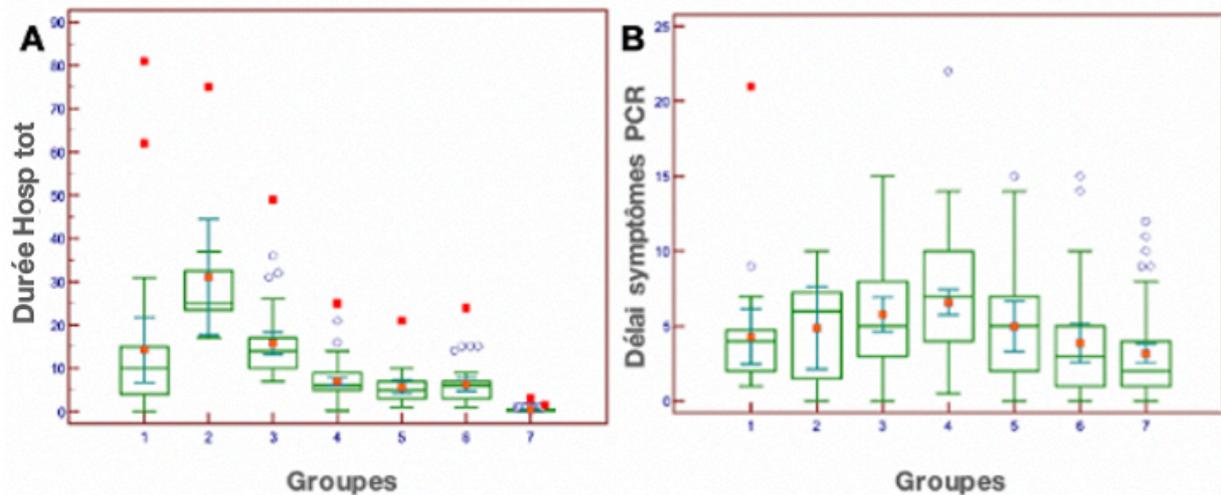


Figure 17 : Répartition des variables cliniques d'intérêt en fonction des groupes de patients

A : Durée d'hospitalisation totale dans les différents groupes classés selon leur diagnostic à l'issue de l'hospitalisation ; B : Délai d'apparition des symptômes après PCR.

Groupes : 1 : Décès ; 2 : Intubation oro-trachéale ou oxygénation par membrane extra-corporelle (ECMO) ; 3 : Ventilation non invasive ou oxygène à haut débit ; 4 : Oxygénorequérant ; 5 : Etiologie pulmonaire sans addition d'oxygène ; 6 : Hospitalisation pour une étiologie non pulmonaire ; 7 : Retour à domicile dans les 24 heures.

Durée Hosp tot : durée d'hospitalisation totale ; Délai symptômes PCR : délai entre l'apparition des symptômes et le test PCR.

Valeurs exprimées en moyenne (carré rouge dans la box), médiane (trait horizontal vert dans la box). La limite inférieure de la box correspond à la valeur du 1^{er} quartile, supérieure du 3^{em}e quartile. L'écart type est représenté par les traits horizontaux verts centrés par la moyenne. L'intervalle de confiance (IC95) autour de la médiane est schématisé par les traits horizontaux verts les plus extérieurs de la box. Les valeurs extérieures aux limites sont représentées par des carrés rouges et des cercles bleus.

La valeur de significativité statistique retenue est $p < 0,05$

Concernant la durée d'hospitalisation initiale (*figure 17A*), on note une élévation de la durée en fonction de la gravité (groupe 2 : $31,1 \pm 17,4$ jours ; groupe 3 : $15,8 \pm 8,5$ jours), à l'exception du groupe de patients décédés qui ont une durée d'hospitalisation totale plus courte ($14,2 \pm 18,5$ jours).

Le délai entre l'apparition des symptômes et la réalisation de la PCR de primodiagnostic de COVID-19 s'allonge à mesure que la gravité est plus importante, entre les patients peu graves du groupe 7 qui ont bénéficié d'un primodiagnostic sur PCR rapide, en moyenne à $3,2 \pm 2,8$ jours après le début des symptômes, tandis que le délai est le plus long pour les patients oxygénorequérants ($6,6 \pm 3,8$ jours). En revanche décroissante de délai est observée du groupe 4 au groupe de patients les plus graves, pour les patients décédés le délai étant en moyenne de $4,3 \pm 4,2$ jours (*figure 17B*).

3- Antécédents médicaux :

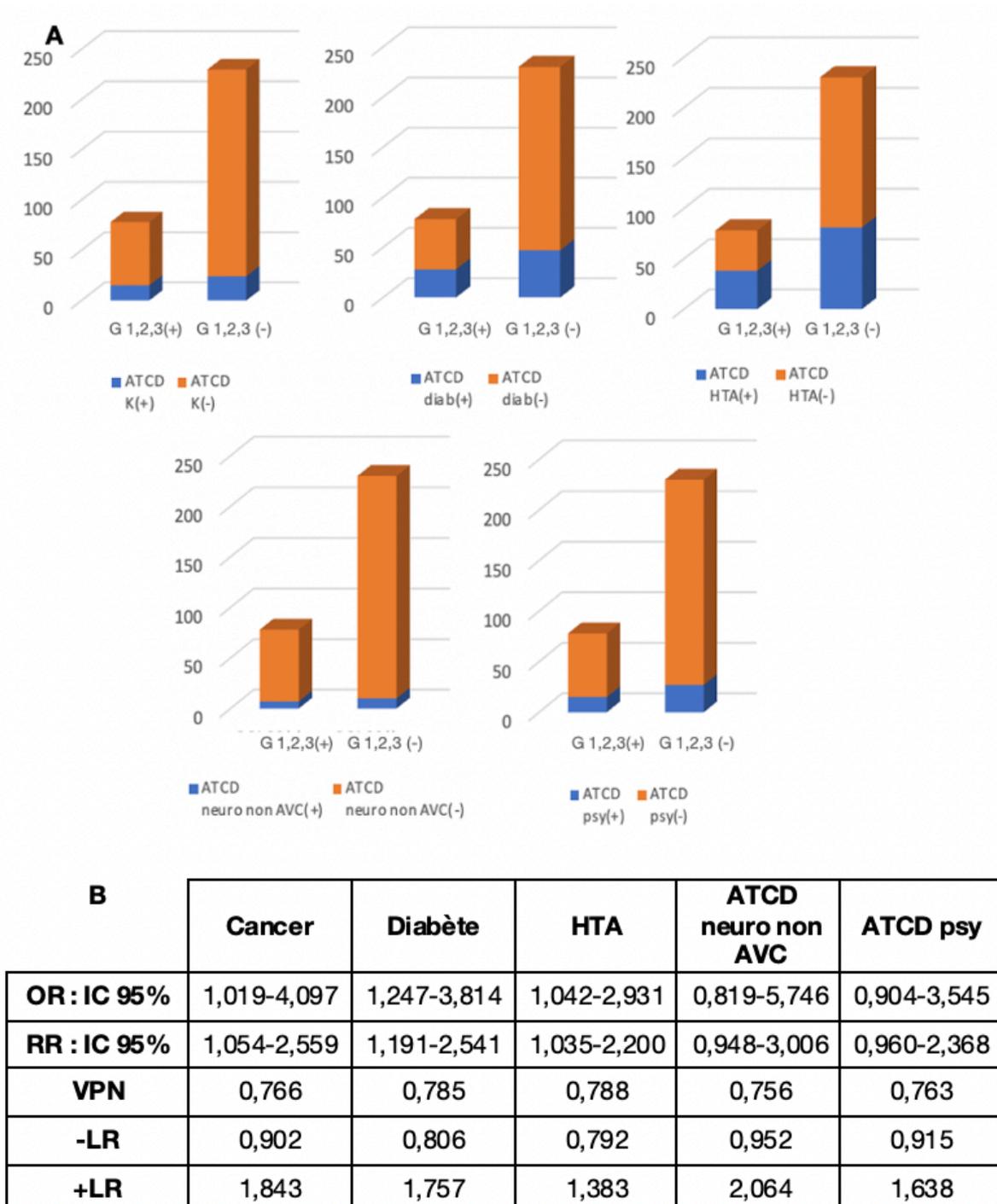


Figure 18 : Répartition des antécédents médicaux d'intérêt en fonction des groupes de patients

A : Histogrammes de répartition. B : Eléments statistiques correspondants à la comparaison des proportions entre les groupes de patients graves (G 1,2,3 (+)) et non graves (G 1,2,3 (-)) (patients des groupes 4,5,6,7).

