



# 2eme Journée Nationale sur le COVID long Nancy, 8 décembre 2022



## COVID long : les mécanismes physiopathologiques potentiels

Dominique SALMON CERON, Maladies Infectieuses et Tropicales,  
Université de Paris

# Conflits d'intérêt

Aucun conflit d'intérêt en rapport avec cette présentation

# Méthodologie de la recherche bibliographique



- Très nombreux articles publiés sur le thème du COVID long à la fois fondamentaux, expérimentaux et cliniques
- Sélection pour cette présentation de
  - travaux cliniques
  - menés sur au moins 30 patients
  - avec si possible au moins un groupe témoin,
- Limites
  - Recherche non exhaustive
  - Les travaux sur les formes sévères prolongées ne reflètent pas le COVID long survenu après une forme ambulatoire
  - Le bon groupe comparatif qui est a priori le groupe « COVID résolu » n'est pas toujours présent dans les études

# Mécanismes physiopathologiques potentiels du COVID long

- Encore incomplètement compris
- Probablement non exclusifs

## Expression différente selon le terrain :

- génétique,
- immunitaire,
- allergique,
- hormonal,
- environnemental
- l'histoire infectieuse (charge virale, variant, coinfection herpès virus)



Dérégulation immunitaire adaptative (cell T, B, NK) et innée (PN, mastocytes, ..)

cytokines, proinflammatoires, Inflammation tissulaire endothélie

Activation coagulation

Microcaillots

Toxicité mitochondriale

Réactivation d'herpès virus (EBV, HHV6..)

Perturbation du microbiote....

# Le terrain

- Plus de femmes <sup>1-3</sup>
- Terrain atopique<sup>3</sup>
- Terrain génétique?
  - Certains allèles HLA classe II plus prévalents dans les COVID sévères :  
*DRB1\*04:01DRB1\*01:01* <sup>5</sup>
  - quid des COVID long?
- Réponse immune contre la spike
  - parfois excessive et prolongée ou parfois absente ou de mauvaise qualité <sup>1, 3, 4</sup>

1. Augustin et al, *Lancet Reg Health Eur*. 2021 Jul;6:100122.

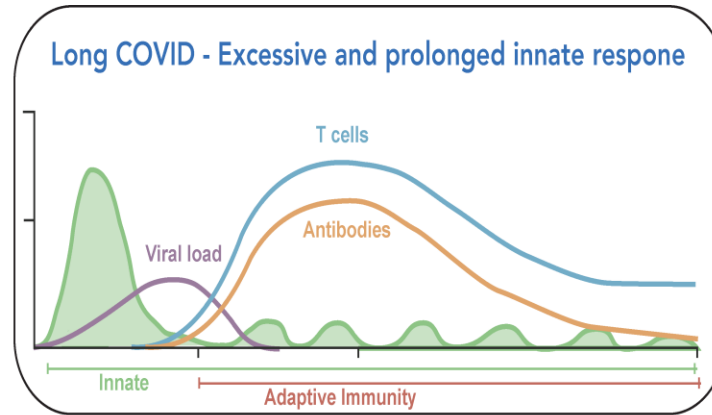
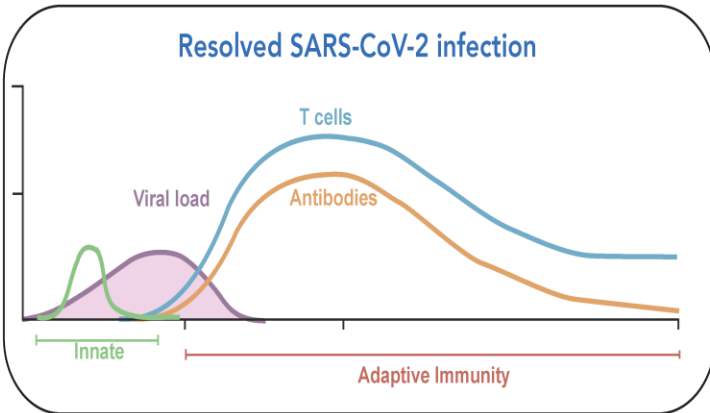
2. Sudre et al, *Nat Med*. 2021 Apr;27(4):626-631.

3. Salmon et al, *J Infect*. 2021 Feb;82(2):e1-e4.

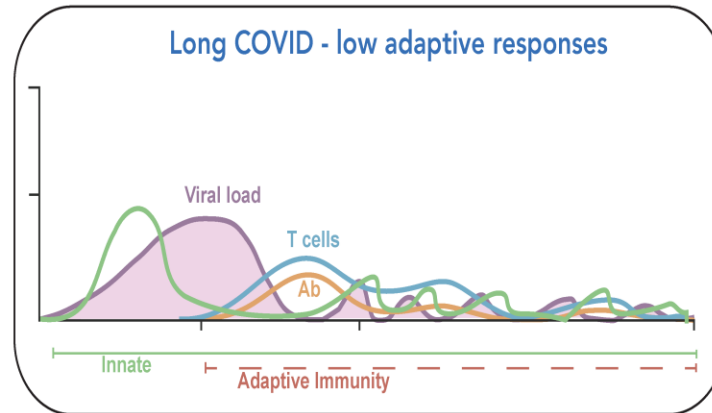
4. Chakrabarti, 2021. *CROI*, 2021

5. Langton DJ et al. *HLA*. 2021 Jul;98(1):14-22.

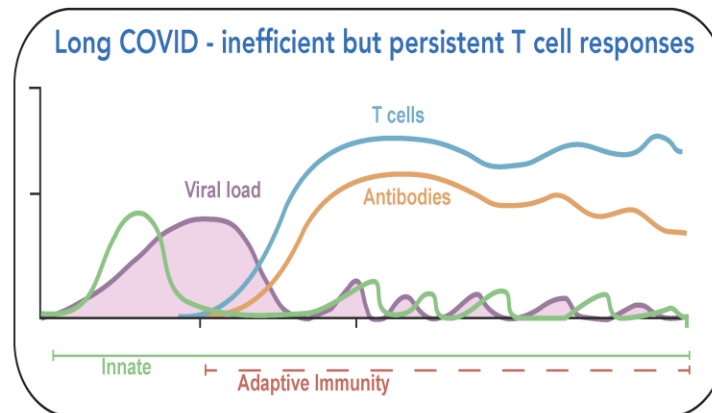
# Possible immune mechanisms in Long COVID



→ **Tissue damage  
Inflammation**



→ **Suboptimal  
T cell  
immunity**  
↓  
**Persistent  
viral replication**  
↓  
**Tissue damage  
Inflammation**



