



**HAL**  
open science

# COVID-19, inflammation et endothéliopathie chez les patients en réanimation

Pierre Gauthier

► **To cite this version:**

Pierre Gauthier. COVID-19, inflammation et endothéliopathie chez les patients en réanimation. Médecine humaine et pathologie. 2021. dumas-03256849

**HAL Id: dumas-03256849**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03256849>**

Submitted on 10 Jun 2021

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITE DE PICARDIE JULES VERNE FACULTE DE MEDECINE  
D'AMIENS

Année 2021

N°2021-36

**COVID-19, INFLAMMATION ET  
ENDOTHELIOPATHIE CHEZ LES  
PATIENTS DE REANIMATION**

THESE POUR LE DOCTORAT EN MEDECINE (DIPLOME D'ETAT)  
ANESTHESIE-REANIMATION  
PRESENTEE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT

LE MARDI 11 MAI 2021 PAR

**PIERRE GAUTHIER**

PRESIDENT DU JURY : Monsieur le Professeur Hervé DUPONT

MEMBRES DU JURY : Monsieur le Professeur Vincent JOUNIEAUX

Monsieur le Professeur Yazine MAHJOUB

Monsieur le Docteur Pierre HUETTE

DIRECTEUR DE THESE : Monsieur le Docteur Osama ABOU ARAB



UNIVERSITE DE PICARDIE JULES VERNE FACULTE DE MEDECINE  
D'AMIENS

Année 2021

N°2021-36

**COVID-19, INFLAMMATION ET  
ENDOTHELIOPATHIE CHEZ LES  
PATIENTS DE REANIMATION**

THESE POUR LE DOCTORAT EN MEDECINE (DIPLOME D'ETAT)  
ANESTHESIE-REANIMATION  
PRESENTEE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT

LE MARDI 11 MAI 2021 PAR

**PIERRE GAUTHIER**

PRESIDENT DU JURY : Monsieur le Professeur Hervé DUPONT

MEMBRES DU JURY : Monsieur le Professeur Vincent JOUNIEAUX

Monsieur le Professeur Yazine MAHJOUR

Monsieur le Docteur Pierre HUETTE

DIRECTEUR DE THESE : Monsieur le Docteur Osama ABOU ARAB



A mon Maître et président de jury

**Monsieur le Professeur Hervé DUPONT**

Professeur des Universités-Praticien Hospitalier  
(Anesthésie-Réanimation)  
Chef de service d'Anesthésie  
Chef du service de Réanimation Polyvalente  
Chef du Pôle « Anesthésie-Réanimations »

Vous me faites l'honneur de présider cette thèse et je vous en remercie sincèrement.  
Je vous suis particulièrement reconnaissant de l'accueil que vous m'avez réservé dans cette spécialité après quelques mois d'égarement en début de parcours.  
Soyez assuré de mon profond respect.

A mon Maître,

**Monsieur le Professeur Vincent JOUNIEAUX,**

Professeur des Universités-Praticien Hospitalier (Pneumologie)  
Chef de Service de Pneumologie, Pôle « Cœur-Thorax-Vaisseaux »  
Responsable du Service de soins continus respiratoires  
Pôle « Anesthésie-Réanimations »

Vous me faites l'honneur de juger ce travail et je vous en remercie.  
Je suis convaincu que votre expertise dans ce domaine apportera un regard critique constructif à ce travail.

A mon Maître,

**Monsieur le Professeur Yazine MAHJOUB,**

Professeur des Universités-Praticien Hospitalier  
Anesthésiologie, réanimation, médecine d'urgence  
Responsable de l'unité de Réanimation Cardiaque, Thoracique, Vasculaire et Respiratoire  
Coordonnateur DESAR subdivision d'Amiens

Je vous remercie de l'honneur que vous me faites en acceptant d'être membre de ce jury.  
Votre savoir et votre humanité font de vous un enseignant exceptionnel.

A mon Maître,

**Monsieur le Docteur Pierre HUETTE,**

Praticien Hospitalier  
Anesthésie-Réanimation  
Service de Réanimation CTVR

Tu as accepté de siéger dans ce jury de thèse et je t'en remercie sincèrement.  
Ta patience et ta pédagogie toujours associées à une exigence d'excellence m'ont fait découvrir et grandir en réanimation et resteront pour moi un modèle.  
J'espère avoir l'occasion de travailler de nouveau avec toi.  
Sois assuré de ma profonde gratitude.

A mon Maître et Directeur de Thèse,

**Monsieur le Docteur Osama ABOU ARAB,**

Praticien hospitalier  
Anesthésie-Réanimation  
Unité de Réanimation Cardiaque, Thoracique, Vasculaire et Respiratoire

Tu m'as choisi pour ce travail alors que je faisais mes premiers pas dans cette spécialité et je t'en suis sincèrement reconnaissant.

Cette confiance que tu m'accordes m'est très précieuse et me porte tout au long de mon parcours.

J'espère en être digne.

Merci pour ta rigueur et ton exigence qui me poussent à donner le meilleur de moi-même.

Sois assuré de mon profond respect.

Aux équipes médicales et paramédicales du bloc et de la réanimation de Compiègne, du bloc de Saint Quentin et de la réanimation CTVR d'Amiens, un grand merci pour votre bonne humeur et vos conseils avisés, précieux en début de parcours.

Aux chefs de réanimation CTVR, Guillaume, Christophe, Pierre-Alexandre, Mathieu, Patricia, Mickaël, votre rigueur et votre exigence associées à beaucoup de confiance et de bienveillance ont été extrêmement formateurs pour moi. Je vous en suis très reconnaissant.

A mes co-internes du semestre d'hiver 2020, Fatim, Christophe, Thomas, Alexandre et Benjamin, très bons souvenirs en votre compagnie pendant ces 7 mois si particuliers. Hâte de vous recroiser au bloc !

A mes co-internes d'anesthésie, Paul, Thomas, Tristan, Hélène, Azrat, Fanny, Solène, Cécilia, Rima, Chloé : belle team franchement !

A Paul, Théophile, Thibaud, Édouard et Augustin, des Gets à l'île d'Oléron en passant par Avignon et surtout Lille, à ces bons moments passés et à ceux à venir.

A Henri, des marteaux au stétho, je suis convaincu qu'on a fait le bon choix. Vivement l'intégrale gamme à batterie Métabo quand même !

A Paul, Maxime, je suis hyper content de vous avoir rencontré. Ça promet la petite coloc' !

A Louis, le premier semestre de P2 restera un des moments les plus insoucians de ma vie et paradoxalement celui avec le moins de souvenirs... Nous y avons construit une profonde amitié qui ne fait que débiter, j'en suis sûr.

A Corinne et Jean-Claude, votre soutien si bienveillant et chaleureux tout au long de ces années d'études fût pour moi irremplaçable. Je vous en remercie sincèrement.

A mes 4 grands-parents, votre simplicité et profonde gentillesse ont contribué à faire de moi ce que je suis. J'espère vous rendre fiers.

A Philippe, Georges, Maxime, j'aurais aimé que vous puissiez lire ce travail. Vous resterez pour moi une grande source d'inspiration et d'admiration.

A l'ensemble de la famille, oncles et tantes, cousin et cousines. Vous êtes une de mes plus grandes forces.

A Marie, malgré la distance, tu sais te rendre présente pour me conseiller, m'accompagner et toujours trouver les mots justes. Je t'en remercie sincèrement.

A Nanick et Jean-Luc, votre parcours médical est un exemple et me guide depuis mon plus jeune âge. Je n'aurais pourtant pas pensé m'en rapprocher autant, mais c'est finalement pour moi une fierté. Soyez assurés de ma profonde gratitude.

A Viviane, Jacques, Emmanuel, Matthieu, Hélène, notre petite enclave familiale lilloise a été d'un soutien si précieux et réconfortant pour moi pendant ces longues études. Je vous en suis très reconnaissant. Mention spéciale à ma petite Angèle, hâte de te voir grandir.

A Jeanne, je te connais par cœur mais il me semble que l'inverse est également vrai. Ta bienveillance et ton sourire te caractérisent. Ne change jamais.

A Alice, tout en restant très discrète, sans rien attendre en retour, tu m'as toujours guidée et ouvert des portes en me laissant toujours croire que je ne le devais qu'à moi-même. En réalité je te dois beaucoup. Je t'en remercie infiniment.

A Pauline, comme dirait Jean le Cam, « à trop en dire, on fait rire, à trop en faire, on fait taire ». Tu sais ce que je ressens, tu sais ce que je te dois. Tu m'es si précieuse. Notre chemin ne fait que commencer. Nous avons tant de projets et tant de rêves à accomplir. Les plus grands moments restent à venir.

Et à mes parents, pour votre soutien constant, indéfectible et sans faille, si important dans les moments agréables comme dans les plus durs. J'espère que vous êtes fiers de moi. Je le suis de vous.