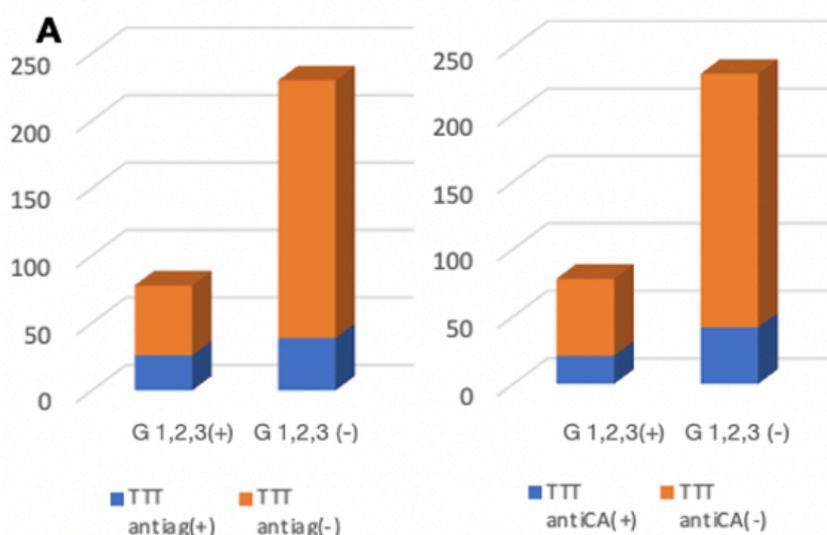
ATCD : antécédent ; K : Cancer ; Diab : diabète ; HTA : hypertension artérielle ; Neuro non AVC : neurologique hors AVC ; Psy : psychiatrique

L'analyse ANOVA montre qu'il existe une différence significative de certains antécédents : entre les groupes de patients : cancer, diabète, HTA, antécédents neurologiques autres qu'AVC et psychiatriques.

La proportion de chacun de ces antécédents est comparée entre les patients ayant une forme grave de COVID-19 et les autres (figure 18A).

Toutefois seuls les antécédents de cancer, de diabète et d'HTA paraissent associés à un risque relatif statistiquement significatif de gravité (RR [IC95] >1) avec un LR+ respectivement de 1,843, 1,757 et 1,383 (figure 18B).

4- Traitements habituels et en pré-hospitalisation :



B	Antiagrégants plaquettaires	Antagonistes calciques
OR : IC 95%	1,372-4,370	0,908-2,995
RR : IC 95%	1,279-2,731	0,949-2,162
VPN	0,786	0,767
-LR	0,803	0,894
+LR	1,966	1,474

Figure 19 : Répartition des traitements d'intérêt en fonction des groupes de patients
 A : Histogrammes de répartition ; B : Eléments statistiques correspondant à la comparaison des proportions entre les groupes de patients graves (G 1,2,3 (+)) et non graves (G 1,2,3 (-)) (patients des groupes 4,5,6,7)

ATCD : antécédent ; Antiag : antiagrégants plaquettaires ; antiCA : antagonistes calciques

Parmi les traitements habituellement pris par les patients inclus dans l'étude, seuls les traitements antiagrégants plaquettaires et anticalciques étaient significativement différents, entre les 7 groupes de patients ($p = 0,012$ et $0,002$ respectivement).

Toutefois, l'analyse de la répartition des patients sous ces traitements répartis en patients de forme grave de COVID-19 (groupes 1,2,3) et les autres (figure 19A) montre que seul le traitement par antiagrégants plaquettaires paraît significativement associé

à un risque de forme grave : un patient sous antiagrégants plaquettaires multiplie par 1,966 son risque de faire une forme grave (+LR = 1,966).

La probabilité de ne pas évoluer vers une forme grave pour un patient qui ne prend pas d'antiagrégants plaquettaires est de 78,6% (VPN = 0,786) et de 76,7% pour un patient qui ne prend pas d'antagonistes calciques (VPN = 0,767).

5- Variables biologiques et radiologiques :

Parmi l'ensemble des variables étudiées (*cf. matériel et méthodes*), seules celles pour lesquelles une différence statistiquement significative entre les 7 groupes était notée à l'issue de l'analyse ANOVA sont présentées (*Figure 20*).

Au TDM, l'étendue des lésions est la plus importante existant chez les patients des groupes 2 et 3 (respectivement 2 ± 1 et $2,1 \pm 1$) les patients oxygénorequérants ($2,4 \pm 0,8$). À noter que la valeur élevée du score de TDM chez les patients du groupe 7 ($4,3 \pm 0,9$) est en rapport avec le système de cotation utilisé pour cette variable qui inclut les données manquantes, le score maximal (5) étant attribué à l'absence de réalisation de TDM (*figure 20A*).

Le rapport PAO_2/FiO_2 est la variable qui semble statistiquement parmi les plus significativement différentes entre les groupes de patients ($p < 0,01$; $F = 16,3$) avec une valeur progressivement plus basse en fonction de la gravité des patients, avec une valeur proche chez les patients décédés ($230,97 \pm 96,9$) et les intubés ou ECMO ($223,57 \pm 103,8$) (*figure 20B*).

Concernant la CRP, l'analyse ANOVA rend la plus grande significativité pour cette variable ($p < 0,01$; $F = 22$), avec une augmentation progressive des valeurs en fonction de la gravité des patients, avec une différence peu significative de moyenne entre les patients décédés ($121,47 \pm 79,98$ mg/L) et les patients intubés ($124,7 \pm 82,35$ mg/L), ainsi qu'entre les patients ayant nécessité de l'oxygène à haut débit ($81,03 \pm 52,23$ mg/L) et les oxygénorequérants ($83,57 \pm 60,26$ mg/L) (*figure 20C*).

Quant au DFG, il existe une différence significative entre les 7 groupes de patients ($p < 0,01$; $F = 10,8$), les valeurs les plus basses sont retrouvées chez les patients décédés ($47,74 \pm 25,4$ mL/min) et les valeurs les plus hautes chez les patients rentrés rapidement à domicile ($92,35 \pm 27,28$ mL/min) ; en revanche les moyennes des valeurs des groupes 3 ($66,93 \pm 29,36$ mL/min) à 6 ($75,01 \pm 31,54$ mL/min) sont sensiblement identiques (*figure 20D*).

