

Rôle du TTV comme biomarqueur de la sévérité des infections à SARS-CoV-2

Morgane Solis, Floriane Gallais, Sabrina Garnier-Kepka, Nicolas Lefebvre, Ilies Benotmane, Pierre-Olivier Ludes, Vincent Castelain, Ferhat Meziani, Sophie Caillard, Olivier Collange, Samira Fafi-Kremer

Déclaration de liens d'intérêt avec les industries de santé en rapport avec le thème de la présentation (loi du 04/03/2002) :

Intervenant : SOLIS Morgane

Titre : Rôle du TTV comme biomarqueur de la sévérité des infections à SARS-CoV-2

- Consultant ou membre d'un conseil scientifique
- Conférencier ou auteur/rédacteur rémunéré d'articles ou documents
- Prise en charge de frais de voyage, d'hébergement ou d'inscription à des congrès ou autres manifestations
- Investigateur principal d'une recherche ou d'une étude clinique

☐

OUI



NON

☐

OUI



NON



OUI

☐

NON

☐

OUI

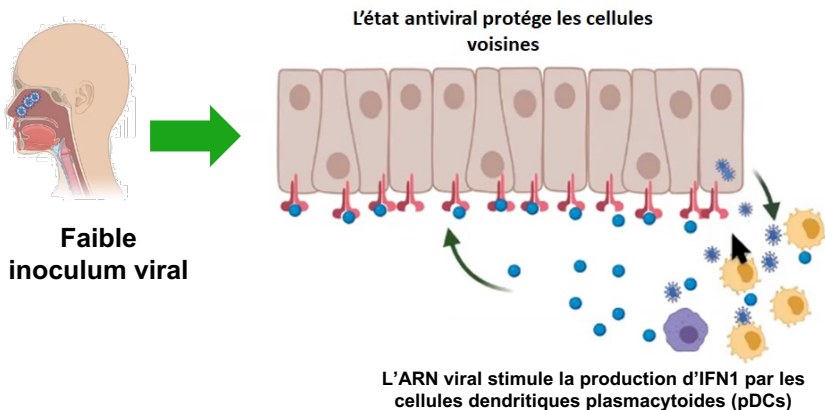


NON

COVID sévère

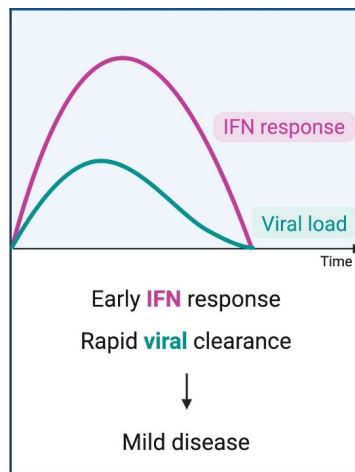
- **Facteurs de risque** : âge, sexe, obésité, diabète, maladies cardiovasculaires...
- Sévérité liée à une **réponse immunitaire inappropriée et emballement**
- **Marqueurs biologiques ?**