## Liste des abréviations

- Ang-1 : Angiopoïétine 1
- Ang-2 : Angiopoïétine 2
- Covid-19 : Maladie à coronavirus 2019
- ECMO : Membrane d'oxygénation extra-corporelle
- EDTA : Acide éthylène diamine tétra-acétique
- ELISA : Technique de dosage d'immunoabsorption par enzyme liée
- EER : Épuration extra-rénale
- EP : Embolie pulmonaire
- FR : Fréquence respiratoire
- IL-6 : Interleukine 6
- MERS-CoV : Coronavirus lié au syndrome respiratoire du Moyen-Orient
- NAD : Noradrénaline (vasopresseur)
- OAP : Œdème aigu pulmonaire
- OMS : Organisation Mondiale de la Santé
- PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> : Rapport d'oxygénation entre la pression partielle artérielle en oxygène et la fraction inspirée en oxygène
- SARS-CoV : Coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère
- SARS-CoV 2 : Coronavirus de type 2 du syndrome respiratoire aigu sévère
- SOFA : Score d'évaluation séquentielle des défaillances d'organes
- SDRA : Syndrome de détresse respiratoire aigue
- SRC : Syndrome de relargage cytokinique
- SpO<sub>2</sub> : Saturation pulsée en oxygène
- TNF- $\alpha$  : Facteur de nécrose tumorale alpha
- TVP : Thrombose veineuse profonde
- VEGF : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
- VM : Ventilation mécanique

## Table des matières

Liste des abréviations .....	11
<b>I. INTRODUCTION.....</b>	<b>13</b>
A. Les Coronavirus.....	13
B. Epidémiologie du SARS-CoV-2.....	13
C. Inflammation et cytokines .....	14
D. Atteinte endothéliale et angiopoïétines .....	15
E. Lien entre l'inflammation, les lésions endothéliales et la COVID-19.....	16
<b>II. MATERIEL ET METHODE.....</b>	<b>17</b>
A. Ethique et méthodologie de l'étude.....	17
B. Définition de la sévérité des patients .....	17
C. Recueil des données et des complications .....	18
D. Dosage des cytokines et angiopoïétines.....	18
E. Analyses statistiques .....	19
<b>III. RESULTATS.....</b>	<b>19</b>
A. Caractéristiques démographiques, cliniques et biologiques .....	19
B. Comparaison entre les cytokines, les angiopoïétines et la survenue de complications chez les patients sévères et critiques.....	21
C. Corrélation entre les cytokines, les angiopoïétines et association avec les complications .....	22
<b>IV. DISCUSSION .....</b>	<b>30</b>
<b>V. CONCLUSION .....</b>	<b>33</b>
<b>VI. BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>34</b>
<b>VII. ABSTRACT.....</b>	<b>38</b>
<b>VIII. RESUME: .....</b>	<b>39</b>

# **I. INTRODUCTION**

## **A. Les Coronavirus**

Les Coronavirus sont des virus à ARN, appartenant à la famille des Coronavirus et à l'ordre des Nidovirus. Découverts en 1930 chez les volailles, le premier coronavirus humain a été identifié en 1965 par David Tyrrell et Malcolm Bynoe (Salisbury, Angleterre). Il s'agit des plus grands virus à ARN actuellement connus avec entre 27 000 et 32 000 paires de base (1).

Connus pour infecter principalement les volatiles et les animaux domestiques, ils peuvent également depuis peu se transmettre à l'homme. Nous connaissons 6 types de coronavirus humains, classés en 2 catégories : les modérément pathogènes, responsables d'infections respiratoires hautes, saisonnières et relativement bénignes, et les hautement pathogènes, groupe comprenant notamment le Sars-CoV découvert en 2004 et le MERS-CoV responsable d'une épidémie en 2013, atteignant les voies aériennes inférieures et causant notamment des pneumonies sévères (2).

## **B. Épidémiologie du Sars-CoV-2**

En décembre 2019, un septième coronavirus humain a été découvert : le Sars-CoV-2, responsable de la maladie à Coronavirus 2019 (Covid-19). Apparu à Wuhan en Chine, il s'est rapidement propagé jusqu'à devenir une pandémie mondiale historique conduisant à une crise sanitaire majeure. La France dénombre à ce jour 450 000 hospitalisations sur les 5,3 millions de contaminations depuis mars 2020, réalisant un taux d'admission hospitalière proche de 1 patient sur 10.

Hautement pathogène, il affecte en effet principalement le système respiratoire, bien que d'autres systèmes organiques soient également impliqués (3), et réalise des tableaux de Syndrome de Détresse Respiratoire Aiguë (SDRA) chez 20 % des patients contaminés.

Parmi les patients hospitalisés atteints de Covid-19, 17% nécessiteront une hospitalisation en réanimation devant l'apparition d'une défaillance multi-viscérale ou pour une détresse respiratoire aiguë nécessitant la mise en place d'une assistance respiratoire invasive (4).

Une cohorte prospective française récente a initialement évalué à 31% la mortalité en réanimation, abaissant par la suite ce chiffre à 25%, ce qui explique le nombre de décès en

France induits par le Sars-CoV-2 estimé à plus de 100 000 en avril 2021 dont 75 000 en secteur hospitalier (5).

### **C. Inflammation et cytokines**

Après s'être introduit dans l'organisme par les voies aériennes supérieures, le Sars-CoV-2 infecte les cellules hôtes par l'intermédiaire d'une de ses 4 protéines structurales, la protéine S (Spike), qui présente une grande affinité pour les récepteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 (ACE 2) (6). Leur présence particulièrement élevée au niveau du système cardio-respiratoire explique le tropisme respiratoire du virus.

Les cellules sentinelles de l'immunité innée présentes au niveau de l'épithélium pulmonaire sécrètent en réponse des cytokines pro-inflammatoires, permettant l'activation secondaire de l'immunité adaptative. Il en résulte ainsi une synthèse d'anticorps par les lymphocytes B permettant la formation de complexes anticorps-virus, un recrutement des lymphocytes T CD4 + et CD8 + cytotoxiques, et l'induction d'une apoptose des cellules infectées associée à la phagocytose des motifs protéiques viraux. Cela constitue la première ligne de défense contre le Sars-CoV-2, commune aux autres infections virales (7).

La Covid-19 présente toutefois des mécanismes physiopathologiques différents responsables de sa potentielle sévérité.

Plusieurs études ont en effet démontré chez les patients graves un pic d'Interféron gamma (IFN gamma) retardé par rapport à la phase active de réplication virale, pouvant potentiellement participer à une majoration de la charge virale.

Par ailleurs, le syndrome de relargage de cytokinique (SRC) a été largement décrit comme un mécanisme impliqué dans la gravité et les complications de la maladie (8).

En effet, la sécrétion massive de cytokines pro-inflammatoires dont l'IL-6 et le TNF- $\alpha$  induit une inflammation locale prolongée et auto-entretient ainsi l'activation et le recrutement des cellules immunitaires, boucle semblant essentielle à la physiopathologie du SRC. Il en résulte des lésions de l'épithélium et de l'endothélium pulmonaire, porte ouverte à la formation d'un œdème pulmonaire riche en cellules inflammatoires (9).

C'est la raison pour laquelle l'IL-6 a particulièrement été identifiée comme étant un bon biomarqueur de la progression et du pronostic de la Covid-19 (10).

Par conséquent, de grands essais cliniques évaluant l'antagoniste de l'IL-6 sont menés, bien que d'autres investigations contrastent avec les résultats initiaux sur le rôle de l'IL-6 et

révèlent que les taux de cytokines sont comparables à ceux retrouvés dans les infections respiratoires non Covid-19 (11).

En 2001, Hussel et al montraient également l'efficacité des antagonistes au TNF- $\alpha$  dans le traitement des pneumonies virales non Covid-19 secondaires au virus respiratoire syncytial ou au virus de la grippe (12). Ces mêmes traitements sont également devenus la pierre angulaire du traitement des maladies inflammatoires chroniques telles que la polyarthrite rhumatoïde ou les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, dont l'élément essentiel de leur physiopathologie est l'existence d'un SRC (13).

C'est la raison pour laquelle Feldamn et al ont prôné très précocement la réalisation d'études pour évaluer l'efficacité des anti-TNF dans le cadre des SDRA induits par le Sars-CoV 2 (14) (15).

#### ***D. Atteinte endothéliale et angiopoïétines***

Les SDRA induits par la Covid-19 présentent par certains aspects de nombreuses « atypies ». En effet, bien que réalisant des tableaux associant une hypoxémie sévère avec une atteinte radiologique bilatérale et sans cause cardiaque retrouvée, le délai de survenue d'une forme grave à partir de l'apparition des premiers symptômes se rapproche davantage de 8 à 12 jours que des moins de 7 jours théoriques des critères de Berlin.

Par ailleurs, il existe parfois un contraste saisissant entre la sévérité de l'atteinte radiologique et des manifestations cliniques demeurant modérées, tout cela dans un contexte d'hypoxémie profonde et de compliances respiratoires conservées.

Cette « hypoxémie heureuse » a été rapportée dans la littérature pour décrire ces patients bien portants malgré une hypoxémie profonde. Plusieurs hypothèses ont été émises. Parmi elles, l'atteinte endothéliale pulmonaire est suggérée pour expliquer les shunts vasculaires pulmonaires de type droit-gauche, les manifestations extra-pulmonaires et autres thromboses survenant au cours de la Covid-19 (16)(17)(18).

Une série d'autopsies comparant les poumons de malades décédés de la grippe H1N1 et ceux de malades décédés de la Covid-19 retrouvait ainsi 9 fois plus de micro-thromboses capillaires dans les poumons infectés par le Sars-CoV-2 et presque 3 fois plus de néo-vascularisation. L'analyse histochimique d'autres séries a également permis de prouver l'apoptose des cellules endothéliales et la présence intracellulaire du Sars-CoV-2 (19)(20).

En outre, les taux plasmatiques de marqueurs de la fonction endothéliale apparaissent significativement plus prononcés chez les patients gravement atteints par la Covid-19 (21).

Ainsi, plusieurs approches physiopathologiques de la progression de la Covid-19 ont été proposées pour relier l'infection virale, l'inflammation et les lésions endothéliales (22)(23). Récemment, Smajda et al ont montré une bonne performance diagnostique de l'angiopoïétine plasmatique 2 (Ang-2) pour prédire l'admission en unité de soins intensifs (USI) (24).

Les angiopoïétines 1 et 2 appartiennent en effet à la famille des facteurs de croissance endothéliaux, connus pour réguler le processus d'angiogenèse tout au long de la vie, notamment par l'intermédiaire de leur récepteur clé TIE2. L'Ang 1, sécrétée par les péricytes de la paroi vasculaire, agit comme un agoniste de ce récepteur et exerce ainsi un effet protecteur sur l'endothélium.

Au contraire, l'Ang-2, stockée dans les cellules endothéliales et libérée dans des conditions de stress de l'organisme, notamment au cours de processus inflammatoires, bloque l'effet stabilisateur de l'Ang-1 sur le système vasculaire par phosphorylation du récepteur TIE2. Cela augmente la perméabilité vasculaire et conduit à des fuites capillaires, provoquant la constitution d'un œdème alvéolaire riche en cellules et en médiateurs pro-inflammatoires.