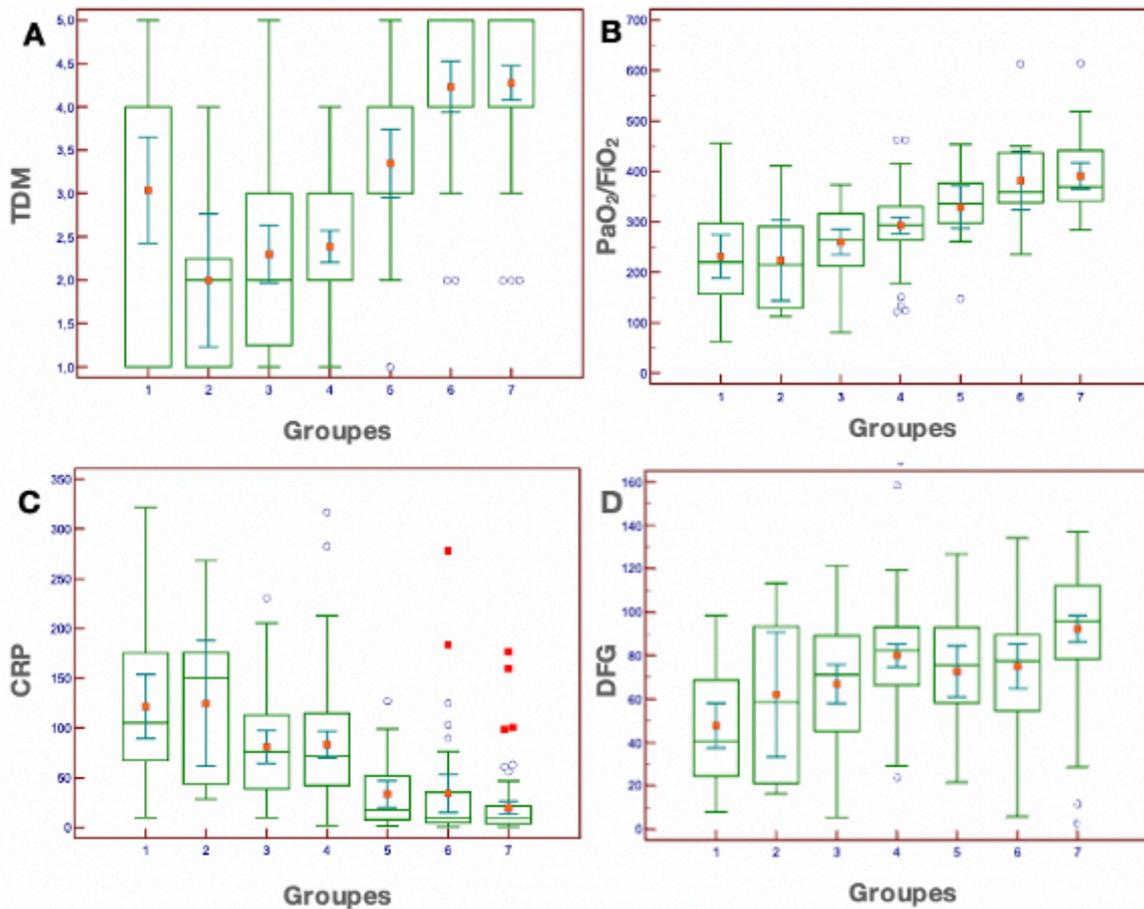


Figure 20 : Répartition des variables biologiques et radiologiques d'intérêt en fonction des groupes de patients

A : Lésions pulmonaires observées au TDM dans les différents groupes classés selon leur diagnostic à l'issue de l'hospitalisation ; B : Rapport PaO_2/FiO_2 mesuré ; C : CRP dosée ; D : DFG calculé.

Groupes : 1 : Décès ; 2 : Intubation oro-trachéale ou oxygénation par membrane extra-corporelle (ECMO) ; 3 : Ventilation non invasive ou oxygène à haut débit ; 4 : Oxygénorequérant ; 5 : Etiologie pulmonaire sans addition d'oxygène ; 6 : Hospitalisation pour une étiologie non pulmonaire ; 7 : Retour à domicile dans les 24 heures.

Valeurs exprimées en moyenne (carré rouge dans la box), médiane (trait horizontal vert dans la box). La limite inférieure de la box correspond à la valeur du 1^{er} quartile, supérieure du 3^{eme} quartile. L'écart type est représenté par les traits horizontaux verts centrés par la moyenne. L'intervalle de confiance (IC95) autour de la médiane est schématisé par les traits horizontaux verts les plus extérieurs de la box. Les valeurs extérieures aux limites sont représentées par des carrés rouges et des cercles bleus.

La valeur de significativité statistique retenue est $p < 0,05$

V- Comparaison de la calprotectine sérique aux autres variables trouvées d'intérêt dans la prédiction de la gravité :

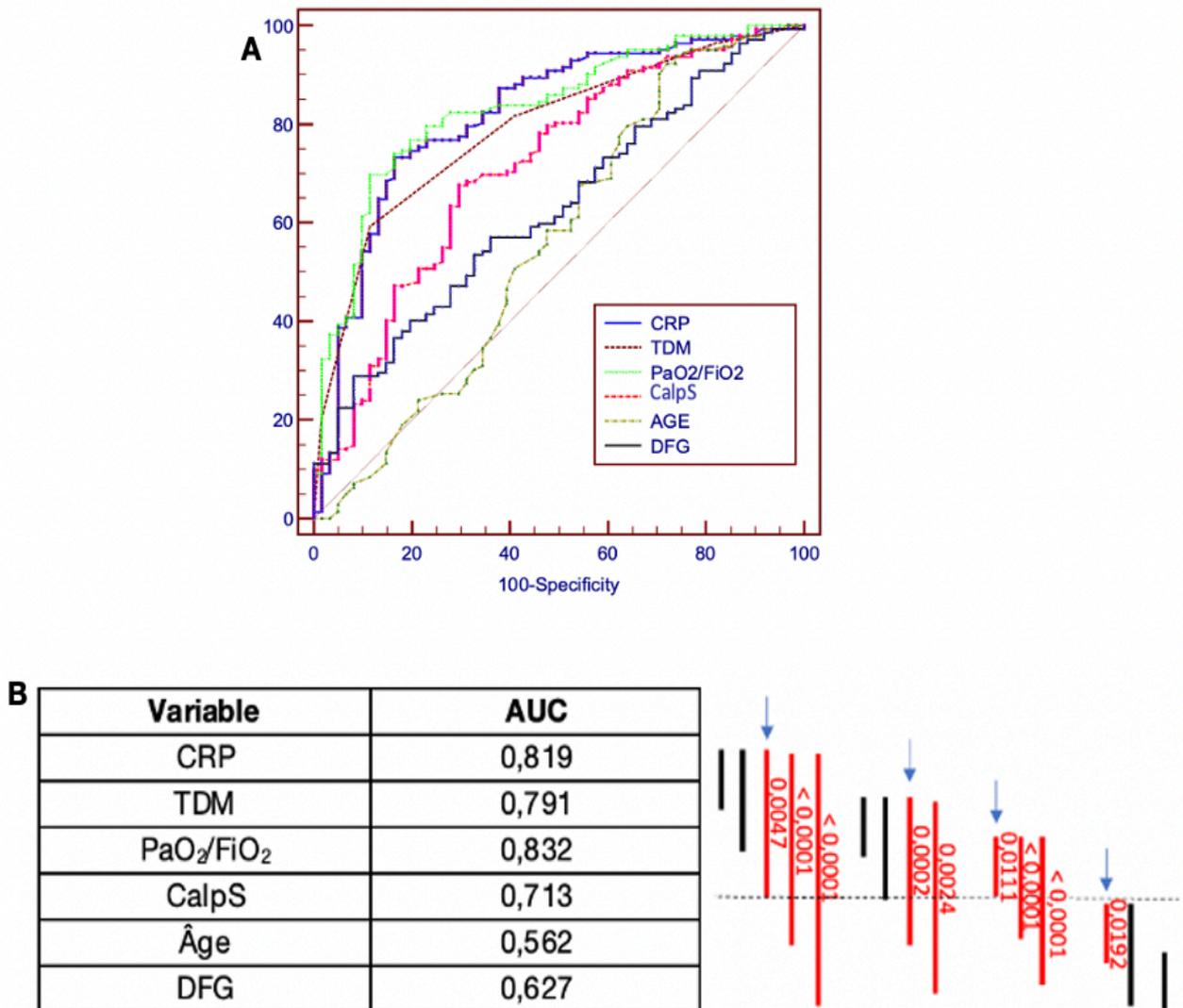


Figure 21 : Courbes ROC cumulées de la calprotectine sérique et des variables d'intérêt dans la prédiction du risque des patients présentant une primo-infection à SARS-CoV-2

A : Représentation graphique des courbes ROC ; B : Valeur des AUC pour chaque variable.

Comparaison des AUC par paire, la flèche bleue montre la comparaison avec la calprotectine sérique, les traits sont noirs lorsque la significativité statistique n'est pas trouvée, rouges lorsque $p < 0,05$.

CRP : C Reactive Protein ; TDM : Tomodensitométrie ; DFG : Débit de Filtration Glomérulaire ; CalpS : calprotectine sérique

Si on compare les patients de gravité au moins égale à une pneumopathie oxygénorequérante (groupes 1,2,3 et 4) aux autres patients, l'analyse des courbes ROC des différentes variables dont la calprotectine sérique (figure 21A) et la comparaison des aires sous la courbe (AUC) (figure 21B), montrent que la courbe ROC de la CRP dispose de la meilleure AUC, tandis que celle de la calprotectine sérique est différente de 50%, mais significativement plus faible que celle d'autres

variables : comparativement statistiquement plus faible que l'AUC de la CRP ($p = 0,0047$) et de celle de $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ ($p = 0,011$).