Réponse immunitaire innée efficace dans les COVID non sévères

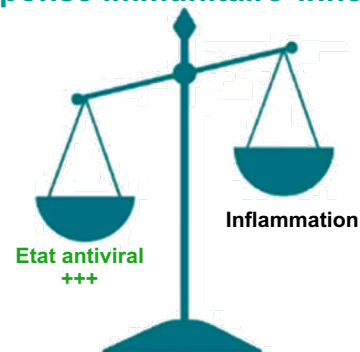


Jeunes

Stimulation précoce de la réponse IFN



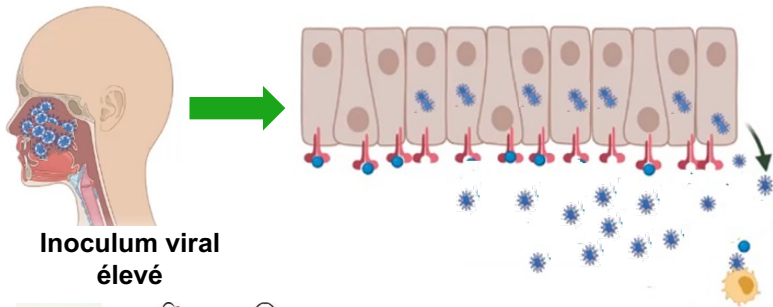
Réponse immunitaire innée



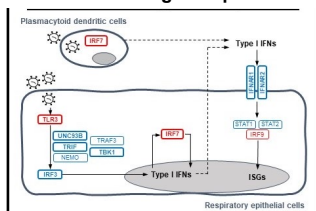
Elimination rapide du virus

Peu ou pas de symptômes

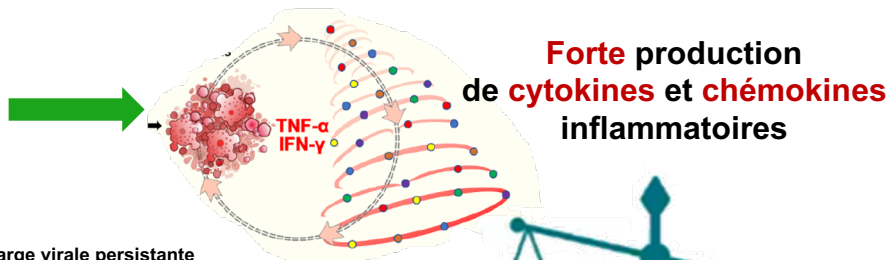
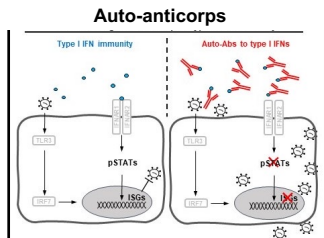
Réponse immunitaire déséquilibrée et inefficace dans les COVID sévères



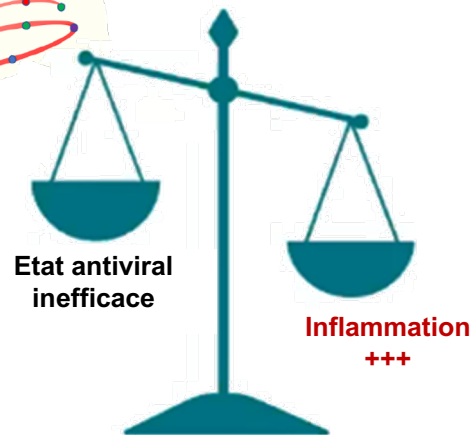
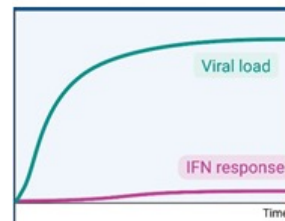
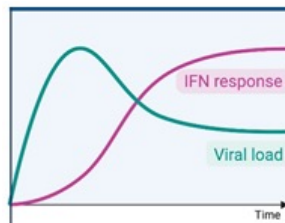
Mutations génétiques



Production retardée ou absente de l'IFN type 1



Charge virale persistante



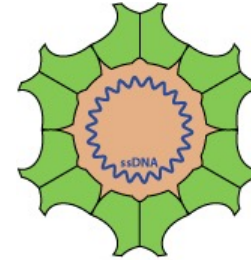
Emballement, hyper-inflammation = COVID sévère

COVID sévère : prédiction par biomarqueurs

- **Anomalies biologiques constatées dans les cas de COVID sévère :**
 - Paramètres hématologiques (lymphopénie, polynucléose neutrophile, thrombopénie...)
 - Coagulation (augmentation TP, D-dimères, PDF...)
 - Paramètres biochimiques (ASAT/ALAT, hypoalbuminémie, LDH, créatinine...)
 - Inflammation (CRP, ferritine, procalcitonine, IL-6, IL-10...)
- **Utilisation pour prédiction sévérité/décès :**
 - Cinétique lymphocytes, neutrophiles, albumine, CRP, LDH, IL-6...
 - Modèle associant biomarqueurs (LDH / lymphocytes / CRP)
 - COVID Severity Score (algorithme incluant facteurs de risque et 7 biomarqueurs dont CRP, procalcitonine, D-dimères...)