Le rapport Ang2/Ang1 apparaît donc comme un bon indicateur du degré d'agression endothéliale dans la maladie Covid-19 (25).

#### ***E. Lien entre l'inflammation, les lésions endothéliales et la COVID-19***

En réanimation, une corrélation a été mise en évidence entre le taux plasmatique d'Ang-2 et les cytokines inflammatoires circulantes (26)(27)(28), et entre l'Ang-2 ou le rapport Ang-2 / Ang-1 à l'admission et la gravité et la mortalité des patients non-Covid-19 présentant un sepsis (29) ou un SDRA (30).

Toutefois, on ne sait pas si les angiopoïétines sont associées à la gravité à l'admission en réanimation et peuvent prédire la survenue de complications au cours de la Covid-19.

L'objectif principal de cette étude était donc de comparer le niveau plasmatique des principales cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$  et IL-6) et des angiopoïétines (Ang-1 et Ang-2) par rapport à la sévérité des patients Covid-19 admis en réanimation et d'évaluer leur association avec les éventuelles complications au cours du séjour.

L'objectif secondaire était de déterminer un niveau plasmatique seuil de TNF- $\alpha$ , d'IL-6 et d'Ang-2 qui pourrait significativement prédire la survenue de complications.

## II. MATERIEL ET METHODE

### A. Éthique et méthodologie de l'étude

Conformément à loi française sur la recherche clinique, notre étude a été classée hors loi Jardé. Elle a ainsi fait l'objet de la seule déclaration à la CNIL selon une procédure MR004 numéro d'enregistrement (PI2020\_843\_0026) ainsi que d'un enregistrement sur ClinicalTrial.gov (identifiant: NCT04354558) (31). Cette étude a été menée en respectant la version modifiée de la Déclaration d'Helsinki.

Des informations orales et écrites ont été fournies au patient et / ou à ses proches.

Nous avons mené une étude de cohorte prospective monocentrique en réanimation cardiaque thoracique vasculaire et respiratoire au CHU d'Amiens, en France.

### Population d'étude

La population d'étude était les patients adultes admis en réanimation du 27 février 2020 au 21 avril 2020, avec un test RT-PCR positif au Sars-Cov-2 sur écouvillons nasaux ou pharyngés de moins de 72 heures.

Les critères d'exclusion étaient l'âge < 18 ans, les femmes enceintes, les patients greffés ou immunodéprimés, la prise d'une corticothérapie au long cours, une infection nosocomiale au Sars-CoV-2, une forme extra-pulmonaire de la Covid-19 et les patients sous tutelle ou curatelle.

### B. Définition de la sévérité des patients

Nous avons utilisé la définition de cas de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) (32) pour définir la sévérité des patients selon deux groupes :

Un patient était défini comme sévère (groupe sévère) lorsqu'il présentait une détresse respiratoire avec une fréquence respiratoire  $\geq 30$  cycles/ min, une saturation pulsée en

oxygène ( $SpO_2$ )  $\leq 93\%$  au repos, un rapport d'oxygénation  $PaO_2/FiO_2 \leq 300$  mm Hg, ou encore une progression radiologique des lésions de plus à 50% en 24 à 48 heures.

Un patient était défini comme critique (groupe critique) lorsqu'il présentait une insuffisance respiratoire aiguë nécessitant la mise sous ventilation mécanique ou un état de choc ou une défaillance d'organe nécessitant des soins en réanimation.

### **C. Recueil des données et des complications**

Les caractéristiques des patients, les investigations biologiques à l'admission en réanimation et l'évaluation séquentielle des défaillances d'organes (score SOFA) ont été recueillies de manière prospective.

Les critères pronostiques suivants ont été recueillis durant le séjour en réanimation : recours à l'épuration extra-rénale (EER), durée de la ventilation mécanique (VM), besoin d'oxygénation par membrane extracorporelle (ECMO), recours à la noradrénaline (vasopresseur), survenue de thrombose veineuse profonde et / ou d'embolie pulmonaire (TVP / EP) confirmée par une angio-tomodensitométrie, la durée de séjour en réanimation, la durée d'hospitalisation et la mortalité en réanimation.

### **D. Dosage des cytokines et angiopoïétines**

Des échantillons de sang de patients ont été prélevés à l'admission en réanimation dans des tubes contenant de l'EDTA et centrifugés dans les 30 minutes suivant le prélèvement pendant 10 minutes à  $1000 \times g$ . Des échantillons de plasma ont ainsi été collectés et conservés à  $-80^\circ C$  jusqu'à leur utilisation.

Le dosage des cytokines a été réalisé dans des échantillons de plasma dilués au double à l'aide de la technologie ELISA microfluidic ProteinSimple® (San Jose, Californie, États-Unis), conformément aux instructions du fabricant. La sensibilité du test est de 1,14 pg / ml pour le TNF- $\alpha$  et de 0,41 pg / ml pour l'IL-6. Les coefficients de variation inter-essai et intra-essai pour le TNF- $\alpha$  et l'IL-6 sont tous  $<9\%$ .

Le dosage d'Ang-1 et d'Ang-2 a lui été réalisé dans des échantillons de plasma dilués 5 fois en utilisant des kits ELISA disponibles dans le commerce, selon les instructions du fabricant (ELH-Angiopoietin1 et ELH-Angiopoietin2, RayBio-tech, Norcross, GA, USA). La

sensibilité du test est de 30 pg / ml pour l'Ang-1 et de 10 pg / ml pour l'Ang-2. Les coefficients de variation inter-essai et intra-essai pour Ang-1 et Ang-2 sont tous <12%.

### ***E. Analyses statistiques***

Les données ont été exprimées en médiane [intervalle interquartile] ou en nombres (pourcentage), selon la variable étudiée.

Des comparaisons entre les groupes ont été effectuées en utilisant un test de Wilcoxon-Mann-Whitney, un test chi-2 ou un test exact de Fischer, selon le cas. Les corrélations de l'Ang-2 et de l'Ang-2 / Ang-1 après transformation logarithmique avec le TNF- $\alpha$  et l'IL-6 ont été évaluées à l'aide du test de corrélation de Pearson. Un modèle de régression logistique a été utilisé pour analyser les facteurs associés à la gravité de la Covid-19. La relation entre les biomarqueurs et l'utilisation des vasopresseurs, le recours à l'EER et le décès en USI a été modélisée dans une régression logistique. Nous avons construit des courbes Sensibilité/Spécificité (ROC) pour évaluer la valeur du TNF- $\alpha$ , IL-6, Ang-2 et du rapport Ang-2 / Ang 1 qui était associée à l'état critique à l'admission en réanimation et prédictive de la survenue de complications. Pour chaque biomarqueur, le seuil a été déterminé en fonction de l'indice de Youden, et les valeurs de sensibilité et de spécificité correspondantes ont été précisées. Tous les tests statistiques étaient bilatéraux et le seuil de signification statistique était fixé à  $P < 0,05$ . Les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel SPSS (version 24.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Les figures ont été dessinées en utilisant le logiciel Graph Pad Prism (version 7.0, Grappa Software Inc., San Diego, CA, USA).

## **III. RESULTATS**

### ***A. Caractéristiques démographiques, cliniques et biologiques***

Du 27 février 2020 au 21 avril 2020, 65 patients ont finalement été inclus. Les caractéristiques des patients à l'admission sont présentées dans le tableau 1. Dix-sept patients (26%) étaient considérés comme sévères et 48 patients (74%) dans un état critique. L'âge, l'indice de masse corporelle, le sexe et les comorbidités étaient similaires entre les 2 groupes. Les dosages biologiques à l'admission ont montré un niveau de protéine C-réactive (CRP) significativement plus élevé dans le groupe critique par rapport au groupe sévère

(respectivement, 145 [94-234] vs 71 [51-137] mg/l ;  $P = 0,013$ ). Les deux groupes présentaient également une lymphopénie, sans différence significative.

**Tableau 1 :** Caractéristiques démographiques, cliniques et biologiques des patients Covid-19 selon leur niveau de sévérité

**IMC :** Indice de masse corporelle ; **BPCO :** broncho-pneumopathie chronique obstructive ; **SOFA :** score d'évaluation séquentielle des défaillances d'organes **CRP :** Protéine C-réactive

Variables	Population globale (n=65)	Groupe Sévère (n=17)	Groupe Critique (n=48)	P value
Age (années)	63 [56-69]	61 [50-70]	64 [58-69]	0.207
Sexe masculin (n; %)	45 (70)	11 (65)	34 (71)	0.638
IMC (kg m <sup>-2</sup> )	29.7 [26.8-33.5]	28.5 [26.7-34.5]	29.9 [27.0-33.1]	0.726
<i>Comorbidités (n; %)</i>				
Hypertension	34 (52)	9 (53)	25 (52)	0.951
Dyslipidémie	19 (29)	6 (35)	13 (27)	0.547
Obésité sévère	12 (19)	3 (18)	9 (19)	1.000
Tabagisme	7 (11)	1 (6)	6 (13)	0.664
Diabète	17 (26)	3 (18)	14 (29)	0.523
Cardiopathie ischémique	7 (11)	0 (0)	7 (15)	0.176
BPCO	3 (5)	0 (3)	3 (6)	0.559
Leucocytes (mm <sup>-3</sup> )	6800 [4700-8900]	7650 [5350-9390]	7300 [5200-9870]	0.874
Lymphocyte (mm <sup>-3</sup> )	700 [600-1200]	710 [600-1100]	700 [598-1107]	0.409
CRP (mg l <sup>-1</sup> )	109 [58-241]	71 [51-137]	145 [94-234]	<b>0.013</b>
Creatinine (μmol l <sup>-1</sup> )	70 [51-175]	68 [52-77]	85 [61-183]	0.085
D-dimers (ng/ml)	1110 [770-2100]	1065 [790-5915]	1550 [770-5060]	0.702
PaCO <sub>2</sub> (mmHg)	34 [32-40]	37 [34-39]	38 [33-44]	0.410
PaO <sub>2</sub> (mmHg)	76 [69-97]	90 [75-119]	80 [69-103]	0.528
Lactates (mmol l <sup>-1</sup> )	1.7 [1.3-2.4]	1.8 [1.2-2.4]	1.8 [1.6-2.2]	1.000
Score SOFA	5 [2-9]	2 [1-4]	7 [4-12]	<b>&lt;0.0001</b>

**B. Comparaison entre les cytokines, les angiopoïétines et la survenue de complications chez les patients sévères et critiques**

Les concentrations plasmatiques des cytokines et des angiopoïétines sont rapportées dans le tableau 2.