References on adaptive responses:  
 Chakrabarti L., presentation Première Journée Nationale sur le Covid Long, 2021  
 Scherlinger M, Infect. Dis. Ther. (2021)- 10:1747  
 Krishna B.A., eBiomedicine (2022) 81: 104129

# Mécanismes physiopathologiques potentiels du COVID long

- Encore incomplètement compris
- Probablement non exclusifs

## Expression différente selon le terrain :

- génétique,
- immunitaire,
- allergique,
- hormonal,
- environnemental
- l'histoire infectieuse (charge virale, variant, coinfection herpès virus)



Dérégulation immunitaire adaptative (cell T, B, NK) et innée (PN, mastocytes, ..)

cytokines, proinflammatoires, Inflammation tissulaire endothélie

Activation coagulation

Microcaillots

Toxicité mitochondriale

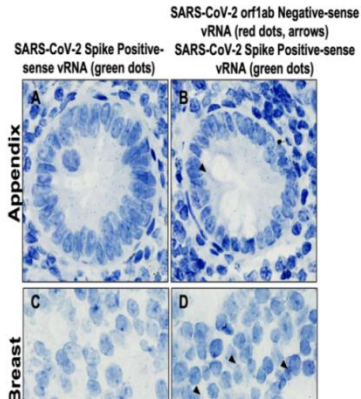
Réactivation d'herpès virus (EBV, HHV6..)

Perturbation du microbiote....

**Infection mal résolue**

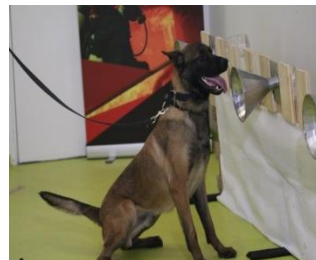
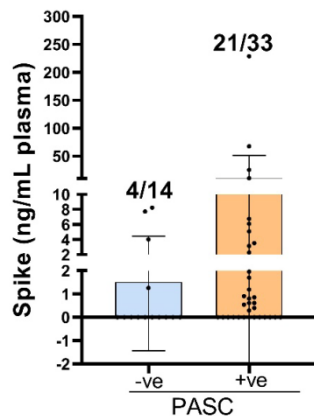


# Cas de persistance de protéine spike ou d'ARN viral dans des formes sévères prolongées ou au cours du COVID long



Pts COVID sévère ou COVID long > 6 mois après le COVID initial

- ARN viral dans les **fentes olfactives**<sup>1</sup>
- ARN viral et Ag de nucléocapside dans **tissus digestifs**<sup>2, 3</sup>
- Protéine spike dans les **monocytes**<sup>4</sup>
- Protéine spike et ARN viral dans le **sang**<sup>5, 6</sup>
- Composés organiques volatils dans la **sueur** détectés par les chiens<sup>7</sup>
- Persistance virale dans **différents tissus à l'autopsie**<sup>8</sup>



1. De Melo G et al. *Sc Trans Med*, 2021
2. Cheung C et al. *Gut*, 2021
3. Natarajan A et al. *Medicine*, 2022
4. Patterson B et al. *Frontiers immunol* 2022)
5. Swank Z et al, *Clin Infect Dis*. 2022 Sep 2
6. Craddock V et al, *MerRxiv* 2022
7. Grandjean D et al. *J Clin Trials* 2022
8. Chertow D et al. *Research Square*, 2021

# Etudes autopsiques : ARN et ARN subgénomiques détectés dans divers tissus humains jusqu'à 230 j

- 44 sujets décédés de COVID (82% intubés) ou autre cause jusqu'à 230 jours post COVID.
- Trois classes selon le délai du décès précoce " (n=17, ≤ 14); intermédiaire" (n=13, J15-J30); tardive" (n=14, ≥ J31)
- Techniques virologiques : droplet digital PCR (ddPCR), hybridation in situ (ISH), qRT-PCR pour détecter ARN subgénomiques (sgRNA), culture

## Résultats

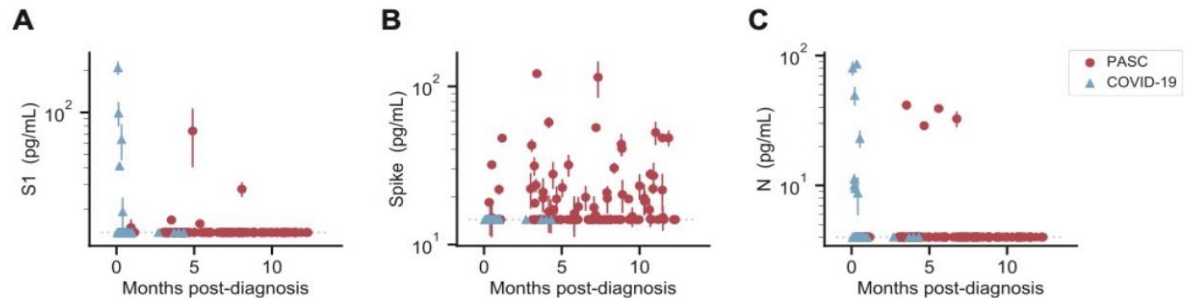
- **Détection ARN SARS-CoV-2 : 44/44 (100%) des cas**
- Peu d'inflammation tissulaire en dehors du poumon
- Détection **sgRNA dans au moins 1 tissu dans 50% cas** après J14 suggérant une réplication virale prolongée

Tissus	Positivité de la dd PCR (%)
respiratoire	43/44 (97.7%)
cardiovasculaire	35/44 (79.5%)
lymphoïde	38/44 (86.4%)
rénal et endocrine	28/44 (63.6%)
gastrointestinal	32/44 (72.7%)
reproductif	17/40 (42.5%)
muscle, peau, adipeux nerf périphérique	30/44 (68.2%)
Oeil	22/28 (57.9%)
Cerveau	10/11 (90.9%)

# Persistence de protéine spike circulante jusqu'à 12 mois au cours du COVID long

- 63 sujets COVID PCR+ : 26 COVID aigus dont 10 sévères et 37 COVID long
- Mesure plasmatique par technique SIMOA entre J0 et M12 : antigène S (S1 et Spike entière), antigène N, différentes cytokines

## Prévalence de détection



**Figure 1. SARS-CoV-2 antigen levels versus time.** The concentration of S1 (A), spike (B), and N (C) measured in the plasma of individuals over time after diagnosis with PASC or COVID-19 following SARS-CoV-2 infection. Multiple data points may correspond to the same individual, where repeat sampling was available. Data points represent mean values  $\pm$  SD (n = 2). Dashed lines indicate the LOD for each assay.