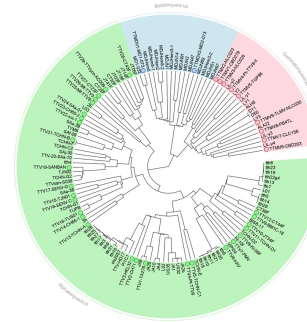
TTV = Torquetenovirus

- Découvert en **1997** (famille des *Anelloviridae*)
- Petit virus à génome ADN circulaire simple brin
- Nombreuses espèces et variabilité génétique
- Prévalence $\approx$ **90%** de la population
- Persistance de la **charge virale sanguine** et présence dans la plupart des tissus/organes



© ViralZone 2008
Swiss Institute of Bioinformatics

T=1



Pathologies associées ?

- 1997 : hépatite ?
- 2000 : atteintes hématologiques ?
- 2002 : atteintes rénales ?
- 2005 : cofacteur lupus, cancer ? atteintes respiratoires ?
- 2006 : cofacteur maladies auto-immunes ?



Aucune preuve concluante

Pathologies associées ?

a: Superkingdom

Bacteria 25%
Eukaryota 2%
Viruses 73%

b: Viruses: order and family

Herpesvirales 13%
Caudovirales 5%
Adenoviridae 2%
Anelloviridae 68%
Polyomaviridae 5%
Poxviridae 1%
Retroviridae 1%
Other 5%

c: Anelloviridae: genera

Alphatorquevirus 97%
Betatorquevirus 3%

d: Alphatorque viruses

TTV1 3%
TTV10 5%
TTV12 5%
TTV14 <1%
TTV15 12%
TTV16 10%
TTV19 7%
TTV27 4%
TTV28 5%
TTV3 13%
TTV4 1%

TTV6 6%
TTV7 4%
TTV8 26%

e: Polyoma viruses

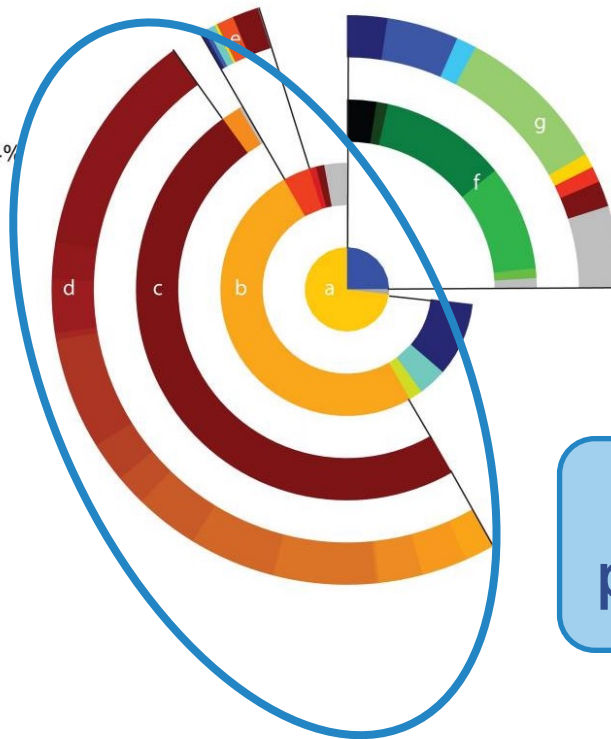
WU Polyomavirus 6%
SV40 6%
Polyomavirus HPyV6 13%
TS associated polyomavirus 4%
JC polyomavirus 27%
BK polyomavirus 41%

f: Bacteria: phyla

Actinobacteria 10%
Bacteroidetes 4%
Firmicutes 43%
Proteobacteria 36%
Tenericutes 3%
Other 4%

g: Bacteria order

Actinomycetales 10%
Burkholderiales 17%
Enterobacteriales 5%
Lactobacillales 36%
Mycoplasmatales 3%
Pseudomonadales 4%
Selenomonadales 6%
Other 19%