On ne note par contre pas de différence significative avec le TDM, ni avec le DFG (*figure 21B*).

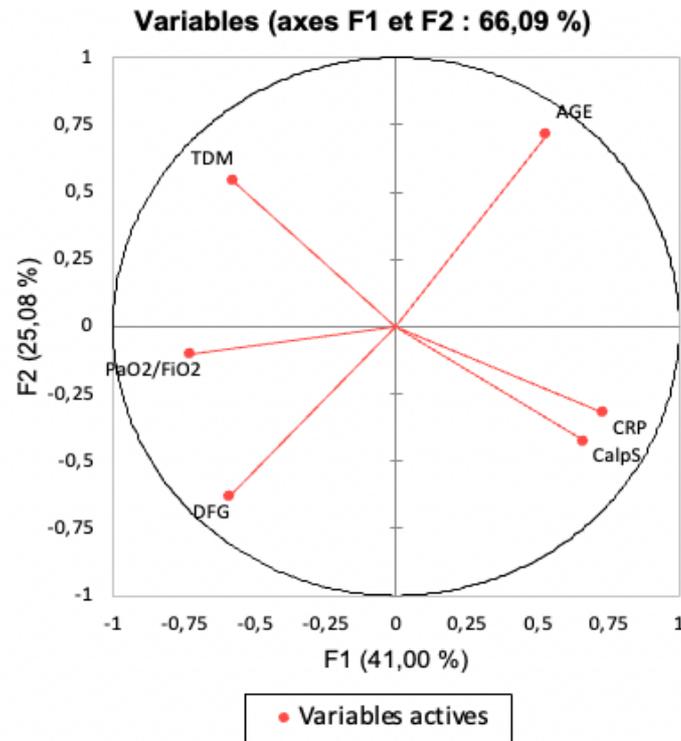


Figure 22 : Analyse en composante principale (PCA) de la calprotectine sérique, des variables biologiques et radiologiques d'intérêt ainsi que l'âge

Cette analyse en composante principale nous montre que la calprotectine et la CRP apportent le même type d'information sur la prédiction de la gravité des patients, de même que pour le TDM (en représentation opposée puisque associé lui à la gravité par sa valeur basse) (*figure 22*).

Également, on peut voir que l'âge et le DFG sont associés négativement aux formes graves de COVID-19. Ces deux variables étant proches du cercle, cela souligne la puissance de l'association positive (AGE) et négative (DFG) avec la gravité (*figure 22*). Une analyse par régression logistique incluant dans le modèle les variables d'intérêt : CRP, TDM, $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$, âge, DFG auxquelles nous avons associé le qSOFA a montré que le TDM associé à la valeur de la $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ étaient suffisants pour porter l'information de prédiction de gravité pour les patients des groupes 1, 2, 3 et 4 (AUC : 0,882 [0,829-0,924], $p < 0,001$) tandis que l'ajout au modèle initial de l'information portée par la calprotectine sérique n'améliore pas la prédiction.

Nous avons reproduit l'analyse en supprimant le TDM du modèle initial. Dans ces conditions, la CRP devient une variable d'intérêt associée à la $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ pour les patients des groupes 1, 2, 3 et 4 (AUC : 0,859 [0,802-0,904], $p < 0,001$), mais là aussi

l'ajout au modèle initial de l'information portée par la calprotectine sérique n'améliore pas la prédiction.

VI- Scores composites d'intérêt prédictif de gravité et comparaison à la calprotectine sérique :

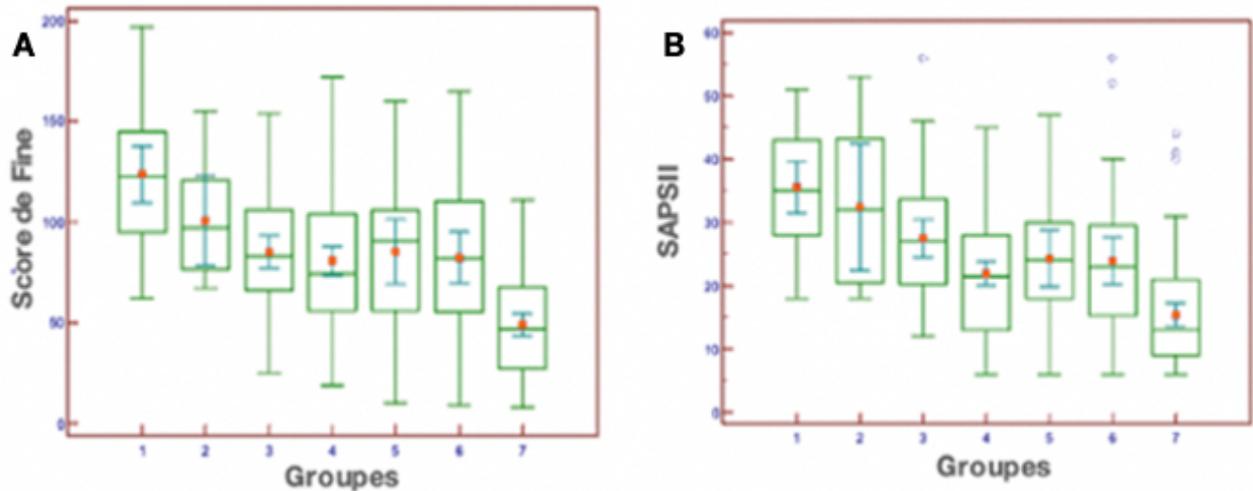


Figure 23 : Répartition des scores clinico-biologiques d'intérêt prédictif de gravité en fonction des groupes de patients

A : Score de Fine calculé dans les différents groupes classés selon leur diagnostic à l'issue de l'hospitalisation ; B : SAPSII calculé.

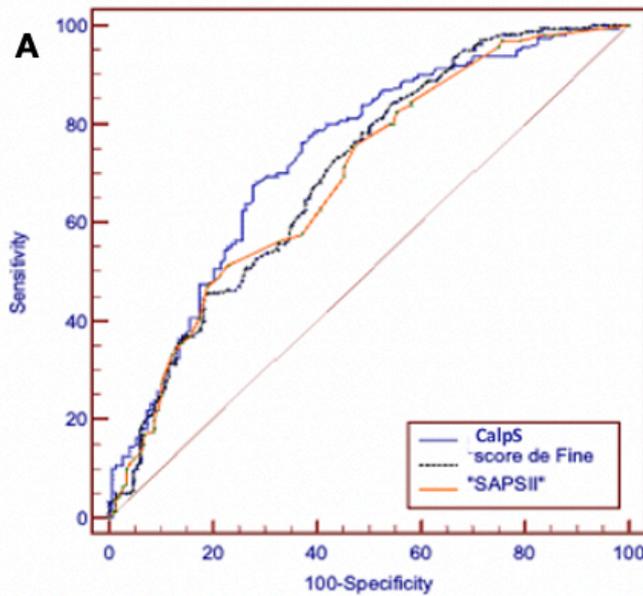
Groupes : 1 : Décès ; 2 : Intubation oro-trachéale ou oxygénation par membrane extra-corporelle (ECMO) ; 3 : Ventilation non invasive ou oxygène à haut débit ; 4 : Oxygénorequérant ; 5 : Etiologie pulmonaire sans addition d'oxygène ; 6 : Hospitalisation pour une étiologie non pulmonaire ; 7 : Retour à domicile dans les 24 heures.

Valeurs exprimées en moyenne (carré rouge dans la box), médiane (trait horizontal vert dans la box). La limite inférieure de la box correspond à la valeur du 1^{er} quartile, supérieure du 3^{em}e quartile. L'écart type est représenté par les traits horizontaux verts centrés par la moyenne. L'intervalle de confiance (IC95) autour de la médiane est schématisé par les traits horizontaux verts les plus extérieurs de la box. Les valeurs extérieures aux limites sont représentées par des carrés rouges et des cercles bleus.