À l'admission en réanimation, les concentrations de TNF- $\alpha$  et l'IL-6 étaient significativement plus élevées dans le groupe critique que dans le groupe sévère (pour le TNF- $\alpha$  respectivement 16,5 [15,6 -19,8] vs 26,7 [16,7-35,5] pg.ml<sup>-1</sup> ;  $P = 0,006$  et pour l'IL-6 respectivement 36,4 [27,2-112,0] vs 88,9 [42,1-293,0] pg.ml<sup>-1</sup> ;  $P = 0,038$ ).

L'Ang 1 ne différait pas significativement entre les groupes tandis que l'Ang-2 et le rapport Ang-2 / Ang-1 étaient significativement plus élevés dans le groupe critique (pour l'Ang -2 respectivement 3015 [2054-3473] vs 4484 [2408-7169] pg.ml<sup>-1</sup> ;  $P = 0,025$  et pour Ang-2 / Ang-1 respectivement 0,22 [0,18-0,57] vs 0,57 [0,29-1,14] ;  $P = 0,028$ ).

Les complications sont également rapportées dans le tableau 2.

Dix-neuf patients (29,2%), tous appartenant au groupe critique, ont nécessité l'utilisation de vasopresseurs et un recours à l'EER.

Cinq patients (7,7%), tous appartenant au groupe critique, ont également développé une thrombose veineuse profonde et / ou une embolie pulmonaire.

Les séjours en réanimation et à l'hôpital étaient significativement plus longs dans le groupe critique.

Le taux de mortalité global en réanimation dans la cohorte était de 18% (12 patients) avec respectivement 6% (1 patient) pour le groupe sévère et 23% (11 patients) pour le groupe critique.

**Tableau 2 :** dosage plasmatique des cytokines, angiopoïétines et survenue de complications en réanimation chez les patients sévères et critiques.

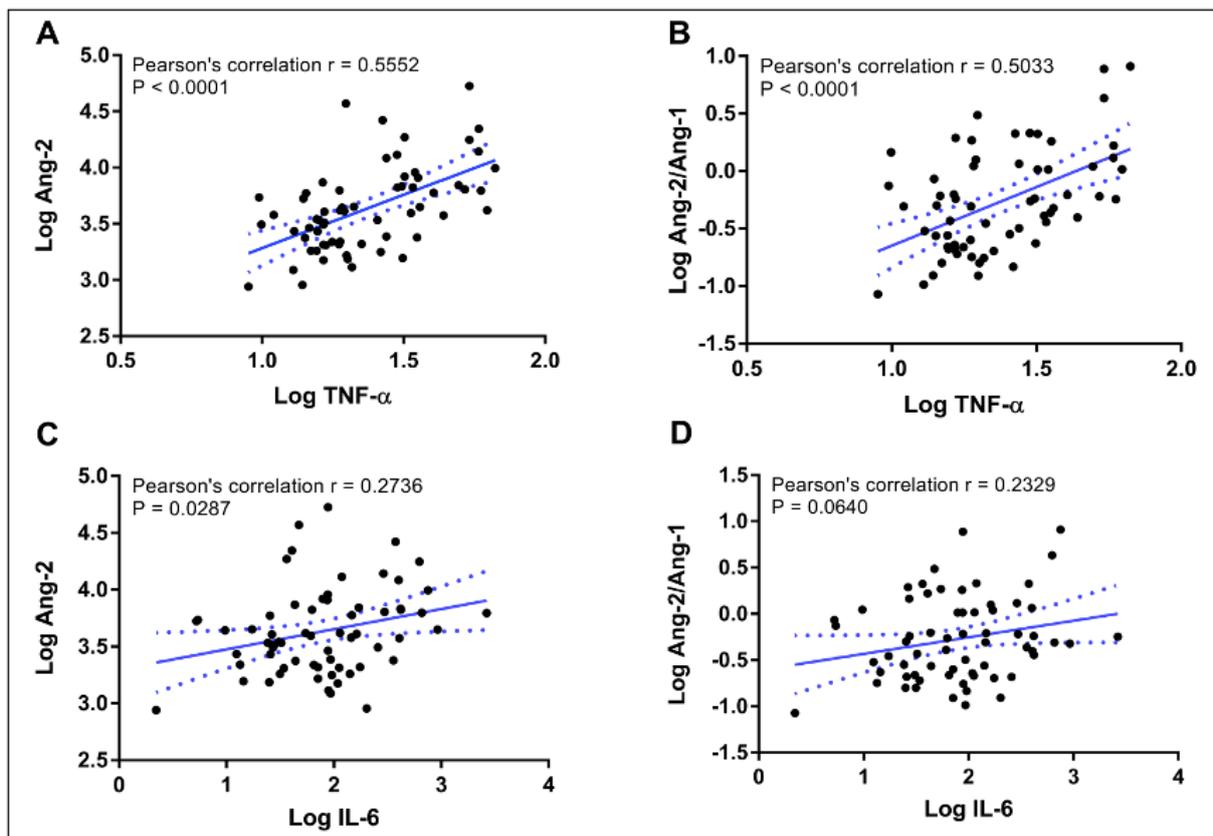
Variables	Population globale (n=65)	Groupe sévère (n=17)	Groupe critique (n=48)	P value
<b>Cytokines (pg ml<sup>-1</sup>)</b>				
TNF- $\alpha$	20.0 [16.2-33.9]	16.5 [15.6-19.8]	26.7 [16.7-35.5]	<b>0.006</b>
IL-6	87.3 [31.1-173.0]	36.4 [27.2-112.0]	88.9 [42.1-293.0]	<b>0.038</b>
<b>Angiopoïétines (pg.ml<sup>-1</sup>)</b>				
Ang 1	9408 [6583-11783]	9642 [7650-12243]	9018 [6461-11598]	0.221
Ang 2	3992 [2188-6731]	3015 [2054-3473]	4484 [2408-7169]	<b>0.025</b>
Ang2/Ang1	0.49 [0.23-1.11]	0.22 [0.18-0.57]	0.57 [0.29-1.14]	<b>0.028</b>
Durée de VM (jours)	NA	NA	22 [16-32]	NA
Réanimation (jours)	18 [8-31]	5 [3-7]	25 [14-34]	<b>&lt;0.0001</b>
Hôpital (jours)	27 [14-38]	14 [11-21]	32 [18-43]	<b>&lt;0.0001</b>
EER (n; %)	19 (29)	0 (0)	19 (40)	<b>0.001</b>
NAD (n; %)	19 (29)	0 (0)	19 (40)	<b>0.003</b>
ECMO (n; %)	4 (6)	0 (0)	4 (8)	<b>0.03</b>
TVP et/ou EP	5 (8)	0 (0)	5 (10)	<b>0.023</b>
Sortis de réanimation (n)	53 (82)	17 (100)	36 (75)	<b>&lt;0.0001</b>
Sortis de l'hôpital	52 (80)	17 (100)	35 (73)	<b>&lt;0.0001</b>
Décès (%)	12 (18)	1 (6)	11 (23)	0.088

**C. Corrélation entre les cytokines, les angiopoïétines et association avec les complications**

Corrélation entre cytokines et angiopoïétines

Le niveau d'Ang-2 était positivement corrélé à l'IL-6 et au TNF- $\alpha$  ( $p = 0,029$  et  $p < 0,0001$ ) ;

Le rapport Ang-2 / Ang-1 était également corrélé au TNF- $\alpha$  ( $p < 0,0001$ ) (figure 1).



**Figure 1 :** Corrélations entre IL-6, TNF- $\alpha$ , Ang 2 et le ratio Ang 2/Ang 1 après transformation logarithmique.

Plots de corrélation après transformation logarithmique entre Ang-2 (A, C) and Ang-2/Ang-1 (B, D) vs. TNF- $\alpha$  et IL-6. La ligne continue indique la régression linéaire et les lignes en pointillés représentent l'intervalle de confiance à 95%.

#### Association entre cytokines, angiopoïétines et gravité des patients :

Dans l'analyse de régression logistique, seul le TNF- $\alpha$  (après transformation logarithmique) était indépendamment associé à l'état critique après ajustement sur la CRP et le score SOFA [odds ratio (OR) à 77,9 avec intervalle de confiance à 95% (IC95%) = 1,51-139,22 (Tableau 3)].

**Tableau 3** : Analyse en régression uni et multivariée des facteurs associés aux patients critiques.

<b>Variables</b>	<b>OR univarié (IC 95%)</b>	<b>P value</b>	<b>OR multivarié (IC 95%)</b>	<b>P value</b>
Log TNF- $\alpha$	95.4 (3.1 ; 2929)	<b>0.009</b>	77.9 (1.51-139.22)	<b>0.02</b>
Log IL-6	2.98 (1.03; 8.5)	<b>0.045</b>	-	
Log Ang 2	1.49 (1.17; 2.06)	<b>0.025</b>	-	
Log Ang 2 /Ang 1	1.12 (1.06 ; 1.16)	<b>0.031</b>		

Comparaison entre cytokines, angiopoïétines et survenue de complications :

Les patients ayant bénéficié d'une EER, d'un recours à un vasopresseur et / ou qui sont décédés pendant le séjour en réanimation avaient des taux plasmatiques de base de TNF- $\alpha$ , d'IL-6 et d'Ang-2 supérieurs à ceux qui n'ont pas présenté de complication, mais la différence était statistiquement significative pour l'ensemble de ces trois résultats uniquement pour le TNF- $\alpha$  (tableau 4).