96 transplant recipients:
41 adult heart
24 pediatric heart
31 lung

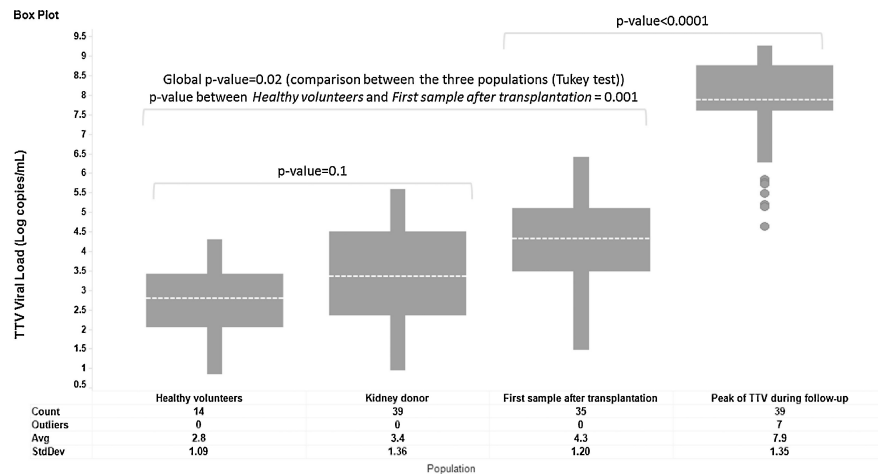
656 plasma samples collected
longitudinally

cfDNA purified and
sequenced (1.2 Gbp per sample)

**TTV = composant
principal du virome**

Virémie TTV et immunité

- **TTV et âge :**
 - Augmentation avec l'âge
 - Marqueur d'immunosénescence
- **TTV et immunosuppression :**
 - Prévalence et charges virales plus élevées chez l'immunodéprimé



TTV = marqueur endogène de l'état global du système immunitaire

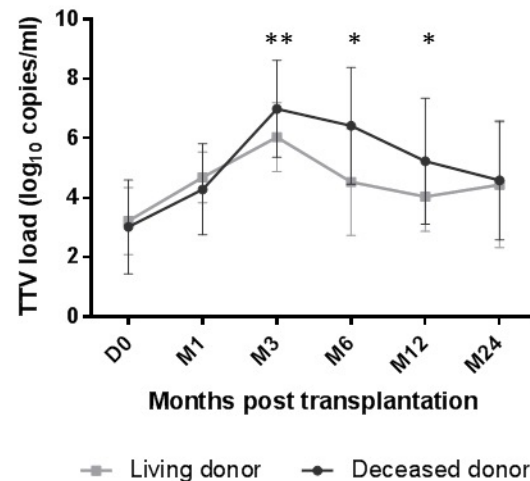
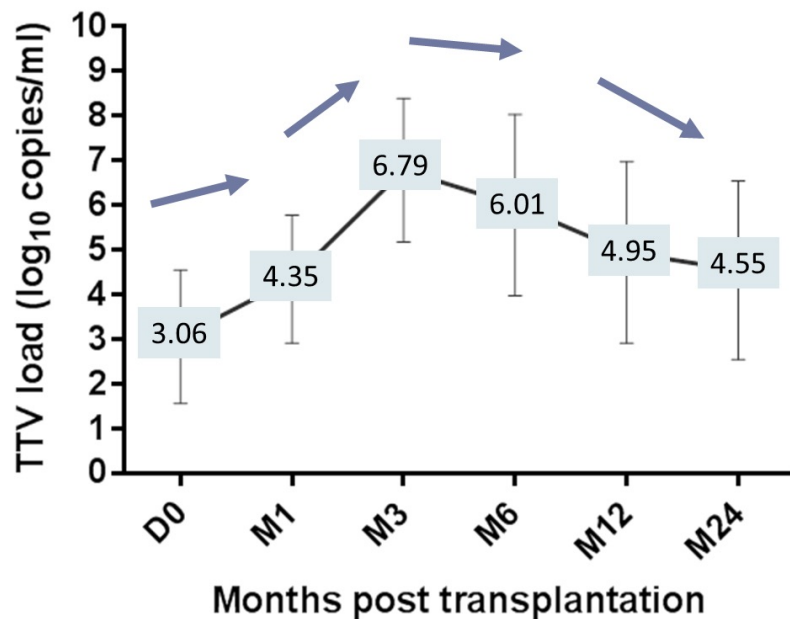
Mesure de la virémie TTV