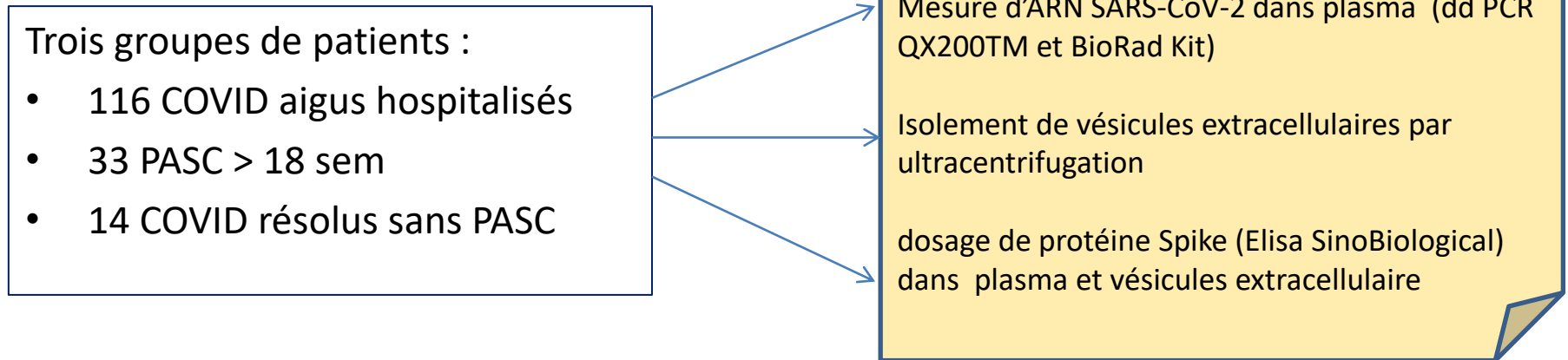
### Symptômes prolongés

Antigènes viraux détectés dans 65% cas  
Spike entière 60% >> prot S1 20%>> prot N 3%  
Taux élevés et fluctuants

### COVID aigu

Détection de S1 et N mais pas de Spike entière.  
Taux élevés qui chutent vite

# Persistence de protéine Spike circulante et symptômes prolongés de COVID (PASC)



## Résultats

- Protéine Spike : présence plus fréquente chez PASC que non PACS et parfois niveau plus élevé chez PASC que chez COVID aigus
- ARN viral : taux similaire chez les PACS et les COVID aigus
- Présence de protéine Spike liée à **l'existence de vésicules extracellulaires qui ne contiennent pas d'ARN viral**

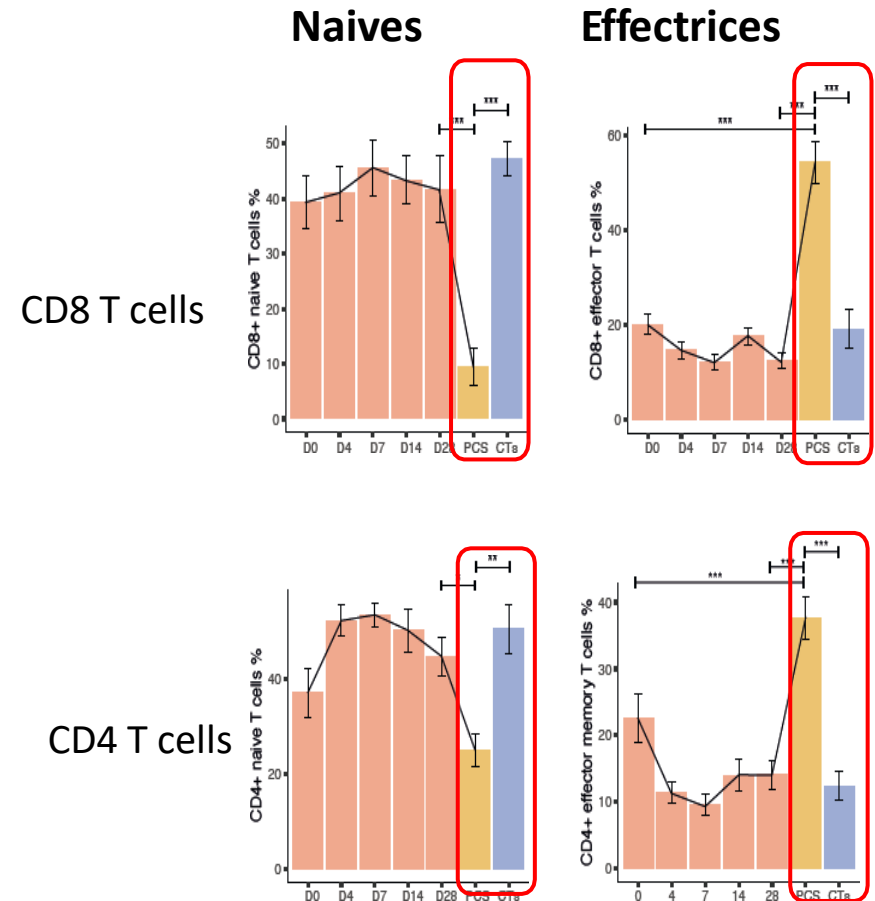
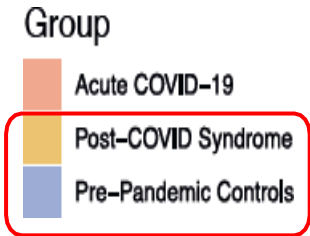
**Conclusion** : présence de vésicules extracellulaires qui contiennent la protéine Spike indépendamment de la présence d'ARN viral

# **Dérégulation immunitaire/inflammation**

# Activation lymphocytaire T soutenue et Covid long

- **Profil d'activation des cellules T** (des T naives et des T activées)<sup>1,2</sup>
- **Activation B** (instabilité au cours du temps du répertoire B anti-SARS-CoV-2)<sup>3</sup>
- Initialement spécifique de SARS-Cov-2 puis amplifiée par activation collatérale non-spécifique (*bystander activation*)
- Cette activation suggère une stimulation persistante par des antigènes viraux

1- Phetsouphanh C et al Nat Immunol. 2022,  
2. Acosta-Ampudia y et al. JID. 2022  
3. Graeber et al. Nature 2021