La valeur de significativité statistique retenue est $p < 0,05$

Concernant les moyennes obtenues aux scores de Fine (figure 23A) et SAPSII (figure 23B), une décroissance des valeurs de ces deux scores sont retrouvées du groupe 1 (respectivement $123,73 \pm 34,89$ et $35,54 \pm 10,13$) au groupe 4 (respectivement $80,76 \pm 32,19$ et $21,95 \pm 8,66$).

Pour les autres groupes, les moyennes des scores ne sont significativement pas différentes à l'exception du groupe 7 ($48,99 \pm 25,51$ pour le score de Fine et $15,36 \pm 8,41$ pour le SAPSII) (figures 23A,23B).



B

Variable	AUC
CalpS	0,735
Score de Fine	0,701
SAPSII	0,691

Figure 24 : Courbes ROC cumulées de la calprotectine et des scores d'intérêt dans la prédiction du risque des patients présentant une primo-infection à SARS-CoV-2
 A : Représentation graphique des courbes ROC ; B : Valeur des AUC pour chaque variable.
 Comparaison des AUC par paire.
 CalpS : calprotectine sérique

L'analyse des courbes ROC des scores de Fine, SAPSII et de calprotectine sérique (*figure 24A*) et la comparaison des aires sous la courbe (AUC) (*figure 24B*), montrent que les différentes courbes se projettent de manière sensiblement identique, leur AUC est significativement différente de 50% mais il n'y a aucune différence significative entre les AUC des courbes des 2 scores entre elles et comparativement à celle de la calprotectine sérique.

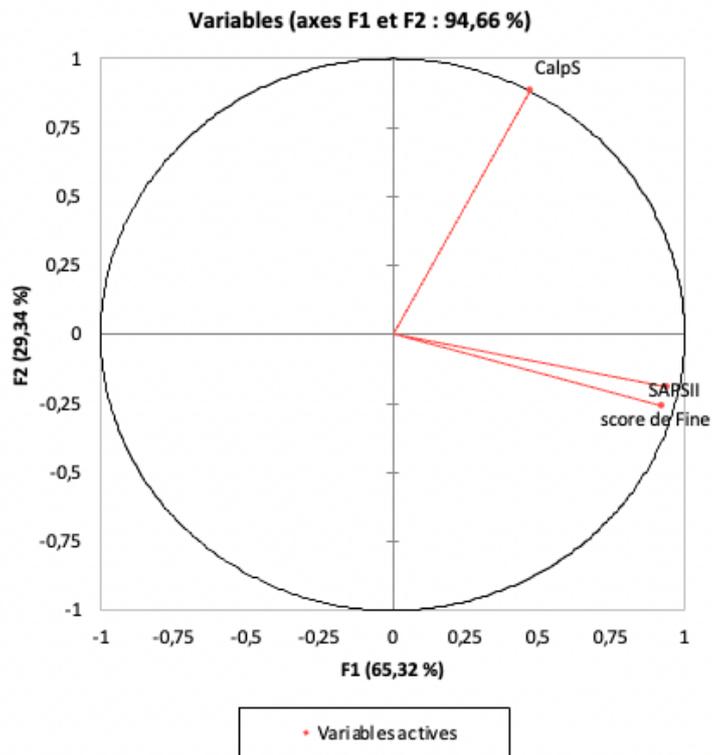


Figure 25 : Analyse en composante principale (PCA) des scores d'intérêt et de la calprotectine sérique
 CalpS : calprotectine sérique

On peut voir que le cosinus de l'angle formé par les scores de Fine et SAPII est faible : l'information portée par ces deux scores est quasiment identique. Sur cette représentation graphique, la représentation de la calprotectine sérique est qu'elle porte une information différente, indépendante de celle portée par les 2 scores (figure 25).

Discussion

Notre étude s'est déroulée durant la deuxième vague épidémique de Covid-19, qui s'est accompagnée de la crainte d'une nouvelle phase de dépassement du système de soin français, et des conséquences sanitaires et financières induites par le pic épidémique. Dans ce contexte il y eu une volonté nationale de mobiliser nos compétences en recherche pour identifier des critères objectifs de pronostic de la maladie et orienter les patients à risque de complications pour limiter la surcharge des services de soins critiques. La biologie a toute sa place dans cette réflexion puisqu'elle permet une réponse rapide, fiable et à moindre coût. Dans ce sens, du fait de l'augmentation de la sécrétion de la calprotectine sérique lors d'un processus inflammatoire, en particulier lors de l'orage cytokinique, elle paraît être un marqueur intéressant pour les formes graves de Covid-19. L'absence d'étude évaluant ce marqueur pour prédire les formes graves d'infection au SARS-CoV-2, a motivé notre étude.

La méthodologie s'appuie sur une étude rétrospective dont on connaît les limites : biais d'information (risque de données manquantes), biais de sélection (ici nous avons un nombre important de patients peu graves ainsi que de personnes âgées) et pas d'estimation de l'incidence.

Le choix de classer les patients en sept groupes de gravité en fonction du diagnostic à l'issue de l'hospitalisation initiale afin d'évaluer nos variables d'intérêt dans l'évolution d'une primo-infection à SARS-CoV-2, permet une meilleure analyse statistique et reste en accord avec d'autres études retrouvées dans la littérature.

Une étude (68), non-interventionnelle, a inclus 158 patients positifs au SARS-CoV-2 et les a répartis en fonction de la gravité de la maladie : la maladie légère (27 patients) a été définie comme ne présentant aucun symptôme clinique ou des symptômes limités et ne nécessitant ni TDM ni hospitalisation, la maladie modérée (16 patients) a été définie comme étant symptomatique, avec une dyspnée et des résultats radiologiques de pneumonie au scanner thoracique et les cas graves (43 patients) ont été définis comme une détresse respiratoire nécessitant une admission en unité de soins intensifs. Des concentrations de calprotectine sérique significativement différentes ont été retrouvées dans les différents groupes, avec des valeurs plus élevées pour les diagnostics graves, sans évaluation de l'intérêt prédictif du marqueur.

Les choix de regrouper les patients dans des groupes de gravité amène toutefois à des biais de classement, par exemple le groupe 2 regroupe l'intubation oro-trachéale et l'oxygénation par membrane extra-corporelle (ECMO), ce qui ne permet pas de conclure à la prédiction de l'un ou l'autre des diagnostics évoqués. De plus, il est

discutable pour certains cas de classer l'hospitalisation pour étiologie non pulmonaire (groupe 6) comme moins grave que l'hospitalisation pour étiologie pulmonaire (groupe 5). Enfin le choix du groupage en sept groupes de gravité en fonction du diagnostic à l'issue de l'hospitalisation initiale est de réalisation plus facile mais est également discutable. Effectivement il ne prend pas en compte une possible ré-hospitalisation après retour au domicile, avec possiblement d'autres complications ultérieures, et donc un diagnostic final plus grave que le diagnostic initial. L'attribution initiale d'un groupe de gravité à un patient donné devenant donc erronée.

La distribution de l'âge dans notre étude n'a pas retrouvé la corrélation notée dans certaines études avec la gravité (69), à l'exception des groupes 1 (décès) et 7 (retour à domicile dans les 24h) qui présentent respectivement la moyenne d'âge la plus élevée et la plus basse (*figure 16*). Ceci peut s'expliquer par la sélection des patients qui a été faite lors de la deuxième vague épidémique de Covid-19 en France. En effet, les patients étaient déjà informés que certaines comorbidités présentaient des risques plus élevés de formes graves, notamment l'âge. Ils avaient donc tendance à venir à l'hôpital plus précocement dans l'évolution de la maladie, ce qui a pu éviter de développer une forme grave.

Les patients décédés sont ceux dont l'âge est le plus élevé (*figure 16*) et ceux dont les comorbidités sont les plus présentes, notamment le diabète, l'HTA et le cancer (*figure 18A*). Par conséquent, ces patients ont un risque majoré de décès précoce. Par ailleurs, la durée d'hospitalisation est d'autant plus longue que les patients sont graves (*figure 17A*). Or, ces patients sont plus à risque de développer des complications comme décrit dans l'étude de Ayoubkhani et al. (70). Cette étude montre que près d'un tiers des patients admis à l'hôpital pour Covid-19 ont été réadmis dans les 140 jours suivant leur sortie et que plus d'une personne sur 10 était décédée.