- Basée sur PCR UTR
- Techniques maison, kit
- Mesure de 10^1 à 10^{10} copies/mL

	TTV R-gene® - Ref. 69-030B		
Kit Content	Quantitative & Qualitative complete kit [Ready-to-use amplification premix, Internal Control (IC2), 4 Quantification Standards (QS), Sensitivity Control (SC)]		
Number of tests	90 tests		
Shelf Life	18 months		
Regulatory status	Research Use Only (RUO)		
Storage conditions	-15°C / -31°C		
Technology	Real-Time PCR / 5' nuclease TaqMan® technology		
Gene target	The amplified region for TTV is the 5'-UTR region (untranslated region). Size of amplified fragment: 128 base pairs		
Validations	Sample types	Extraction	Amplification
	• Whole blood • Blood plasma	• eMAG™ • NucliSENS® easyMAG® • MagNA Pure Compact	• ABI 7500 Fast, ABI 7500 Fast Dx, ABI StepOne • LightCycler 480 System II • Rotor-Gene Q & Rotor-Gene 6000 • Dx Real-Time System & CFX96

Cinétique TTV en transplantation

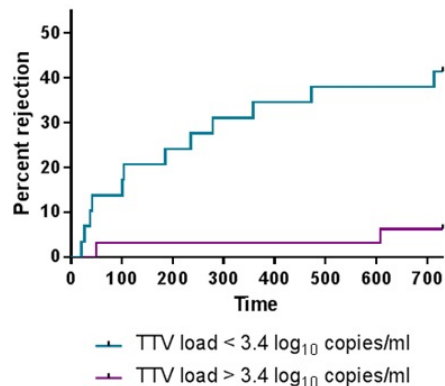
- Greffés rénaux (n=70) : **86%** positifs à J0, **96%** durant le suivi



Virémie TTV en transplantation et risque de rejet

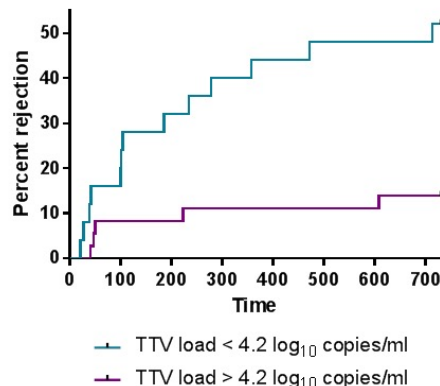
- 18 rejets chez greffés TTV+ (humoral ou mixte : 10, cellulaire : 8) *médiane 103 jours post-Tx (range: 21-713)*

Risque de rejet selon virémie TTV J0



Greffés avec virémie TTV $\leq 3.4 \log_{10}$ à J0 :
risque plus élevé de rejet, **HR: 5.96**
(95%CI: 2.06-17.2) $p=0.001$

Risque de rejet selon virémie TTV M1



Greffés avec virémie TTV $\leq 4.2 \log_{10}$ à M1 :
risque plus élevé de rejet, **HR: 4.94**
(95%CI: 1.88-12.9) $p=0.001$

Virémie TTV : une histoire de seuils

Parameter (higher risk)	Transplant type (no. pts.)	Plasma TTV viremia		Reference
		Phase	Predictive level (log DNA copies/ml)	
Viral reactivation	Lung (31)	3 rd	> 9.3	Gorzer et al. 2014
	HSCT (23)	2 nd (at day 30)	> 8.4	Gilles et al. 2017

Virémie trop élevée
= pas assez d'immunité
= infections

Virémie trop basse
= trop d'immunité
= rejet

- Facteurs de variation du seuil : phase post greffe, type de greffe, paramètre...