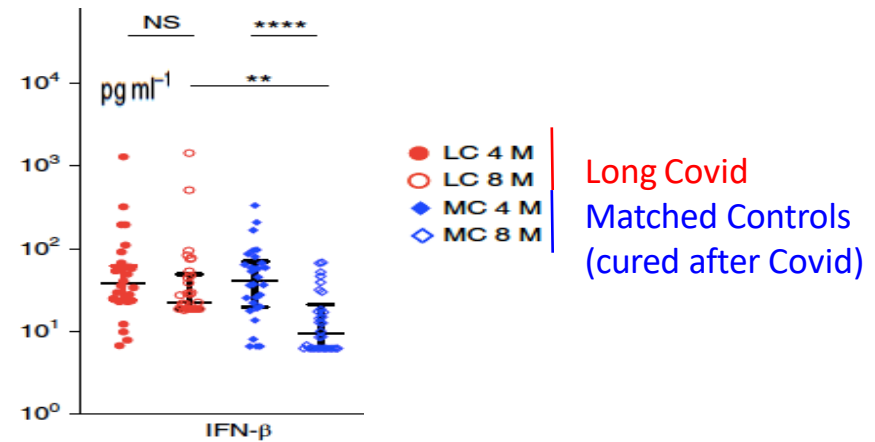


# Taux élevés de cytokines proinflammatoires dont l'interféron dans le COVID long

- Taux sériques anormalement élevés d'IFN- $\beta$ , IFN- $\lambda$ 1 vs témoins COVID résolus à 8 mois post-infection<sup>1</sup>

147 patients en 4 groupes :

- Covid long (LC, symptômes > 4 mois, n=31)
- Covid résolu (MC, n=31)
- Donneurs non exposés au Covid (DNE, n=36)
- Sujets infectés par d'autres coronavirus (HCoVs, n=25)



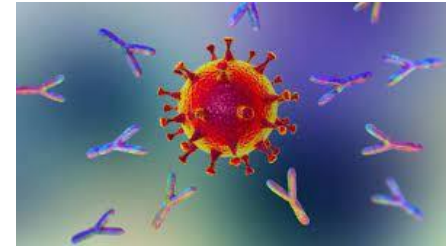
- Reproduction par d'autres équipes avec IFN et autres cytokines (VEGF, sCD40L, IL6)<sup>2,3</sup>

1. Phetsouphanh C et al. *Nat Immunol.* 2022

2. Patterson BK, et al. *Front Immunol.* 2021 Jun 28;12:70078

3. Schultheiß C et al. *J Med Virol* Pub Date: 2022-12-02, DOI:10.1002/jmv.28364

# Autoimmunité et COVID long



- Comme au cours du COVID aigu sévère des autoanticorps ont été rapportés au cours du COVID long (facteurs anti nucléaires , AC anticardiolipine..) <sup>1, 2</sup>
- Peu de maladies autoimmunes en dehors d'exacerbations de thyroidites.
- Autoimmunité qui pourrait être induite par
  - état proinflammatoire
  - mimétisme moléculaire (épitopes similaires entre le soi et le SARS CoV2) 1
  - activation par effet « by stander » <sup>3, 4</sup>
- Un terrain sous jacent n'est pas exclu

1- Pisavera et al. *Journal of Medical Virology*, 13 October 2022

2- Bertin D et al. *Int J Infect Dis* **113**, 23-25 (2021)

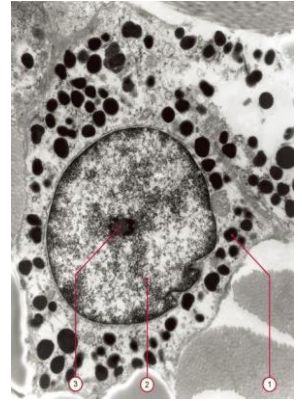
3- Rojas M et al. *Transl Med*, 2022. Mar 16

4- Merad M et al.. *Science* 2022?



# COVID long et syndrome d'activation mastocytaire secondaire

- Le SAMA : activation inappropriée des mastocytes <sup>1</sup>  
→ cascade cytokinique (histamine, trypase, chromogranine a...) et inflammation chronique multisystémique
- Le SARS CoV-2 active les mastocytes et d'autres cellules immunes <sup>2</sup>
- Les symptômes de SAMA (flushs, troubles digestifs , douleurs, céphalées, fatigue ..) sont prévalents au cours du COVID long <sup>3</sup>



Test thérapeutique (éviction aliments riches en histamine, anti H1 et H2..), licite devant des symptômes évocateurs

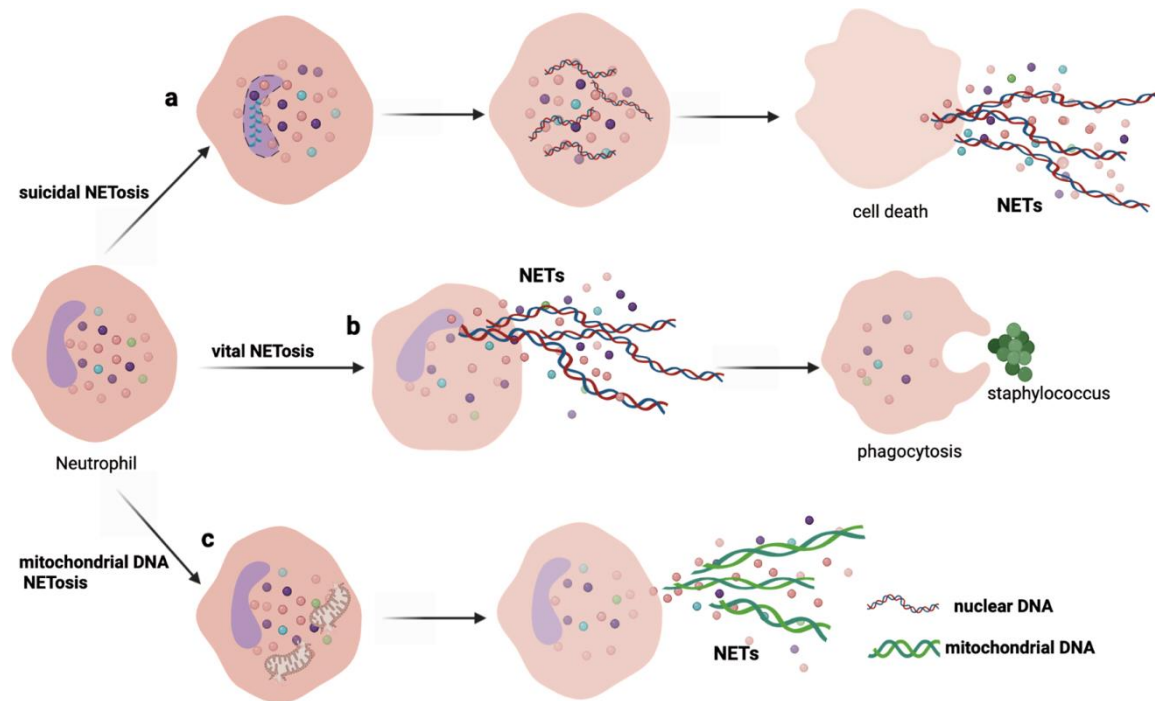
1. Afrin J et al. *Am J Med Sci* 2017; 353: 205.  
2. Gaebler C et al. *Nature* 2021.  
3. Wienstock LB et al. *J Inf Dis* 2021.