**Tableau 4 :** Valeurs de l'IL-6, du TNF-  $\alpha$  et de l'Ang 2 selon le recours à l'EER, l'utilisation de vasopresseurs ou la survenue du décès en réanimation.

Les données sont présentées sous forme de médiane [interquartile]. Les données ont été comparées en utilisant un Test de Wilcoxon Mann Whitney.

<b>Variables</b>	<b>IL-6 (pg ml<sup>-1</sup>)</b>	<b>TNF- <math>\alpha</math> (pg ml<sup>-1</sup>)</b>	<b>Ang-2 (pg ml<sup>-1</sup>)</b>
<b>EER</b>			
Absente	71.0 [27.5-45.0]	18.8 [15.6-27.5]	3400 [2090-6247]
Présente	95.8 [52.1-324.0]	34.7 [23.2-51.8]	5980 [3578-9472]
P value	0.204	<b>0.001</b>	<b>0.046</b>
<b>Vasopresseur</b>			
Absent	71.0 [27.5-119]	18.7 [15.6-30.0]	3105 [2054-6267]
Présent	147.0 [74.0-405.0]	34.1 [27.1-46.7]	6247 [4154-8998]
P value	<b>0.038</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>0.013</b>
<b>Décès</b>			
Absent	78.7 [30.7-145.0]	19.2 [15.6-31.9]	3473 [2090-6388]
Présent	147.0 [48.9-389.0]	31.4 [26.2-42.1]	5980 [3949-7169]
P value	0.151	<b>0.025</b>	0.115

Association entre cytokines, angiopoïétines et survenue de complications :

Dans l'analyse de régression logistique univariée (tableau 5), après transformation logarithmique, le TNF- $\alpha$ , l'IL-6, l'Ang-2 et Ang-2 / Ang-1 étaient associés à l'utilisation de vasopresseurs (P <0,0001, P = 0,038, P = 0,013 et P = 0,041 respectivement). Le TNF- $\alpha$  et l'Ang-2 étaient associés à la nécessité d'une EER (P = 0,001, P = 0,046 respectivement) mais pas à l'IL-6 ni à Ang2 / Ang1. Le TNF- $\alpha$  était le seul marqueur plasmatique associé au décès en réanimation (P = 0,025).

Après ajustement pour tenir compte de la gravité clinique, le TNF- $\alpha$  restait un facteur indépendamment associé à l'utilisation de vasopresseurs (OR = 54,03, IC : 1,12-2611), au recours à l'EER (OR = 142,7 IC : 4,3-4716,1) et au décès en réanimation (OR = 22,5, IC : 1,1 - 440,6).

**Tableau 5 :** Facteurs associés à l'utilisation de vasopresseurs, au recours à l'EER et au décès pendant le séjour en réanimation ajustés sur la sévérité des patients.

	<b>OR univarié</b>	<b>P value</b>	<b>OR multivarié</b>	<b>P value</b>
<b>Facteurs associés à l'utilisation de vasopresseurs</b>				
SOFA	1.57 [1.15-2.15]	<b>&lt;0.0001</b>	-	-
Log TNF- $\alpha$	1.12 [1.1-14]	<b>&lt;0.0001</b>	54.03 [1.12-2611]	<b>0.044</b>
Log IL-6	1.06 [1.05-1.23]	<b>0.038</b>	-	-
Log Ang-2	1.18 [1.04-1.21]	<b>0.013</b>	1.00 [1.00-1.00]	0.754
Log Ang-2/Ang-1	1.1 [1.03-1.23]	<b>0.041</b>		
CRP	1.00 [0.99-1.01]	0.207	-	-
<b>Facteurs associés au recours à l'EER</b>				
SOFA	1.75 [1.2-2.75]	<b>0.043</b>	-	-
Log TNF- $\alpha$	1.86 [1.48-2.32]	<b>&lt;0.0001</b>	142.7 [4.3-4716.1]	<b>0.005</b>
Log IL-6	1.00 [0.99-1.01]	0.168	-	-
Log Ang-2	1.76 [1.52-1.82]	<b>0.044</b>	1.0 [0.1-6.2]	0.965
Log Ang-2/Ang-1	1.05 [0.98-1.03]	0.09		
CRP	1.77 [1.3-2.4]	<b>0.024</b>	-	-
<b>Facteurs associés au décès en réanimation</b>				
SOFA	1.2 [1.02-1.36]	<b>0.048</b>	-	-
Log TNF- $\alpha$	1.16 [1.14-1.23]	<b>0.025</b>	22.5 [1.15-440.1]	<b>0.04</b>
Log IL-6	2.18 [0.98-2.43]	0.151	-	-
Log Ang-2	1.07 [0.9-1.08]	0.115	-	-
Log Ang-2/Ang-1	1.0 [0.97-1.03]	0.173		
CRP	0.73 [0.118-1.87]	0.536	-	-

Niveau seuil d'association entre cytokines, angiopoïétines et la survenue de complications :

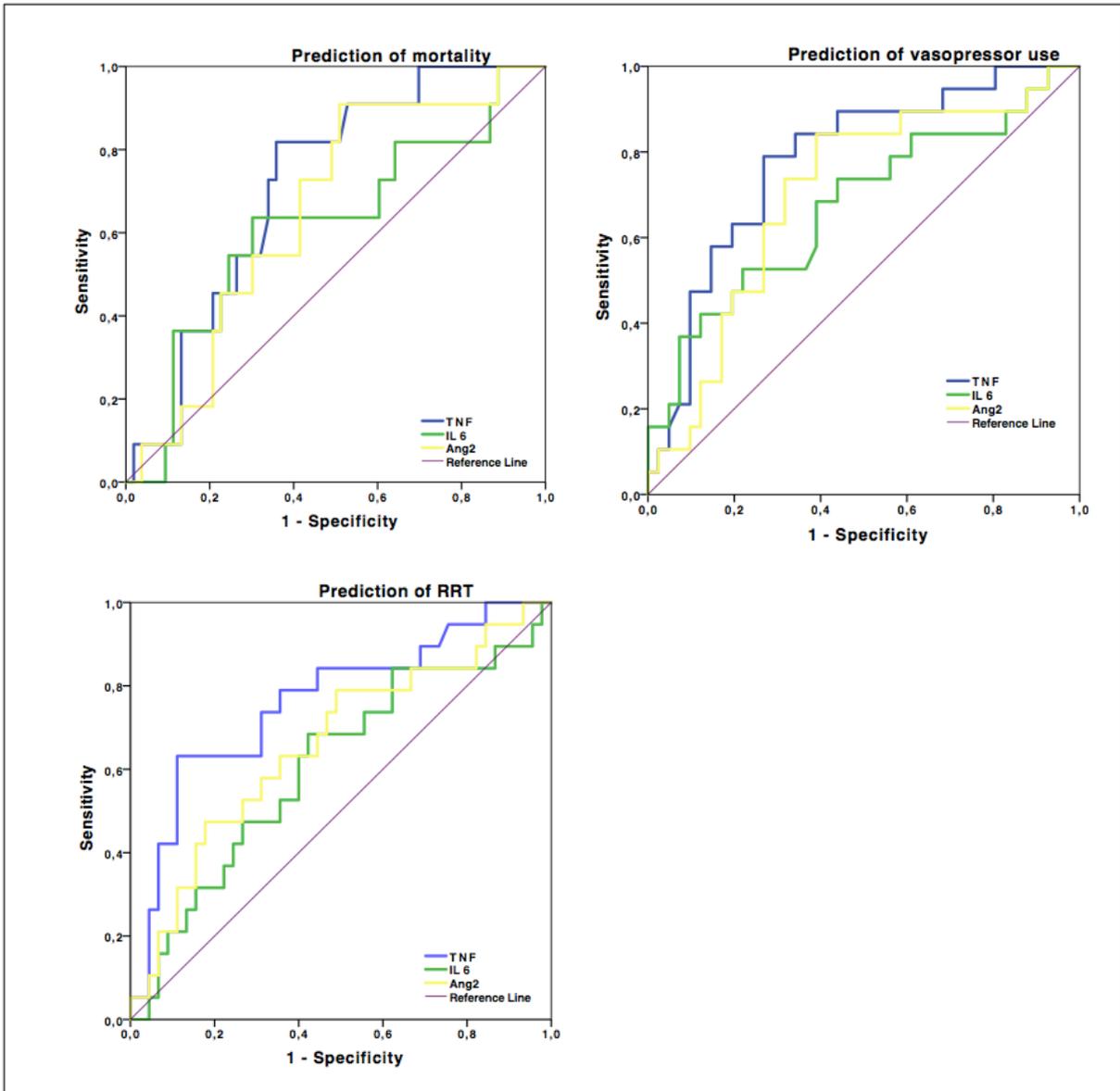
En utilisant les courbes ROC (Tableau 6 et Figure 2), les valeurs seuils plasmatiques optimales de TNF- $\alpha$ , d'Ang-2 et d'IL-6 capables de prédire de manière significative l'utilisation d'un vasopresseur étaient respectivement de 31,6 pg.ml<sup>-1</sup>, 6026 pg.ml<sup>-1</sup> et 89,2 pg.ml<sup>-1</sup>.

Les valeurs seuils plasmatiques optimales du TNF- $\alpha$  et de l'Ang-2 capables de prédire la nécessité d'une épuration extra-rénale étaient respectivement de 32,4 pg.ml<sup>-1</sup> et 4265,8 pg.ml<sup>-1</sup>.

Enfin, pour prédire le décès en réanimation, il fallait un dosage plasmatique de TNF- $\alpha$  au moins égal à 24 pg.ml<sup>-1</sup>.

**Tableau 6 :** Sensibilité (Se), Spécificité (Sp), Aire sous la courbe (AUC) et valeurs seuils pour le TNF- $\alpha$ , l'IL-6 et l'Ang 2 capables de prédire le recours à l'épuration extra-rénale, le recours aux vasopresseurs et la mortalité.