Rôle du TTV comme biomarqueur de la sévérité des infections à SARS-CoV-2 ?

Suivi des charges virales sanguines SARS-CoV-2 et TTV dans une cohorte de patients COVID

→ **Evaluation de l'intensité de la réponse immunitaire globale dans le contexte COVID**

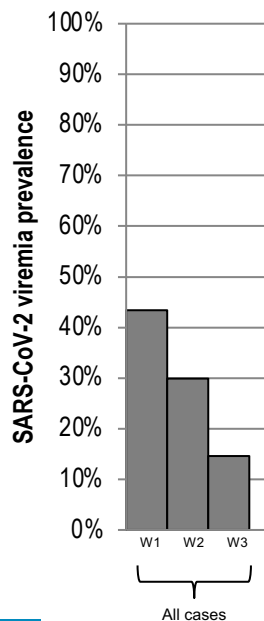
→ **Intérêt en tant que marqueurs prédictifs d'évolution vers une forme sévère**

TTV et SARS-CoV-2 : patients et méthodes

- **215 patients COVID+ (403 échantillons de plasma)**
 - **87 cas sévères** (réanimation et/ou décès) suivis longitudinalement
 - **128 cas non sévères** (formes légères ou modérées de pneumopathies ne nécessitant pas de ventilation invasive)
- **Analyses virologiques**
 - **Charge virale TTV plasmatique** : TTV R-gene® kit
 - **Virémie SARS-CoV-2** : RT-PCR Pasteur IP2/IP4
 - **IgM/IgG anti SARS-CoV-2** : test rapide Biosynex®

Virémie SARS-CoV-2 et sévérité de la maladie

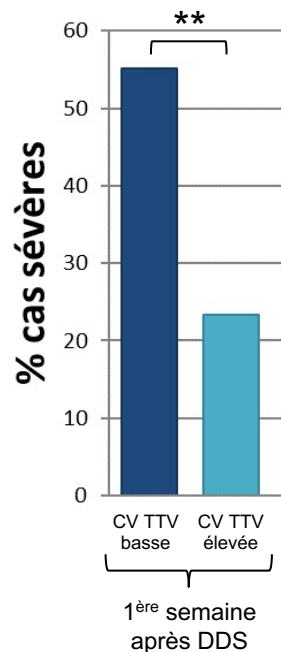
Virémie SARS-CoV-2



- La prévalence de la virémie SARS-CoV-2 décroît avec le temps, que ce soit chez les cas sévères ou non-sévères
- La prévalence de la virémie SARS-CoV-2 est plus élevée chez les cas sévères, à tous les temps mesurés :
 - 1^{ère} semaine : **70,4%** des cas sévères vs **28,6 %** des cas non sévères ($p=0,0006$)
 - 2^{ème} semaine : **47,5%** des cas sévères vs **16,0%** des cas non sévères ($p=0,0001$)
 - 3^{ème} semaine : **21,0%** des cas sévères vs **4,9%** des cas non sévères ($p=0,025$)

Charges virales TTV et sévérité de la maladie

Charge virale TTV



- Chez les patients présentant une charge virale TTV basse (seuil de 700 copies/mL), les cas sévères sont plus fréquents :
 - 1ère semaine : **55,2% de cas sévères** chez les patients présentant une charge virale TTV basse vs **23,4%** chez les patients avec une charge virale TTV élevée (likelihood ratio 2,23, $p=0,0069$)
 - 2ème semaine : **58,3% de cas sévères** chez les patients présentant une charge virale TTV basse vs **31,1%** chez les patients avec une charge virale TTV élevée (likelihood ratio 1,83, $p=0,0017$)
- Risque d'atteinte sévère lié à une réponse immunitaire globale et/ou spécifique trop importante ?