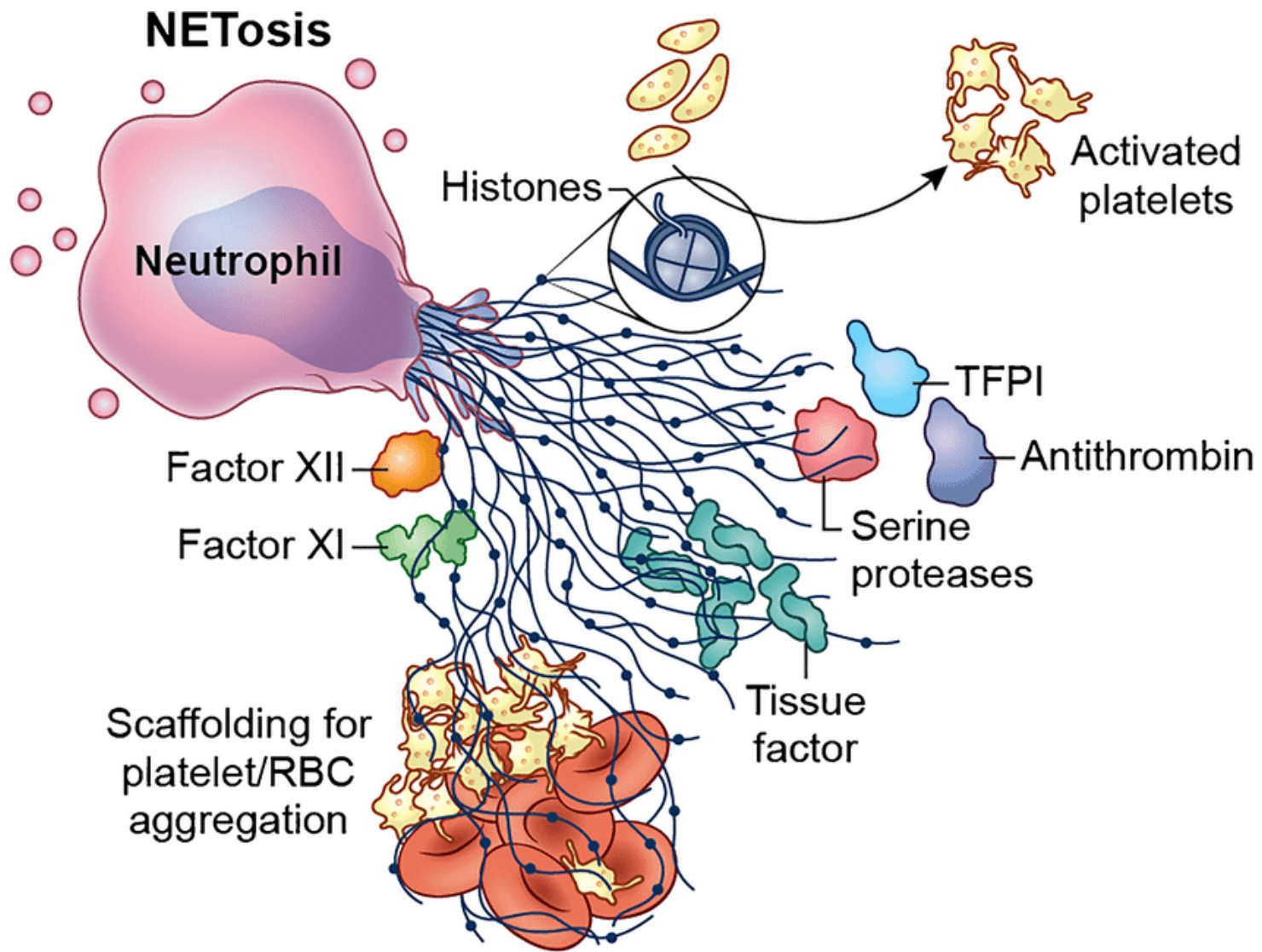
# NETS et NETose

## *Neutrophil extracellular traps*


- NETOSE : expulsion très rapide de fibres composées d'ADN circulant par les PN, lorsqu'il y a des microorganismes
- Les PN sont activés très rapidement, produisent des ROS qui conduisent à une décondensation de ADN puis à son expulsion
- La fonction est de piéger des micro-organismes pathogènes.

=> L'ADN circulant est donc un biomarqueur des NETs







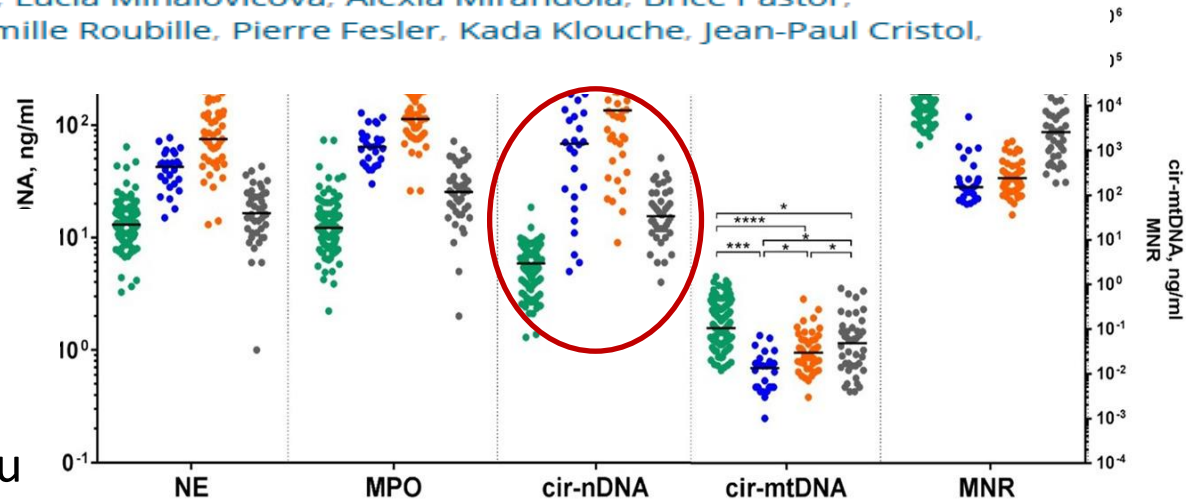


## Persistence of neutrophil extracellular traps and anticardiolipin auto-antibodies in post-acute phase COVID-19 patients