<b>Variable</b>	<b>AUC</b>	<b>P value</b>	<b>Se (%)</b>	<b>Sp(%)</b>	<b>Cut-off (pg ml<sup>-1</sup>)</b>
<b>Prédiction d'une épuration extra-rénale (EER)</b>					
TNF- $\alpha$	0.762	0.001	63	71	31.6
IL-6	0.607	0.179	63	60	88.3
Ang 2	0.658	0.046	63	62	4154
<b>Prédiction de l'utilisation de vasopresseurs</b>					
TNF- $\alpha$	0.780	0.001	79	66	31.7
IL-6	0.673	0.032	69	61	89.2
Ang 2	0.701	0.013	74	68	6026
<b>Prédiction de la mortalité</b>					
TNF- $\alpha$	0.715	0.026	81	64	25.1
IL-6	0.617	0.223	64	70	113.0
Ang 2	0.652	0.115	56	64	5949



**Figure 2 :** Courbes ROC du TNF- $\alpha$ , de l'IL-6 et de l'Angiopoïétine 2 (Ang 2) pour prédire le recours à l'épuration extra-rénale, le recours aux vasopresseurs et la mortalité.

#### IV. DISCUSSION

Dans cette étude, nous avons mis en évidence une association significative d'une part du syndrome de relargage cytokinique, représenté par des taux plasmatiques élevés d'IL-6 et TNF- $\alpha$ , et d'autre part des lésions endothéliales, objectivées par les niveaux élevés d'Ang-2, avec la gravité des patients Covid-19 admis en réanimation. Nous avons montré que ces taux d'IL-6 et de TNF- $\alpha$  étaient corrélés à ceux de l'Ang-2, particulièrement entre le TNF- $\alpha$  et l'Ang-2. Enfin, nous avons pu objectiver que le taux plasmatique de base de TNF- $\alpha$  uniquement, à l'entrée en réanimation, était un facteur indépendamment associé à la survenue de complications majeures, notamment l'utilisation d'un vasopresseur, le recours à l'EER et le décès.

Une publication récente a montré que le taux d'Ang-2 était prédictif de l'admission directe en réanimation chez les patients hospitalisés avec la Covid-19 (24). Nous montrons maintenant que l'Ang-2 est également associée à la gravité de la maladie à l'admission en unité de soins intensifs. Ces résultats suggèrent que la libération d'Ang-2 pourrait accompagner la progression de la maladie à Sars-CoV-2, bien que nous n'ayons pas pu confirmer son rôle dans la physiopathologie.

Nos nouvelles données, démontrant une corrélation positive et forte entre les l'Ang-2, le TNF- $\alpha$  et l'IL-6, soutiennent une voie physiopathologique reliant l'inflammation et les lésions endothéliales chez les patients gravement atteints par la Covid-19. L'interaction entre l'inflammation et l'activation endothéliale a déjà été décrite de façon précise (33). En effet, chez les patients en état de choc septique, il a été démontré que les taux plasmatiques d'Ang-2 étaient positivement corrélés aux taux plasmatiques de cytokines, y compris le TNF- $\alpha$  et l'IL-6 (34). Cependant, les lésions endothéliales et l'angiogenèse semblent prédominer davantage dans la Covid-19 que dans les insuffisances respiratoires aiguës non-Covid-19. En effet, des données de plus en plus cohérentes soutiennent l'hypothèse d'une maladie vasculaire et d'une atteinte endothéliale dans l'infection par le SarS-Cov-2. Les événements thrombotiques rapportés au cours de cette maladie laissent suggérer une activation endothéliale plus prononcée par rapport aux infections virales saisonnières (35)(36). Des séries d'autopsies ont mis en évidence l'expression plus prononcée des gènes de l'angiogenèse par rapport à la grippe saisonnière (19). Des inclusions virales ont également été visualisées dans les cellules endothéliales associées à l'apoptose (20). Des séries d'imageries acquises par tomodensitométrie spectrale utilisant un double balayage énergétique afin de mieux visualiser

la perfusion pulmonaire ont également montré davantage d'anomalies vasculaires que parenchymateuses (37). Dans une étude récente, 64% des patients Covid-19 présentaient des images décrites comme des « arbres en bourgeon » en faveur d'une anomalie de la perfusion sans lésion parenchymateuse associée (38). En plus des séries d'imageries et d'autopsies, nous pensons que nos données et celles de Smadja et al. sur l'Ang-2 soutiennent le rôle de la lésion endothéliale dans la physiopathologie du Covid-19 (24). Dans le même cadre, d'autres auteurs ont rapporté un niveau plus élevé de facteur de croissance endothélial vasculaire de type D (VEGF-D) chez des patients critiques, mettant en évidence un mécanisme vasculaire dans la physiopathologie et la progression de cette nouvelle maladie (39). De nouvelles études récemment publiées sont venues confirmer cette observation. Ainsi, en plus de la sévérité, l'Ang-2 apparaît comme un marqueur pronostic d'insuffisance rénale aiguë (40) et de mortalité (41) au cours de la Covid 19.

Dans notre étude, les patients critiques, qui avaient des niveaux d'Ang-2 significativement plus élevés à l'admission en réanimation que les patients sévères, ont également développé plus de défaillances d'organes, de thromboses veineuses et sont décédés plus fréquemment. Néanmoins, notre analyse de régression multivariée a indiqué que le principal facteur associé aux complications majeures et au décès était le TNF- $\alpha$ .

En réalité, le syndrome de relargage cytokinique était présent dans notre étude de cohorte comme le confirment les taux plasmatiques de TNF- $\alpha$  et d'IL-6, plus prononcés dans le groupe critique que dans le groupe sévère, ce qui est cohérent avec les études précédentes (10). Le TNF- $\alpha$  est un facteur inflammatoire bien connu, sécrété par de nombreux types de cellules y compris les cellules endothéliales, mais également connu depuis longtemps comme un inducteur direct de la perméabilité des cellules endothéliales pulmonaires (42)(43). Nos résultats indiquent que l'état critique, c'est-à-dire nécessitant une mise sous assistance ventilatoire, pourrait dépendre du taux plasmatique de TNF- $\alpha$ . De plus, un taux plasmatique élevé de TNF- $\alpha$  à l'admission en réanimation serait prédictif de complications futures pouvant être endothéliales-dépendantes ou non, et d'un mauvais pronostic. Bien que l'IL-6 ait reçu beaucoup d'attention dans Covid-19, avec plusieurs études thérapeutiques menées sur la base d'un antagoniste du récepteur à l'IL-6, nous avons trouvé une association plus forte du TNF- $\alpha$  avec la gravité de la maladie et la survenue de complications par rapport à l'IL-6, ce qui suggère que le TNF- $\alpha$  pourrait jouer un rôle clé. Par ailleurs, les essais cliniques basés sur l'anti-IL-6 dans la Covid-19 ont pour le moment été peu concluants (44). En effet, seulement une étude du groupe RECOVERY a montré une baisse de la mortalité à 28 jours (45). En outre, des données plus récentes confirment que l'orage cytokinique dans la Covid-19 n'est

pas aussi puissant que dans d'autres infections virales comme le montrent Sinha et al qui retrouvent un niveau d'IL-6 ayant tendance à être encore plus bas (11). Une autre courte série de patients critiques infectés par le Sars- CoV-2 a montré les mêmes résultats (46).

Le syndrome de relargage cytokinique reflète la dysrégulation du processus inflammatoire. En réaction à la pénétration et à la réplication du virus chez l'hôte, l'activation de l'inflammation est la première étape de la réponse systémique. Cependant, cet état hyper inflammatoire peut avoir des effets indésirables conduisant à des défaillances d'organes, des thromboses vasculaires et des lésions endothéliales comme nous l'avons observé dans le groupe critique (23). Un bref rapport précoce de l'essai RECOVERY a montré un bénéfice de la Dexaméthasone chez les patients les plus sévères avec une réduction de la mortalité à 28 jours (47), tendance confirmée par des études plus récentes. Cependant, ces résultats soutiennent la dysrégulation de l'inflammation chez ces patients. À la lumière de l'observation de lésions endothéliales et d'inflammation, les auteurs ont commenté tous les mécanismes qui interagissent entre l'inflammation et la maladie vasculaire (45), en particulier le TNF- $\alpha$ , produit et exerçant également son activité par l'activation de la voie de signalisation Nf $\kappa$ B dans les cellules endothéliales et les leucocytes. Cela peut expliquer la raison pour laquelle la Dexaméthasone, puissant stéroïde inhibant notamment la voie du Nf $\kappa$ B, a montré son efficacité chez des patients gravement atteints de Covid-19.

Les résultats des essais cliniques en cours évaluant l'efficacité de l'infliximab et de l'adalimumab, deux anticorps monoclonaux anti-TNF- $\alpha$  encore disponibles, chez des patients adultes hospitalisés atteints de Covid-19 sévère ou critique permettront de savoir si le TNF- $\alpha$  est une cible thérapeutique pertinente. En effet, en réduisant la synthèse des molécules d'adhésion et du VEGF en partie responsables des fuites capillaires et de l'atteinte endothéliale et par conséquent de l'infiltration leucocytaire dans les tissus sièges d'une importante inflammation, leur utilisation pourrait être prometteuse.

Notre étude a toutefois des limites. Les mesures de l'Ang-2 et des cytokines n'ont été effectuées qu'à l'admission en réanimation. Plusieurs mesures ponctuelles seraient plus précises pour décrire les résultats en fonction de la cinétique des biomarqueurs. En outre, les prélèvements sanguins à l'admission peuvent difficilement décrire un événement survenant des jours ou des semaines plus tard, bien que les investigations de base restent utiles pour estimer la gravité et aider à la décision médicale.

En raison de la petite taille de notre échantillon et du faible taux de complications, seuls quelques facteurs ont pu être évalués dans l'analyse de régression. Néanmoins, notre étude de cohorte a présenté les caractéristiques attendues chez les patients sévèrement atteints par la Covid-19 à savoir une prédominance d'hommes, la forte prévalence de l'hypertension et du diabète, la CRP élevée, la lymphopénie et le niveau élevé de D-dimères (48). Nous avons également réussi à confirmer les résultats de précédentes études concernant le niveau élevé d'IL-6 dans la gravité de la Covid-19 (10), gage d'une certaine qualité méthodologique.