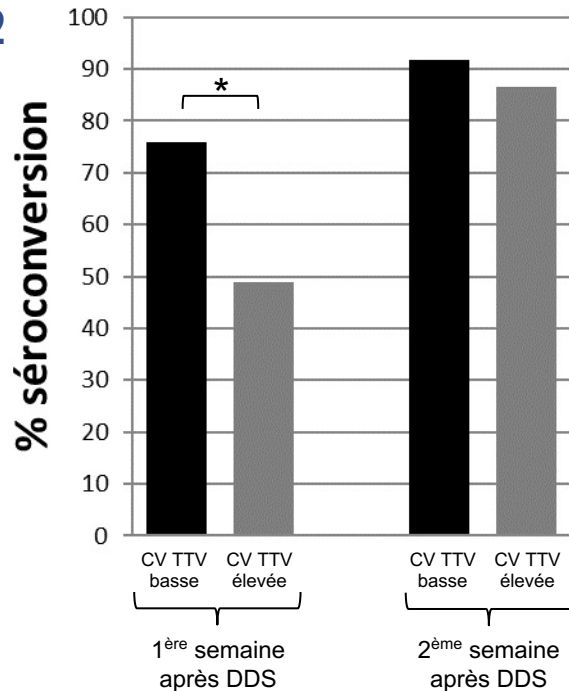
Charges virales TTV et immunité anti-SARS-CoV-2

- Comparaison des taux de séroconversion SARS-CoV-2 selon la catégorie TTV (charge virale basse ou élevée)

- A la première semaine :

- 75,9% de séroconversion chez patients avec charge virale TTV faible
- vs 48,9% chez patients avec charge virale TTV élevée ($p=0,030$)

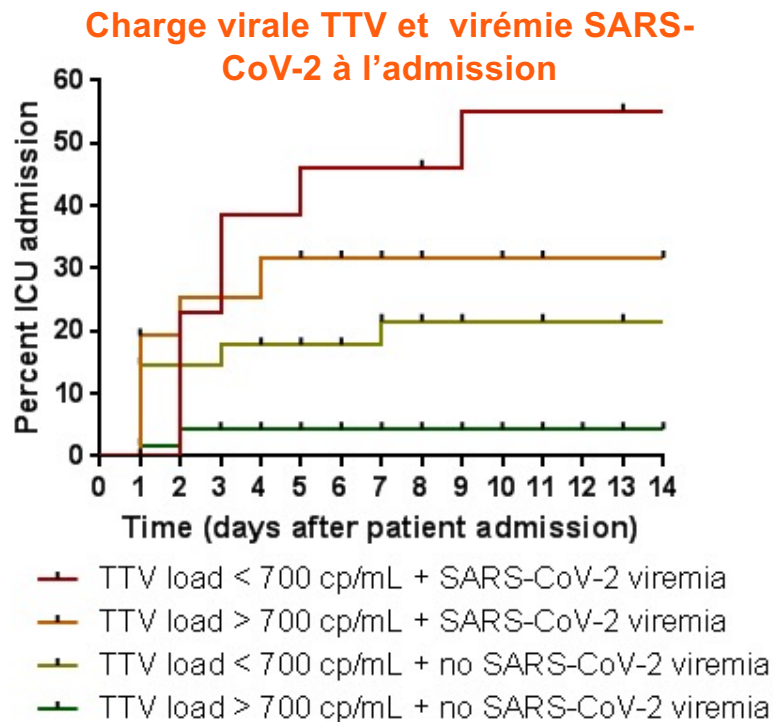
- **Séroconversion plus rapide** chez les patients avec charge TTV basse (= beaucoup d'immunité)



Charges virales TTV et taux de lymphocytes

- **Comparaison des taux de lymphocytes chez les cas sévères ou non sévères**
 - 1ère semaine : taux de lymphocytes et ratios Ly/PNN similaires
 - 2ème semaine : **cinétique défavorable de ces marqueurs chez les cas sévères** (diminution du taux de lymphocytes à $710/\text{mm}^3$ vs $895/\text{mm}^3$ chez les cas non sévères, $p=0,025$; diminution du ratio Ly/PNN 0,11 vs 0,20 chez les cas non sévères, $p<0,0001$)
- Différence dans l'évolution de ces marqueurs constatée à partir de la deuxième semaine après le début des symptômes, alors que la charge virale TTV est déjà plus basse chez les cas sévères à partir de la première semaine après le début des symptômes : **TTV = marqueur plus précoce ?**