Ekaterina Pisareva, Stephanie Badiou, Lucia Mihalovičová, Alexia Mirandola, Brice Pastor, Andrei Kudriavtsev, Marie Berger, Camille Roubille, Pierre Fesler, Kada Klouche, Jean-Paul Cristol, Alain R. Thierry 

Cohorte de 112 patients  
ayant fait un COVID

-  non sévère n=26
-  \* sévère (soins critiques ou décès) n=44
-  \* post phase aigue (PAP) (~1 symptôme persistant à 6 mois) n=42
-  sujets sains (n=117)

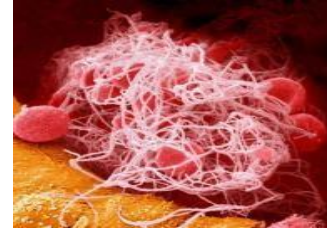


Concentration plasmatiques d'enzymes et ADN circulaire à différents stades

CirDNA: circulating cell-free DNA; MPO, myeloperoxidase; NE, neutrophil elastase; cir-mtDNA, circulating cell-free DNA of mitochondrial origin; MNR, ratio of mitochondrial to nuclear circulating DNA concentration

# **Activation de la coagulation - Inflammation endothéliale - Microcaillots**

# Hypercoagulabilité-Microcaillots



- Une incidence élevée de thromboses a été décrite au cours du COVID, persistante jusqu'à au moins un an<sup>1</sup>.
- **Dans le plasma de patients COVID aigu et COVID long, des micro caillots amyloïdes, résistants à la fibrinolyse ont été mis en évidence** <sup>2, 3</sup>.
  - Après solubilisation de ces caillots, détection dans le surnageant et le culot, de molécules inflammatoires :  $\alpha(2)$ -antiplasmine ( $\alpha 2AP$ ), chaînes de fibrinogène, protéine amyloïde A (SAA), facteur Willebrand FVW.
  - Ces caillots peuvent être induits dans le plasma par de la protéine spike recombinante et sont résistants à la fibrinolyse <sup>4</sup>.
  - A confirmer par d'autres groupes que celui de Pretorius

1- R. Knight, ... J. A. C. Sterne, Association of COVID-19 With Major Arterial and Venous Thrombotic Diseases: A *Circulation* **146**, 892-906 (2022); 2- A. Kruger, M... E. Pretorius, Proteomics of fibrin amyloid microclots in long COVID/post-acute sequelae of COVID-19 (PASC) shows many entrapped pro-inflammatory molecules that may also contribute to a failed fibrinolytic system. *Cardiovasc Diabetol* **21**, 190 (2022); 3- Pretorius *et al.* clotting protein pathology in Long COVID/Post-Acute Sequelae of COVID-19 (PASC) is accompanied by increased levels of antiplasmin *Cardiovasc Diabetol* (2021) **20**:172; 4- L. M. Grobbelaar, ... E. Pretorius, SARS-CoV-2 spike protein S1 induces fibrin(ogen) resistant to fibrinolysis: implications for microclot formation in COVID-19. *Biosci Rep* **41**, (2021);

# La même équipe suggère que des biomarqueurs sanguins refléteraient les dégâts endothéliaux et l'état pro-coagulant du COVID long.

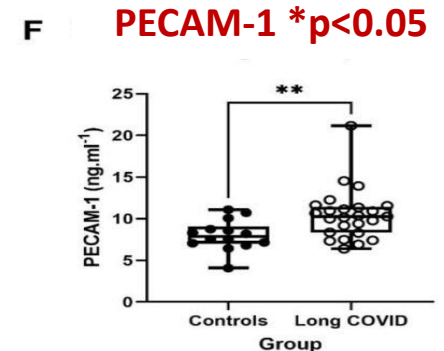
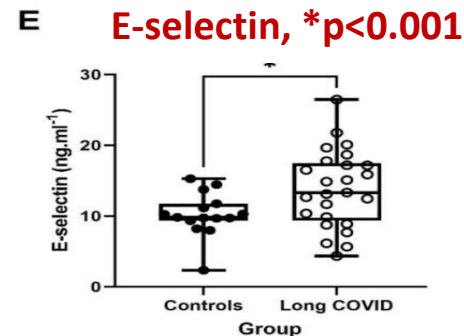
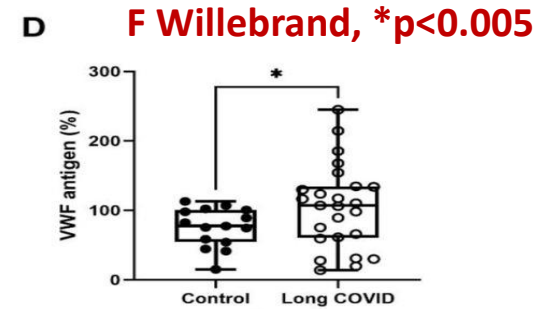
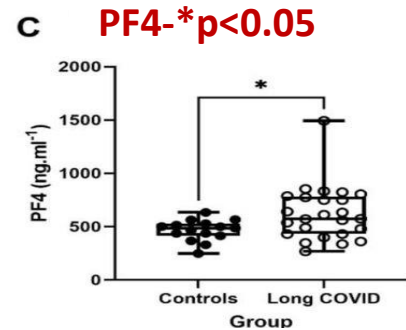
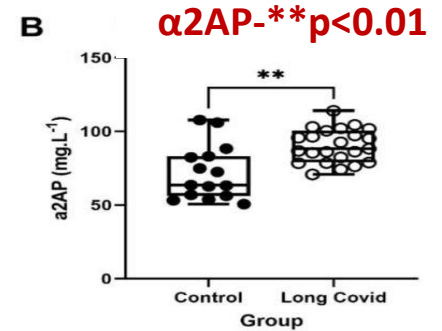
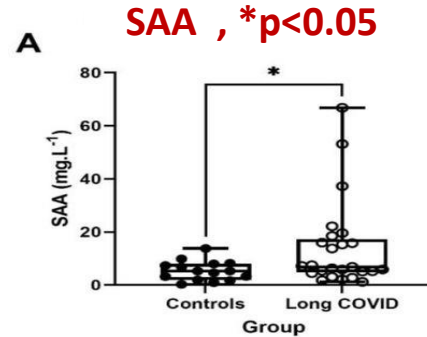
Dosage sériques de marqueurs inflammatoires retrouvés dans les microcaillots