## V. CONCLUSION

Lors de l'admission en réanimation, les taux plasmatiques des cytokines pro-inflammatoires, TNF- $\alpha$  et IL-6, et de l'Ang-2 étaient associés à la gravité des patients Covid-19.

L'Ang-2 était significativement corrélée au TNF- $\alpha$  et à l'IL-6, suggérant que les lésions endothéliales et l'inflammation étaient mécaniquement liées.

Cependant, seul le dosage du TNF- $\alpha$  à l'admission était prédictif de la survenue de complications majeures et de décès pendant le séjour en réanimation.

D'autres études seront donc nécessaires pour évaluer le TNF- $\alpha$  en tant que biomarqueur utile au pronostic et comme potentielle cible thérapeutique chez les patients sévèrement atteints par la Covid-19.

## VI. BIBLIOGRAPHIE

1. Cui J, Li F, Shi Z-L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology*. mars 2019;17(3):181-92.
2. Hosts and Sources of Endemic Human Coronaviruses. *Advances in Virus Research*. 1 janv 2018;100:163-88.
3. Chen N, Zhou M, Dong X, Qu J, Gong F, Han Y, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *The Lancet*. févr 2020;395(10223):507-13.
4. Docherty AB, Harrison EM, Green CA, Hardwick HE, Pius R, Norman L, et al. Features of 20 133 UK patients in hospital with covid-19 using the ISARIC WHO Clinical Characterisation Protocol: prospective observational cohort study. *BMJ*. 22 mai 2020;m1985.
5. Coronavirus : chiffres clés et évolution de la COVID-19 en France et dans le Monde [Internet]. [cité 20 avr 2021]. Disponible sur: /dossiers/coronavirus-covid-19/coronavirus-chiffres-cles-et-evolution-de-la-covid-19-en-france-et-dans-le-monde
6. Ye Q, Wang B, Mao J. The pathogenesis and treatment of the 'Cytokine Storm' in COVID-19. *Journal of Infection*. juin 2020;80(6):607-13.
7. Garnier M, Quesnel C, Constantin J-M. Atteintes pulmonaires liées à la COVID-19. *La Presse Médicale Formation*. févr 2021;2(1):14-24.
8. Moore JB, June CH. Cytokine release syndrome in severe COVID-19. *Science*. 1 mai 2020;368(6490):473-4.
9. Jamilloux Y, Henry T, Belot A, Viel S, Fauter M, El Jammal T, et al. Should we stimulate or suppress immune responses in COVID-19? Cytokine and anti-cytokine interventions. *Autoimmunity Reviews*. juill 2020;19(7):102567.
10. Wang C, Fei D, Li X, Zhao M, Yu K. IL-6 may be a good biomarker for earlier detection of COVID-19 progression. *Intensive Care Med*. juill 2020;46(7):1475-6.
11. Sinha P, Matthay MA, Calfee CS. Is a "Cytokine Storm" Relevant to COVID-19? *JAMA Intern Med*. 1 sept 2020;180(9):1152.
12. Hussell T, Pennycook A, Openshaw PJ. Inhibition of tumor necrosis factor reduces the severity of virus-specific lung immunopathology. *Eur J Immunol*. sept 2001;31(9):2566-73.
13. Charles P, Elliott MJ, Davis D, Potter A, Kalden JR, Antoni C, et al. Regulation of cytokines, cytokine inhibitors, and acute-phase proteins following anti-TNF-alpha therapy in rheumatoid arthritis. *J Immunol*. 1 août 1999;163(3):1521-8.

14. Feldmann M, Maini RN, Woody JN, Holgate ST, Winter G, Rowland M, et al. Trials of anti-tumour necrosis factor therapy for COVID-19 are urgently needed. *Lancet*. 2020;395(10234):1407-9.
15. Robinson PC, Richards D, Tanner HL, Feldmann M. Accumulating evidence suggests anti-TNF therapy needs to be given trial priority in COVID-19 treatment. *Lancet Rheumatol*. nov 2020;2(11):e653-5.
16. Mangalmurti NS, Reilly JP, Cines DB, Meyer NJ, Hunter CA, Vaughan AE. COVID-19-associated Acute Respiratory Distress Syndrome Clarified: A Vascular Endotype? *Am J Respir Crit Care Med*. 1 sept 2020;202(5):750-3.
17. Mahjoub Y, Rodenstein DO, Jounieaux V. Severe Covid-19 disease: rather AVDS than ARDS? *Crit Care*. déc 2020;24(1):327.
18. Jounieaux V, Rodenstein DO, Mahjoub Y. On Happy Hypoxia and on Sadly Ignored “Acute Vascular Distress Syndrome” in Patients with COVID-19. *Am J Respir Crit Care Med*. 1 déc 2020;202(11):1598-9.
19. Ackermann M, Verleden SE, Kuehnel M, Haverich A, Welte T, Laenger F, et al. Pulmonary Vascular Endothelialitis, Thrombosis, and Angiogenesis in Covid-19. *N Engl J Med*. 9 juill 2020;383(2):120-8.
20. Varga Z, Flammer AJ, Steiger P, Haberecker M, Andermatt R, Zinkernagel AS, et al. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. *The Lancet*. mai 2020;395(10234):1417-8.
21. Goshua G, Pine AB, Meizlish ML, Chang C-H, Zhang H, Bahel P, et al. Endotheliopathy in COVID-19-associated coagulopathy: evidence from a single-centre, cross-sectional study. *The Lancet Haematology*. août 2020;7(8):e575-82.
22. Teuwen L-A, Geldhof V, Pasut A, Carmeliet P. COVID-19: the vasculature unleashed. *Nat Rev Immunol*. juill 2020;20(7):389-91.
23. Leisman DE, Deutschman CS, Legrand M. Facing COVID-19 in the ICU: vascular dysfunction, thrombosis, and dysregulated inflammation. *Intensive Care Med*. juin 2020;46(6):1105-8.
24. Smadja DM, Guerin CL, Chocron R, Yatim N, Boussier J, Gendron N, et al. Angiopoietin-2 as a marker of endothelial activation is a good predictor factor for intensive care unit admission of COVID-19 patients. *Angiogenesis*. nov 2020;23(4):611-20.
25. Bennis Y, Kamel S. Structure, fonction biologique et utilité clinique des angiopoïétines 1 et 2 dans l’exploration de la dysfonction endothéliale. *Revue Francophone des Laboratoires*. 1 juin 2020;2020(523):52-60.

26. David S, Mukherjee A, Ghosh CC, Yano M, Khankin EV, Wenger JB, et al. Angiotensin-2 may contribute to multiple organ dysfunction and death in sepsis\*: Critical Care Medicine. nov 2012;40(11):3034-41.
27. Davis JS, Yeo TW, Piers KA, Woodberry T, Celermajer DS, Stephens DP, et al. Angiotensin-2 is increased in sepsis and inversely associated with nitric oxide-dependent microvascular reactivity. Crit Care. 2010;14(3):R89.
28. Orfanos SE, Kotanidou A, Glynos C, Athanasiou C, Tsigkos S, Dimopoulou I, et al. Angiotensin-2 is increased in severe sepsis: Correlation with inflammatory mediators: Critical Care Medicine. janv 2007;35(1):199-206.
29. Pregernig A, Müller M, Held U, Beck-Schimmer B. Prediction of mortality in adult patients with sepsis using six biomarkers: a systematic review and meta-analysis. Ann Intensive Care. déc 2019;9(1):125.
30. Li F, Yin R, Guo Q. Circulating angiotensin-2 and the risk of mortality in patients with acute respiratory distress syndrome: a systematic review and meta-analysis of 10 prospective cohort studies. Ther Adv Respir Dis. janv 2020;14:175346662090527.
31. Toulouse E, Masseguin C, Lafont B, McGurk G, Harboun A, Roberts J, et al. French legal approach to clinical research. Anaesthesia Critical Care & Pain Medicine. déc 2018;37(6):607-14.
32. WHO COVID-19 Case definition [Internet]. [cité 22 avr 2021]. Disponible sur: [https://www.who.int/publications-detail-redirect/WHO-2019-nCoV-Surveillance\\_Case\\_Definition-2020.2](https://www.who.int/publications-detail-redirect/WHO-2019-nCoV-Surveillance_Case_Definition-2020.2)
33. Pober JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. Nat Rev Immunol. oct 2007;7(10):803-15.
34. Fisher J, Douglas JJ, Linder A, Boyd JH, Walley KR, Russell JA. Elevated Plasma Angiotensin-2 Levels Are Associated With Fluid Overload, Organ Dysfunction, and Mortality in Human Septic Shock: Critical Care Medicine. nov 2016;44(11):2018-27.
35. CRICS TRIGGERSEP Group (Clinical Research in Intensive Care and Sepsis Trial Group for Global Evaluation and Research in Sepsis), Helms J, Tacquard C, Severac F, Leonard-Lorant I, Ohana M, et al. High risk of thrombosis in patients with severe SARS-CoV-2 infection: a multicenter prospective cohort study. Intensive Care Med. juin 2020;46(6):1089-98.
36. Beyls C, Huette P, Abou-Arab O, Berna P, Mahjoub Y. Extracorporeal membrane oxygenation for COVID-19-associated severe acute respiratory distress syndrome and risk of thrombosis. British Journal of Anaesthesia. août 2020;125(2):e260-2.