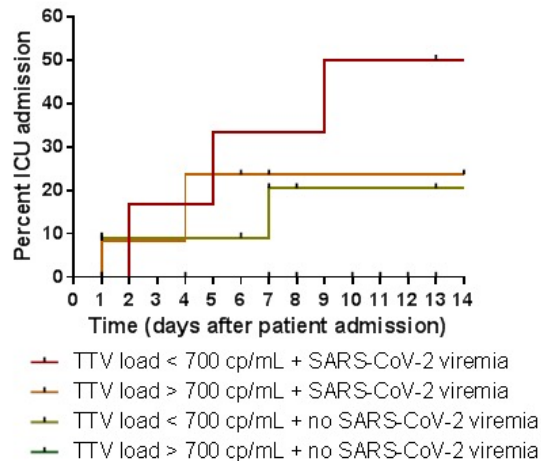
Prédiction du risque d'atteinte sévère selon la charge virale TTV et la virémie SARS-CoV-2 à l'admission (1)



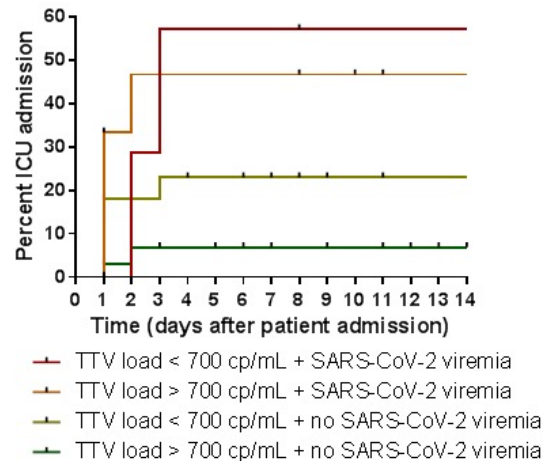
- 138 patients avec plasma prélevé à l'admission aux urgences avant RAD, hospitalisation conventionnelle ou admission en réanimation
- Le taux d'admission en réanimation est le plus élevé chez les patients combinant une **charge virale TTV faible** et la présence d'une **virémie SARS-CoV-2** : **HR=12,4** (95% CI 6,0-140)
- Le taux d'admission en réanimation est le plus faible chez les patients combinant une charge virale TTV élevée et l'absence de virémie SARS-CoV-2

Prédiction du risque d'atteinte sévère selon la charge virale TTV et la virémie SARS-CoV-2 à l'admission (2)

Admission aux urgences
durant la 1^{ère} semaine
après le début des symptômes



Admission aux urgences
durant la 2^{ème} semaine
après le début des symptômes



- Intérêt prédictif de cette association de marqueurs retrouvé quel que soit le temps de l'admission par rapport aux début des symptômes

($p=0,006$ à la première semaine and $p=0,003$ à la deuxième semaine)

Conclusions

La charge virale TTV ainsi que la virémie SARS-CoV-2 pourraient représenter des marqueurs intéressants pour :

- **Confirmer le rôle de la réponse immunitaire dans les cas de COVID sévères ;**
- **Identifier les patients à risque d'évolution défavorable ;**
- Cependant, même si la charge virale TTV permet d'estimer l'intensité globale de la réponse immunitaire, les interactions entre de nombreux acteurs de l'immunité impliqués dans la physiopathologie de l'infection SARS-CoV-2 restent à élucider.

Remerciements

**Laboratoire de Virologie / INSERM UMR_S1109 LabEx
TRANSPLANTEX, Faculté de Médecine de Strasbourg**

Floriane Gallais
Ilies Benotmane
Samira Fafi-Kremer

Département des Urgences Médicales
Sabrina Garnier-Kepka

Service des Maladies Infectieuses et Tropicales
Nicolas Lefebvre

Département d'Anesthésie et Réanimation Chirurgicale
Pierre-Olivier Ludes
Olivier Collange

Département de Médecine Intensive-Réanimation
Vincent Castelain
Ferhat Meziani

Département de Néphrologie
Sophie Caillard