Population testée : COVID long (n=25) et volontaires sains (n=15)

Résultats suggèrent une activation plaquettaire et d'une dysfonction endothéliale

Limite : les taux, quoique plus élevés chez les COVID long que chez les témoins, restent dans la norme. Pas de covid résolu

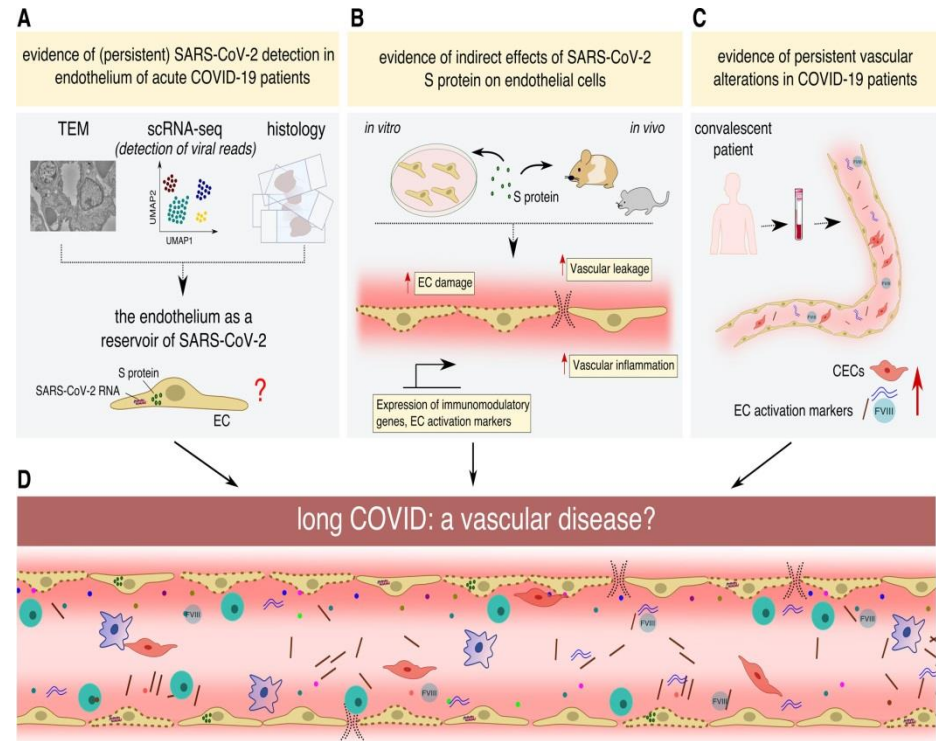
**Abbreviations:** SAA: Serum Amyloid A,  $\alpha$ -2AP:  $\alpha$ -2 antiplasmin, PF4: Platelet factor 4, VWF: Von Willebrand Factor, E-selectin: endothelial-leukocyte adhesion molecule 1, PECAM-1: Platelet endothelial cell adhesion molecule-1, PPP: Platelet poor plasma.



1- Turner S... Pretorius E. Increased levels of inflammatory molecules in blood of Long COVID patients point to thrombotic endotheliitis MedRxiv Oct 2022

# Inflammation endothéliale

- Osiaevi I, ... Rovas A . Persistent capillary rarefication in long COVID syndrome. *Angiogenesis*. 2022, 11:1–9.
  - Par videomicroscopie sublinguale (Glycocheck™)
- Martínez-Salazar, B. ...Y. DöringY. COVID-19 and the Vasculature: Current Aspects and Long-Term Consequences. *Front Cell Dev Biol* 2022. 10, 824851 (2022)
- Haffke M,...Sotzny F, Endothelial dysfunction and altered endothelial biomarkers in patients with post-COVID-19 syndrome and chronic fatigue syndrome (ME/CFS). *J Transl Med* 2022. 20, 138
- Fogarty H, ...O'Donnell JS. Persistent endotheliopathy in the pathogenesis of longCOVID syndrome. *J Thromb Haemost*. 2021 Oct;19(10):2546-2553





# **Toxicité mitochondriale**

# Dysfonction mitochondriale à l'exercice

- **L'intolérance à l'exercice** est une caractéristique du COVID long
- L'épreuve d'effort maximale cardiorespiratoire (CEPT), utilisée pour explorer les dyspnées non expliquées

## Au cours du COVID long<sup>1-3</sup>

1- **Réduction de la VO<sub>2</sub>max** d'origine périphérique plutôt que centrale et associée à une hyperventilation

2- **Taux élevés de lactates**

3- **Taux réduits de beta-oxydation des acides gras**



=> Constatations compatibles avec une **toxicité mitochondriale**

1- De Boer, E. et al. *Decreased Fatty Acid Oxidation and Altered Lactate Production during Exercise in Patients with Post-acute COVID-19 Syndrome.* *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2022**, 205,

1: Singh I. *Persistent Exertional Intolerance After COVID-19: Insights From Invasive Cardiopulmonary Exercise Testing.* *Chest.* 2022