L'augmentation du délai entre l'apparition des symptômes et la PCR de primo-infection à SARS-CoV-2 entre le groupe 7 et le groupe 4 ainsi que la diminution de ce délai du groupe 4 au groupe 1 (*figure 17B*) peut s'expliquer par les différents types de malades cités par Lescure et al. (11). En effet, trois types de malades sont décrits : un premier groupe de patients avec peu de signes cliniques, un deuxième groupe de malades ayant des symptômes légers au départ avec une aggravation autour du 10^{ème} jour et apparition d'un syndrome de détresse respiratoire aigu, et un troisième groupe de patients s'aggravant rapidement vers un syndrome respiratoire aigu puis une défaillance multiviscérale conduisant au décès. Ce dernier groupe était principalement composé de patients âgés.

Le premier groupe, non grave, se teste majoritairement après la période d'incubation du virus dont la médiane est de 5 jours. Ils correspondent à nos groupes 5,6,7.

Le deuxième groupe a une probabilité importante de se tester lors de l'aggravation tardive qui suit les premiers symptômes et ce groupe peut être associé dans notre étude aux groupes 2,3 et 4. On peut se demander si ce groupe de patients aurait eu

un meilleur pronostic en allant se tester plus tôt après l'apparition des premiers symptômes.

Le troisième groupe correspond à notre groupe 7 dont l'aggravation de l'état de santé est rapide, conduisant ces patients à se tester plus rapidement que le groupe précédent.

Nous avons mis en évidence que certaines comorbidités (HTA, diabète et cancer) étaient associées à un risque plus important de développer une forme grave (*figure 18*), ce qui est en accord avec la méta analyse de Javanmardi et al.(15).

Aussi, nous avons identifié le traitement par antiagrégants plaquettaires (*figure 19A*) comme facteur de risque de forme grave, néanmoins le RR reste proche de 1 (*tableau 12*). Cela peut s'expliquer par l'hétérogénéité de la population, qui par leurs antécédents nécessitent ce traitement (patients coronariens, avec des antécédents d'accidents vasculaires cérébraux ischémiques, de thromboses ...). Ces personnes prisent isolément peuvent avoir un risque relatif de faire une forme grave de Covid-19 très variable.

La *figure 20* montre que la gravité du Covid-19 est corrélée à une augmentation des valeurs de CRP et de calprotectine sérique. Cette observation est retrouvée dans la méta analyse de Ji et al. (71). Également, le score TDM a tendance à être bas (correspond aux lésions pulmonaires les plus étendues) dans les groupes de diagnostic les plus graves (*figure 20*) comme démontré dans l'étude de Liu et al. (72) Cependant, la classification que nous avons utilisé dans l'étude prend en compte l'absence de TDM réalisé : cela a permis de mettre en évidence que les patients non graves (groupes 6 et 7) sont retournés à leur domicile sans TDM mais aussi que les patients décédés (groupe 1) présentent une proportion de prise en charge sans TDM (*figure 20A*). Ce biais peut s'expliquer car certains des patients décédés sont arrivés à l'hôpital avec un tableau grave d'emblée, ce qui a conduit à une prise en charge sans TDM et à une hospitalisation courte (*figure 17A*).

Le score qSOFA a un intérêt dans la prédiction du décès, toutefois, ce score est un score très simplifié, actuellement utilisé avant l'orientation ou non sur une hospitalisation par la régulation du SAMU, et dans notre étude ne permet pas de discriminer les patients.

Les scores de Fine (*figure 23A*) et SAPSII (*figure 23B*) sont intéressants dans la prédiction de l'évolution du patient vers une forme grave.

Toutefois, l'utilisation de scores multivariés pour l'évaluation de patients durant leur phase initiale d'admission aux urgences médicales est critiquable car ils n'ont été validés que dans un contexte de soins intensifs/réanimation.

Il faudrait réaliser une nouvelle analyse de ces scores incluant des patients hospitalisés pour infection au SARS-CoV-2 afin de les valider, et éventuellement créer de nouveaux scores, plus adaptés au contexte d'orientation rapide des patients.

Conclusion et perspectives

Nous pouvons donc conclure que la calprotectine sérique paraît être un marqueur intéressant avec un taux élevé de cette protéine associé aux formes graves de Covid-19. Les concentrations mesurées dans les 24 premières heures d'hospitalisation sont associées à la gravité du diagnostic de primo-infection à SARS-CoV-2 selon nos groupes de diagnostic (à l'exception des patients décédés), mais il semble difficile d'envisager de proposer ce dosage en routine comme marqueur prédictif d'une évolution défavorable des patients. Il faudrait pouvoir étudier ce marqueur sur un échantillon de plus grande taille dans une étude prospective et évaluer s'il peut remplacer le TDM par exemple dans la prédiction d'une forme grave de Covid-19. En effet, le TDM est un examen moins rapide, plus onéreux, qui nécessite plus de personnel et moins accessible qu'une analyse avec dosage automatisé.

Pour l'évaluer, il faudrait réaliser une étude prospective comprenant 2 bras : un groupe où la calprotectine sérique est dosée, et un deuxième groupe dans lequel on réalise le scanner afin d'étudier si la calprotectine sérique est meilleure que le scanner dans la prédiction de l'évolution vers une forme grave de Covid-19.

Néanmoins, en fonction de nos résultats actuels et notamment, puisque nous avons noté que la calprotectine sérique ne démontrait pas de supériorité face à d'autres marqueurs tels que la CRP par exemple, il nous semble peu justifié de proposer ce type d'étude complémentaire.

Nous avons noté que certains scores composites clinico-biologiques pouvaient être d'intérêt dans la prédiction du risque des patients présentant une primo-infection à SARS-CoV-2.

Valider de tels scores pour une utilisation aux urgences médicales permettrait probablement, à l'aide de moyens informatiques dédiés, d'améliorer la prédiction du risque des patients admis dans le service des urgences médicales et ainsi de mieux les orienter, plus rapidement. Nous pouvons donc penser que l'utilisation de l'intelligence artificielle ouvrira de nouvelles portes à l'avenir et permettra de proposer dans ce contexte de nouveaux biomarqueurs.

Bibliographie

1. To KKW, Sridhar S, Chiu KHY, Hung DLL, Li X, Hung IFN, et al. Lessons learned 1 year after SARS-CoV-2 emergence leading to COVID-19 pandemic. *Emerg Microbes Infect.* 2021;10(1):507.
2. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. Brief Report: A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med.* 2 févr 2020;382(8):727.
3. 20200121-sitrep-1-2019-ncov.pdf [Internet]. [cité 12 sept 2022]. Disponible sur: <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200121-sitrep-1-2019-ncov.pdf>
4. nCoVsitrep23Jan2020-eng.pdf [Internet]. [cité 12 sept 2022]. Disponible sur: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/330762/nCoVsitrep23Jan2020-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
5. Sophie T. Aspects immunologiques et virologiques de l'infection par le SARS-CoV-2. 2020;135.
6. Rajpal VR, Sharma S, Sehgal D, Singh A, Kumar A, Vaishnavi S, et al. A comprehensive account of SARS-CoV-2 genome structure, incurred mutations, lineages and COVID-19 vaccination program. *Future Virol.* mai 2022;
7. Jungreis I, Sealfon R, Kellis M. SARS-CoV-2 gene content and COVID-19 mutation impact by comparing 44 Sarbecovirus genomes. *bioRxiv.* 2 sept 2020;2020.06.02.130955.
8. Khailany RA, Safdar M, Ozaslan M. Genomic characterization of a novel SARS-CoV-2. *Gene Rep.* juin 2020;19:100682.
9. Chen WH, Hotez PJ, Bottazzi ME. Potential for developing a SARS-CoV receptor-binding domain (RBD) recombinant protein as a heterologous human vaccine against coronavirus infectious disease (COVID)-19. *Hum Vaccines Immunother.* 2 juin 2020;16(6):1239-42.
10. Coronavirus et Covid-19 □ Inserm, La science pour la santé [Internet]. Inserm. [cité 24 août 2022]. Disponible sur: <https://www.inserm.fr/dossier/coronavirus-sars-cov-et-mers-cov/>
11. Lescure FX, Bouadma L, Nguyen D, Parisey M, Wicky PH, Behillil S, et al. Clinical and virological data of the first cases of COVID-19 in Europe: a case series. *Lancet Infect Dis.* juin 2020;20(6):697-706.
12. who-china-joint-mission-on-covid-19-final-report.pdf [Internet]. [cité 24 août 2022]. Disponible sur: <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/who-china-joint-mission-on-covid-19-final-report.pdf>
13. Semenzato L, Botton J, Drouin J, Cuenot F, Weill A, Zureik M. Maladies chroniques, états de santé et risque d'hospitalisation et de décès hospitalier pour COVID-19 : analyse comparative de données des deux vagues épidémiques de 2020 en France à partir d'une cohorte de 67 millions de personnes. :48.
14. Ferrari D, Motta A, Stollo M, Banfi G, Locatelli M. Routine blood tests as a potential diagnostic tool for COVID-19. *Clin Chem Lab Med CCLM.* 1 juill 2020;58(7):1095-9.
15. Javanmardi F, Keshavarzi A, Akbari A, Emami A, Pirbonyeh N. Prevalence of underlying diseases in died cases of COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *PloS One.* 2020;15(10):e0241265.
16. Wynants L, Van Calster B, Collins GS, Riley RD, Heinze G, Schuit E, et al. Prediction models for diagnosis and prognosis of covid-19: systematic review and