37. Lang M, Som A, Mendoza DP, Flores EJ, Reid N, Carey D, et al. Hypoxaemia related to COVID-19: vascular and perfusion abnormalities on dual-energy CT. *Lancet Infect Dis.* déc 2020;20(12):1365-6.
38. Eddy RL, Sin DD. Computed Tomography Vascular Tree-in-Bud: A Novel Prognostic Imaging Biomarker in COVID-19? *Am J Respir Crit Care Med.* 1 sept 2020;202(5):642-4.
39. Kong Y, Han J, Wu X, Zeng H, Liu J, Zhang H. VEGF-D: a novel biomarker for detection of COVID-19 progression. *Crit Care.* déc 2020;24(1):373.
40. Henry BM, de Oliveira MHS, Cheruiyot I, Benoit JL, Cooper DS, Lippi G, et al. Circulating level of Angiopoietin-2 is associated with acute kidney injury in coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Angiogenesis.* 23 mars 2021;
41. Villa E, Critelli R, Lasagni S, Melegari A, Curatolo A, Celsa C, et al. Dynamic angiopoietin-2 assessment predicts survival and chronic course in hospitalized patients with COVID-19. *Blood Adv.* 9 févr 2021;5(3):662-73.
42. Petrache I, Birukova A, Ramirez SI, Garcia JGN, Verin AD. The Role of the Microtubules in Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ -Induced Endothelial Cell Permeability. *Am J Respir Cell Mol Biol.* mai 2003;28(5):574-81.
43. Goldblum SE, Hennig B, Jay M, Yoneda K, McClain CJ. Tumor necrosis factor alpha-induced pulmonary vascular endothelial injury. *Infection and Immunity.* 1989;57(4):1218-26.
44. Hermine O, Mariette X, Tharaux P-L, Resche-Rigon M, Porcher R, Ravaud P, et al. Effect of Tocilizumab vs Usual Care in Adults Hospitalized With COVID-19 and Moderate or Severe Pneumonia: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Intern Med.* 1 janv 2021;181(1):32-40.
45. Group RC, Horby PW, Pessoa-Amorim G, Peto L, Brightling CE, Sarkar R, et al. Tocilizumab in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): preliminary results of a randomised, controlled, open-label, platform trial. *medRxiv.* 11 févr 2021;2021.02.11.21249258.
46. Wilson JG, Simpson LJ, Ferreira A-M, Rustagi A, Roque J, Asuni A, et al. Cytokine profile in plasma of severe COVID-19 does not differ from ARDS and sepsis. *JCI Insight.* 3 sept 2020;5(17):e140289.
47. The RECOVERY Collaborative Group. Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19. *N Engl J Med.* 25 févr 2021;384(8):693-704.
48. 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. *The Lancet.* mars 2020;395(10229):1054-62.

## VII. ABSTRACT

**Background:** Inflammatory response and endothelial injury would play a critical role in the progression of the coronavirus disease 2019 (Covid-19). The aim of this study was to determine the plasma level of pro-inflammatory cytokines and angiopoietins, as markers of endothelial injury, with respect to the Covid-19 severity on admission to the intensive care medicine (ICU) and to assess their association with clinical outcomes.

**Methods:** We conducted a prospective single center observational study at Amiens Hospital University. The population study was Covid-19 patients admitted to ICU. Patients were classified as severe or critical according to the World Health Organization case definition.

Baseline plasma levels of interleukin 6 (IL-6), tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ), angiopoietin-1 (Ang-1) and angiopoietin-2 (Ang-2), were compared according to severity, and were tested through logistic regression analysis of vasopressor use, renal replacement therapy (RRT) and death during the ICU stay.

**Results:** We enrolled 65 patients from March to May 2020. 17 patients were severe (26%) and 48 patients were critical (74%). Demographic characteristics were similar between groups. The overall mortality in the cohort was 12 of 65 (18%). Critical patients presented significantly higher levels of TNF- $\alpha$ , IL-6 and Ang-2 at admission in comparison to severe patients. After adjusted for clinical severity, only TNF- $\alpha$  was independently associated with vasopressor use (OR= 1.11 [1.08-1.18]; p=0.03), requirement for RRT (OR= 1.09 [1.04-1.15]; p=0.01) and in-ICU death.

**Conclusion:** TNF- $\alpha$  more than IL-6 prevailed in Covid-19 progression and outcomes.

**Keywords:** angiopoietin - Covid 19 - outcomes - severe pneumonia- cytokine

## **VIII. RESUME**

**Contexte :** La réponse inflammatoire et les lésions endothéliales joueraient un rôle essentiel dans la progression de la maladie à Covid-19. Le but de cette étude était d'évaluer le taux plasmatique de cytokines pro-inflammatoires et d'angiopoïétines, comme marqueurs des lésions endothéliales, par rapport à la sévérité des patients admis en réanimation et d'apprécier leur association aux éventuelles complications au cours du séjour.

**Méthodes :** Nous avons mené une étude observationnelle prospective monocentrique au CHU d'Amiens. La population étudiée était l'ensemble des patients Covid-19 admis en réanimation. Ces derniers ont été classés en 2 groupes, sévères ou critiques, selon la définition de l'Organisation mondiale de la santé.

Les concentrations plasmatiques de base de l'interleukine 6 (IL-6), du facteur de nécrose tumorale (TNF- $\alpha$ ), de l'angiopoïétine-1 (Ang-1) et de l'angiotensine-2 (Ang-2) ont été comparées en fonction de la gravité et testées par régression logistique à l'utilisation de vasopresseurs, au recours à l'épuration extra-rénale (EER) et au décès pendant le séjour en réanimation.

**Résultats :** Nous avons recruté 65 patients de mars à mai 2020. 17 patients étaient sévères (26%) et 48 patients étaient critiques (74%). Les caractéristiques démographiques étaient similaires entre les deux groupes. La mortalité globale dans la cohorte était de 12 sur 65 (18%). Les patients critiques ont présenté des niveaux significativement plus élevés de TNF- $\alpha$ , d'IL-6 et d'Ang-2 à l'admission par rapport aux patients sévères. Après ajustement en fonction de la gravité clinique, seul le TNF- $\alpha$  était indépendamment associé à l'utilisation d'un vasopresseur (OR = 1,11 [1,08-1,18] ; p = 0,03), au recours à l'EER (OR = 1,09 [1,04-1,15] ; p = 0,01) et au décès en réanimation.

**Conclusion :** Le TNF- $\alpha$  est davantage un marqueur prédictif de la progression et des complications secondaires au COVID-19 par rapport à l'IL-6.

**Mots clefs:** angiopoïétine – Covid 19 – complications – SDRA - cytokine

## **Abstract:**

**Background:** Inflammatory response and endothelial injury would play a critical role in the progression of the coronavirus disease 2019 (Covid-19). The aim of this study was to determine the plasma level of pro-inflammatory cytokines and angiopoietins, as markers of endothelial injury, with respect to the Covid-19 severity on admission to the intensive care medicine (ICU) and to assess their association with clinical outcomes.

**Methods:** We conducted a prospective single center observational study at Amiens Hospital University. The population study was Covid-19 patients admitted to ICU. Patients were classified as severe or critical according to the World Health Organization case definition.

Baseline plasma levels of interleukin 6 (IL-6), tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ), angiopoietin-1 (Ang-1) and angiopoietin-2 (Ang-2), were compared according to severity, and were tested through logistic regression analysis of vasopressor use, renal replacement therapy (RRT) and death during the ICU stay.

**Results:** We enrolled 65 patients from March to May 2020. 17 patients were severe (26%) and 48 patients were critical (74%). Demographic characteristics were similar between groups. The overall mortality in the cohort was 12 of 65 (18%). Critical patients presented significantly higher levels of TNF- $\alpha$ , IL-6 and Ang-2 at admission in comparison to severe patients. After adjusted for clinical severity, only TNF- $\alpha$  was independently associated with vasopressor use (OR= 1.11 [1.08-1.18]; p=0.03), requirement for RRT (OR= 1.09 [1.04-1.15]; p=0.01) and in-ICU death.

**Conclusion:** TNF- $\alpha$  more than IL-6 prevailed in Covid-19 progression and outcomes.

**Keywords:** angiopoietin - Covid 19 - outcomes - severe pneumonia- cytokine

## **Résumé :**

**Contexte :** La réponse inflammatoire et les lésions endothéliales joueraient un rôle essentiel dans la progression de la maladie à Covid-19. Le but de cette étude était d'évaluer le taux plasmatique de cytokines pro-inflammatoires et d'angiopoïétines, comme marqueurs des lésions endothéliales, par rapport à la sévérité des patients admis en réanimation et d'apprécier leur association avec les éventuelles complications au cours du séjour.

**Méthodes :** Nous avons mené une étude observationnelle prospective monocentrique au CHU d'Amiens. La population étudiée était l'ensemble des patients Covid-19 admis en réanimation. Ces derniers ont été classés en 2 groupes, sévères ou critiques, selon la définition de l'Organisation mondiale de la santé.

Les concentrations plasmatiques de base de l'interleukine 6 (IL-6), du facteur de nécrose tumorale (TNF- $\alpha$ ), de l'angiopoïétine-1 (Ang-1) et de l'angiopoïétine-2 (Ang-2) ont été comparées en fonction de la gravité et testées par régression logistique à l'utilisation de vasopresseurs, au recours à l'épuration extra-rénale (EER) et au décès pendant le séjour en réanimation.

**Résultats :** Nous avons recruté 65 patients de mars à mai 2020. 17 patients étaient sévères (26%) et 48 patients étaient critiques (74%). Les caractéristiques démographiques étaient similaires entre les deux groupes. La mortalité globale dans la cohorte était de 12 sur 65 (18%). Les patients critiques ont présenté des niveaux significativement plus élevés de TNF- $\alpha$ , d'IL-6 et d'Ang-2 à l'admission par rapport aux patients sévères. Après ajustement en fonction de la gravité clinique, seul le TNF- $\alpha$  était indépendamment associé à l'utilisation d'un vasopresseur (OR = 1,11 [1,08-1,18]; p = 0,03), au recours à l'EER (OR = 1,09 [1,04-1,15]; p = 0,01) et au décès en réanimation.

**Conclusion :** Le TNF- $\alpha$  est davantage un marqueur prédictif de la progression et des complications secondaires au COVID-19 par rapport à l'IL-6.

**Mots clefs :** angiopoïétine – Covid 19 – complications – SDRA - cytokine