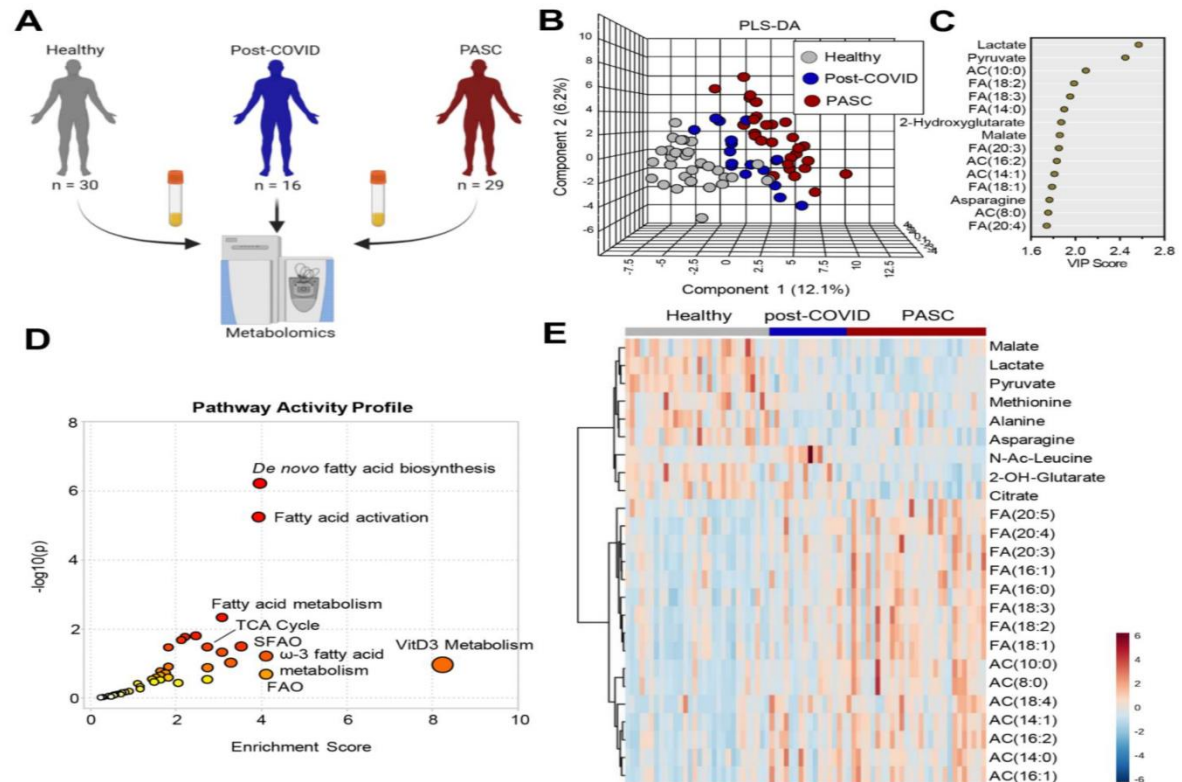
3- Shang, C et al. *SARS-CoV-2 Causes Mitochondrial Dysfunction and Mitophagy Impairment.* *Front. Microbiol.* **2021**, 12,

# Signatures métabolomiques au repos en faveur d'une dysfonction mitochondriale

Analyse métabolomique non ciblée par spectrophotométrie de masse dans 3 groupes: 29 PASC, 16 COVID résolus, 30 sujets sains

Le profil métabolique des PASC diffère des sujets sains et est intermédiaire chez les COVID résolus :

- Taux élevés d'acides gras non saturés
- Taux bas de mono- di- et tricarboxylates, polyamines, taurine
- Déplétion en tryptophane (liée à sévérité du COVID) ne se normalise pas chez les PASC.



# Microbiote et COVID long

- Une dysbiose intestinale a été constatée au cours du COVID sévère.
- COVID long :
  - étude prospective 106 patients COVID-19 suivis jusqu'à 6 mois et de 68 témoins sans COVID
  - Séquençage métagénomique Shotgun de 258 échantillons
  - A l'admission, profil du microbiote associé à la survenue de symptômes prolongés.

## A 6 mois

### Microbiote patients COVID LONG

1/ baisse du taux bactéries productrices de butyrate (*Bifidobacterium ps.*, *Faecalibacterium pr.*) qui seraient impliquées dans l'homéostasie immune

2/Taux élevé de *Ruminococcus gnavus*, *Bacteroides vulgatus*

### Microbiote patients GUERIS

semblable à 6 mois celui de participants sains sans COVID

# Réactivation virales EBV, HSV, VZV, HHV-6

- Décrites lors des formes sévères de COVID-19<sup>1, 2</sup>
- Au cours du COVID long;
  - Réascension des AC anti EBV VCA IgM/IgG<sup>3, 4</sup>
  - Positivation de charges virales EBV, HHV-6, en lien possible avec certains symptômes (cutanés, neurologiques...)

1- Naendrup JH et al . Reactivation of EBV and CMV in Severe COVID-19-Epiphomena or Trigger of Hyperinflammation in Need of Treatment? A Large Case Series of Critically ill Patients. *J Intensive Care Med.* 2022 Sep;37(9):1152-1158

3- Gold JE,. Investigation of Long COVID Prevalence and Its Relationship to Epstein-Barr Virus Reactivation. *Pathogens.* 2021 Jun 17;10(6):763.

4- Apostolou et al. Saliva antibody finger print of reactivated latent viruses after mild/asymptomatic COVID-19 is unique in patients with myalgic encephalomyalitis/chronic fatigue syndrome. *Frontiers in Immunology.* 2022; 13.

# Mécanismes potentiels explorés par la recherche

**Facteurs génétiques immunologiques, environnementaux**

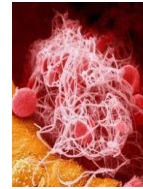
→ Réponse inadaptée

**Fragments viraux résiduels ou protéine Spike**

**Stimulation chronique immunité innée adaptative**

**Toxicité directe de la spike ?**

**Activation coagulation**

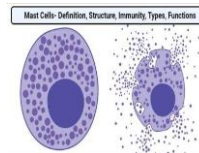


Microcaillots ?

**ROS, toxicité mitochondriale**

**Inflammation/endothélite**  
rupture barrière hémato-encéphalique ?

**Activation mastocytaire**



**Réactivation autres virus**

**Hypoxie  
Dysfonction mitochondriale**

**Captage O2**

**Fatigue,  
Brouillard cérébral,  
POTS.....**

**Symptômes inflammatoires**

**Cutanés, ORL,  
fièvre,  
neuroinflammation**

...

# Conclusion

- En un an, progrès spectaculaires dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques potentiels du COVID long ont été.
- Encore difficile de déterminer ce qui relève de la persistance d'une infection non résolue de séquelles inflammatoires d'une infection initiale.
- Les conséquences sont une dérégulation immunitaire à la fois innée et adaptative aux conséquences multiples.
- De nombreuses questions restent non résolues : quels sont les déterminants génétiques ou autre de ce statu de COVID long, quels sont les liens entre ces mécanismes, quels sont les potentiels réservoirs viraux, y a t-il une toxicité directe de la Spike
- Ces recherches offrent de nombreuses perspectives
  - identifier des bio marqueurs qui devraient permettre de mieux classer les patients et d'évaluer des approches thérapeutiques : cytokines pro inflammatoires, marqueurs de dégâts endothéliaux et d'un état pro-coagulant, d'un catabolisme des lipides, présence de protéine Spike
  - Évaluer des approches thérapeutiques basées sur l'inhibition de ces mécanismes