critical appraisal. *BMJ*. 2020;m1328-m1328.

17. Izcovich A, Ragusa MA, Tortosa F, Lavena Marzio MA, Agnoletti C, Bengolea A, et al. Prognostic factors for severity and mortality in patients infected with COVID-19: A systematic review. *PLoS ONE*. 17 nov 2020;15(11):e0241955.
18. Foster KJ, Jauregui E, Tajudeen B, Bishehsari F, Mahdavinia M. Smell loss is a prognostic factor for lower severity of coronavirus disease 2019. *Ann Allergy Asthma Immunol*. oct 2020;125(4):481-3.
19. Talavera B, García-Azorín D, Martínez-Pías E, Trigo J, Hernández-Pérez I, Valle-Peñacoba G, et al. Anosmia is associated with lower in-hospital mortality in COVID-19. *J Neurol Sci*. 15 déc 2020;419:117163.
20. Tong JY, Wong A, Zhu D, Fastenberg JH, Tham T. The Prevalence of Olfactory and Gustatory Dysfunction in COVID-19 Patients: A Systematic Review and Meta-analysis. *Otolaryngol--Head Neck Surg Off J Am Acad Otolaryngol-Head Neck Surg*. juill 2020;163(1):3-11.
21. Mao L, Jin H, Wang M, Hu Y, Chen S, He Q, et al. Neurologic Manifestations of Hospitalized Patients With Coronavirus Disease 2019 in Wuhan, China. *JAMA Neurol*. juin 2020;77(6):1-9.
22. Covid-19 : actualisation de la liste des facteurs de risque de forme grave [Internet]. [cité 24 août 2022]. Disponible sur: <https://www.hcsp.fr/Explore.cgi/AvisRapportsDomaine?clefr=942>
23. Rivellese F, Prediletto E. ACE2 at the centre of COVID-19 from paucisymptomatic infections to severe pneumonia. *Autoimmun Rev*. juin 2020;19(6):102536.
24. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study - *The Lancet* [Internet]. [cité 26 août 2022]. Disponible sur: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(20\)30566-3/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(20)30566-3/fulltext)
25. Prognostic factors for severity and mortality in patients infected with COVID-19: A systematic review - *PubMed* [Internet]. [cité 25 août 2022]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33201896/>
26. Danwang C, Endomba FT, Nkeck JR, Wouna DLA, Robert A, Noubiap JJ. A meta-analysis of potential biomarkers associated with severity of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Biomark Res*. 31 août 2020;8(1):37.
27. Li B, Yang J, Zhao F, Zhi L, Wang X, Liu L, et al. Prevalence and impact of cardiovascular metabolic diseases on COVID-19 in China. *Clin Res Cardiol*. 2020;109(5):531-8.
28. Wang D, Hu B, Hu C, Zhu F, Liu X, Zhang J, et al. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA*. 17 mars 2020;323(11):1061-9.
29. Lippi G, Lavie CJ, Sanchis-Gomar F. Cardiac troponin I in patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19): Evidence from a meta-analysis. *Prog Cardiovasc Dis*. 2020;63(3):390-1.
30. Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet Lond Engl*. 2020;395(10229):1054-62.
31. Zheng YY, Ma YT, Zhang JY, Xie X. COVID-19 and the cardiovascular system. *Nat Rev Cardiol*. 2020;17(5):259-60.
32. Driggin E, Madhavan MV, Bikdeli B, Chuich T, Laracy J, Biondi-Zoccai G, et al. Cardiovascular Considerations for Patients, Health Care Workers, and Health Systems During the COVID-19 Pandemic. *J Am Coll Cardiol*. 12 mai

2020;75(18):2352-71.

33. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet Lond Engl.* 2020;395(10223):497-506.
34. Ruan Q, Yang K, Wang W, Jiang L, Song J. Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China. *Intensive Care Med.* 2020;46(5):846-8.
35. Yang X, Yu Y, Xu J, Shu H, Xia J, Liu H, et al. Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study. *Lancet Respir Med.* mai 2020;8(5):475-81.
36. Shi S, Qin M, Shen B, Cai Y, Liu T, Yang F, et al. Association of Cardiac Injury With Mortality in Hospitalized Patients With COVID-19 in Wuhan, China. *JAMA Cardiol.* juill 2020;5(7):802-10.
37. Liu F, Li L, Xu M, Wu J, Luo D, Zhu Y, et al. Prognostic value of interleukin-6, C-reactive protein, and procalcitonin in patients with COVID-19. *J Clin Virol.* juin 2020;127:104370.
38. Kazemi E, Soldoozi Nejat R, Ashkan F, Sheibani H. The laboratory findings and different COVID-19 severities: a systematic review and meta-analysis. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 16 mars 2021;20(1):17.
39. Zhu L, Xu X, Ma K, Yang J, Guan H, Chen S, et al. Successful recovery of COVID-19 pneumonia in a renal transplant recipient with long-term immunosuppression. *Am J Transplant.* juill 2020;20(7):1859-63.
40. 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.
41. Li H, Liu L, Zhang D, Xu J, Dai H, Tang N, et al. SARS-CoV-2 and viral sepsis: observations and hypotheses. *Lancet Lond Engl.* 2020;395(10235):1517-20.
42. Jiang SQ, Huang QF, Xie WM, Lv C, Quan XQ. The association between severe COVID-19 and low platelet count: evidence from 31 observational studies involving 7613 participants. *Br J Haematol.* 2020;190(1):e29-33.
43. Zhang B, Zhou X, Qiu Y, Song Y, Feng F, Feng J, et al. Clinical characteristics of 82 cases of death from COVID-19. *PLoS ONE.* 9 juill 2020;15(7):e0235458.
44. Pan F, Ye T, Sun P, Gui S, Liang B, Li L, et al. Time Course of Lung Changes On Chest CT During Recovery From 2019 Novel Coronavirus (COVID-19) Pneumonia. *Radiology.* 13 févr 2020;200370.
45. Li X, Li T, Wang H. Treatment and prognosis of COVID-19: Current scenario and prospects (Review). *Exp Ther Med.* janv 2021;21(1):3.
46. Blibech H, Belkhir D, Snene H, Jebali MA, Negra F, Miladi S, et al. Anomalies de la tomodensitométrie thoracique au cours de la pneumonie à COVID-19 selon la durée des symptômes. *Rev Mal Respir Actual.* janv 2022;14(1):226.
47. Xiong Y, Sun D, Liu Y, Fan Y, Zhao L, Li X, et al. Clinical and High-Resolution CT Features of the COVID-19 Infection: Comparison of the Initial and Follow-up Changes. *Invest Radiol.* 2020;10.1097/RLI.0000000000000674.
48. Li K, Wu J, Wu F, Guo D, Chen L, Fang Z, et al. The Clinical and Chest CT Features Associated With Severe and Critical COVID-19 Pneumonia. *Invest Radiol.* 2020;10.1097/RLI.0000000000000672.
49. Yang R, Li X, Liu H, Zhen Y, Zhang X, Xiong Q, et al. Chest CT Severity Score: An Imaging Tool for Assessing Severe COVID-19. *Radiol Cardiothorac Imaging.* 30 mars 2020;2(2):e200047.

50. COVID-19 : EN DIRECT | SFR e-Bulletin [Internet]. [cité 13 sept 2022]. Disponible sur: <https://ebulletin.radiologie.fr/covid19>
51. Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonça A, Bruining H, et al. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med.* juill 1996;22(7):707-10.
52. Angus DC, Seymour CW, Coopersmith CM, Deutschman CS, Klompas M, Levy MM, et al. A Framework for the Development and Interpretation of Different Sepsis Definitions and Clinical Criteria. *Crit Care Med.* mars 2016;44(3):e113-121.
53. Fine MJ, Auble TE, Yealy DM, Hanusa BH, Weissfeld LA, Singer DE, et al. A prediction rule to identify low-risk patients with community-acquired pneumonia. *N Engl J Med.* 23 janv 1997;336(4):243-50.
54. Le Gall JR, Lemeshow S, Saulnier F. A new Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study. *JAMA.* 22 déc 1993;270(24):2957-63.
55. Ji D, Zhang D, Xu J, Chen Z, Yang T, Zhao P, et al. Prediction for Progression Risk in Patients With COVID-19 Pneumonia: The CALL Score. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 12 sept 2020;71(6):1393-9.
56. Ndiaye D, Bachellier L, Vuagnat A, Sunder S, Talarmin J, Dubée V, et al. COVID-score : un outil de détection clinique des cas de COVID-19 en situation de co-circulation virale. *Med Mal Infect.* sept 2020;50(6):S30.
57. Edgeworth J, Gorman M, Bennett R, Freemont P, Hogg N. Identification of p8,14 as a highly abundant heterodimeric calcium binding protein complex of myeloid cells. *J Biol Chem.* 25 avr 1991;266(12):7706-13.
58. Broome AM, Ryan D, Eckert RL. S100 protein subcellular localization during epidermal differentiation and psoriasis. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc.* mai 2003;51(5):675-85.
59. Moore BW. A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun.* 9 juin 1965;19(6):739-44.
60. Marenholz I, Lovering RC, Heizmann CW. An update of the S100 nomenclature. *Biochim Biophys Acta.* nov 2006;1763(11):1282-3.
61. Andersson KB, Sletten K, Berntzen HB, Dale I, Brandtzaeg P, Jellum E, et al. The leucocyte L1 protein: identity with the cystic fibrosis antigen and the calcium-binding MRP-8 and MRP-14 macrophage components. *Scand J Immunol.* août 1988;28(2):241-5.
62. Rammes A, Roth J, Goebeler M, Klempt M, Hartmann M, Sorg C. Myeloid-related protein (MRP) 8 and MRP14, calcium-binding proteins of the S100 family, are secreted by activated monocytes via a novel, tubulin-dependent pathway. *J Biol Chem.* 4 avr 1997;272(14):9496-502.
63. Vogl T, Tenbrock K, Ludwig S, Leukert N, Ehrhardt C, van Zoelen MAD, et al. Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. *Nat Med.* sept 2007;13(9):1042-9.
64. Kiyeko GW, Hatterer E, Herren S, Di Ceglie I, van Lent PL, Reith W, et al. Spatiotemporal expression of endogenous TLR4 ligands leads to inflammation and bone erosion in mouse collagen-induced arthritis. *Eur J Immunol.* nov 2016;46(11):2629-38.
65. Ryckman C, Vandal K, Rouleau P, Talbot M, Tessier PA. Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 mars

2003;170(6):3233-42.

66. Besold AN, Gilston BA, Radin JN, Ramsoomair C, Culbertson EM, Li CX, et al. Role of Calprotectin in Withholding Zinc and Copper from *Candida albicans*. *Infect Immun*. févr 2018;86(2):e00779-17.
67. Vogl T, Ludwig S, Goebeler M, Strey A, Thorey IS, Reichelt R, et al. MRP8 and MRP14 control microtubule reorganization during transendothelial migration of phagocytes. *Blood*. 15 déc 2004;104(13):4260-8.
68. Silvin A, Chapuis N, Dunsmore G, Goubet AG, Dubuisson A, Derosa L, et al. Elevated Calprotectin and Abnormal Myeloid Cell Subsets Discriminate Severe from Mild COVID-19. *Cell*. 17 sept 2020;182(6):1401-1418.e18.
69. Wu C, Chen X, Cai Y, Xia J, Zhou X, Xu S, et al. Risk Factors Associated With Acute Respiratory Distress Syndrome and Death in Patients With Coronavirus Disease 2019 Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA Intern Med*. juill 2020;180(7):1-11.
70. Ayoubkhani D, Khunti K, Nafilyan V, Maddox T, Humberstone B, Diamond I, et al. Post-covid syndrome in individuals admitted to hospital with covid-19: retrospective cohort study. *The BMJ*. 31 mars 2021;372:n693.
71. Ji P, Zhu J, Zhong Z, Li H, Pang J, Li B, et al. Association of elevated inflammatory markers and severe COVID-19. *Medicine (Baltimore)*. 20 nov 2020;99(47):e23315.
72. Liu F, Zhang Q, Huang C, Shi C, Wang L, Shi N, et al. CT quantification of pneumonia lesions in early days predicts progression to severe illness in a cohort of COVID-19 patients. *Theranostics*. 27 avr 2020;10(12):5613-22.

Nom : LIGNIER

Prénom : Gauthier

ÉVALUATION DE L'INTÉRÊT PRÉDICTIF DE LA CALPROTECTINE SÉRIQUE DANS L'ÉVOLUTION D'UNE PRIMO-INFECTION À SARS-CoV-2

Toulouse, le 14 octobre 2022

La pandémie de Covid-19 a mis à l'épreuve le système de santé et rapidement il a fallu anticiper l'évolution des patients vers une forme grave de la maladie. Afin d'éviter une surcharge des services de soins critiques, des paramètres potentiellement prédictifs sont évalués.

La calprotectine sérique est une protéine dont la sécrétion est stimulée lors d'un processus inflammatoire, notamment dans l'orage cytokinique, et qui serait associé aux formes graves de la maladie.

Notre étude a inclus 308 patients de juin à octobre 2020 avec un primodiagnostic à SARS-CoV-2 confirmé par PCR et prélèvement d'un tube hépariné concomitant afin de réaliser des dosages de marqueurs biologiques, dont la calprotectine sérique. Les autres variables sont recueillies via les logiciels Orbis et Molis et l'ensemble des variables sont évaluées pour leur potentiel prédictif.

Nos résultats montrent le profil intéressant de la calprotectine sérique pour répondre à notre objectif sans toutefois parvenir à supplanter un autre marqueur de l'inflammation : la CRP.

The Covid-19 pandemic put the health care system to the test and it was quickly necessary to anticipate the progression of patients to a severe form of the disease. In order to avoid overloading critical care services, potentially predictive parameters are being evaluated.

Serum calprotectin is a protein whose secretion is stimulated during an inflammatory process, notably in the cytokine storm, and which is thought to be associated with severe disease.

Our study included 308 patients from June to October 2020 with a primary diagnosis of SARS-CoV-2 confirmed by PCR and concomitant heparinized tube sampling to perform biomarker assays, including serum calprotectin. The other variables were collected using Orbis and Molis software and all variables were assessed for their predictive potential.

Our results show the interesting profile of serum calprotectin to meet our objective without however managing to supplant another marker of inflammation: CRP.

DISCIPLINE administrative : Pharmacie - Biologie médicale

MOTS-CLÉS : Covid-19, Calprotectine sérique, Prédiction, Primodiagnostic, Forme grave, CRP

Université Toulouse III Paul Sabatier – Faculté des Sciences Pharmaceutiques
35 chemin des maraîchers
31062 Toulouse Cedex 4

Directrice de thèse : Madame la Docteure Françoise Maupas-Schwalm