

Affidavit

Je soussignée, Ines Ait Belkacem, déclare par la présente que le travail présenté dans ce manuscrit est mon propre travail, réalisé sous la direction scientifique de Franck Galland et de Fabrice Malergue, dans le respect des principes d'honnêteté, d'intégrité et de responsabilité inhérents à la mission de recherche. Les travaux de recherche et la rédaction de ce manuscrit ont été réalisés dans le respect à la fois de la charte nationale de déontologie des métiers de la recherche et de la charte d'Aix-Marseille Université relative à la lutte contre le plagiat.

Ce travail n'a pas été précédemment soumis en France ou à l'étranger dans une version identique ou similaire à un organisme examinateur.

Fait à Marseille, le 8 février 2022



Cette œuvre est mise à disposition selon les termes de la [Licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Liste de publications et participation aux conférences

Liste des publications¹ réalisées dans le cadre du projet de thèse :

1. Role of the interferons in CD64 and CD169 expressions in whole blood: Relevance in the balance between viral- or bacterial-oriented immune responses
Immunity Inflammation and Disease 2020
Pénélope Bourgoïn, Géraldine Biéché, **Inès Ait Belkacem**, Pierre-Emmanuel Morange, and Fabrice Malergue
10.1002 / iid3.289
2. One-step White Blood Cell Extracellular Staining Method for Flow Cytometry
Bio-protocol 2021
Inès Ait Belkacem[†], Pénélope Bourgoïn[†], Jean Marc Busnel, Franck Galland, and Fabrice Malergue
10.21769/BioProtoc.4135
3. Cell Analysis from Dried Blood Spots: New Opportunities in Immunology, Hematology, and Infectious Diseases
Advanced science 2021
Inès Ait Belkacem, Noushine Mossadegh-keller, Penelope Bourgoïn, Isabelle Arnoux, Marie Loosveld, Pierre-emmanuel Morange, Thibaut Markarian, Pierre Michelet, Jean Marc Busnel, Sandrine Roulland, Franck Galland, and Fabrice Malergue
10.1002/advs.202100323
4. High CD169 monocyte/lymphocyte ratio reflects the immunophenotyping disruption and predicts oxygen need in COVID-19 patients
Pathogens 2021
Antonella Minutolo, Vita Petrone, Marialaura Fanelli, Marco Iannetta, Martina Giudice, **Inès Ait Belkacem**, Marta Zordan, Pietro Vitale, Guido Rasi, Paola Sinibaldi Vallebona, Loredana Sarmati, Massimo Andreoni, Fabrice Malergue, Emanuela Balestrieri, Sandro Grelli, and Claudia Matteucci
10.3390/pathogens10121639
5. CD169 and CD64 could help differentiate bacterial from COVID -19 or other viral infections in the Emergency Department
Cytometry part A 2021
Pénélope Bourgoïn, Thomas Soliveres, Alexandra Barbaresi, Anderson Loundou, **Inès Ait Belkacem**, Isabelle Arnoux, Denis Bernot, Marie Loosveld, Pierre-Emmanuel Morange, Pierre Michelet, Fabrice Malergue, and Thibaut Markarian
10.1002/cyto.a.24314

¹ Cette liste comprend les articles publiés, les articles soumis à publication et les articles en préparation ainsi que les livres, chapitres de livre et/ou toutes formes de valorisation des résultats des travaux propres à la discipline du projet de thèse. La référence aux publications doit suivre les règles standards de bibliographie et doit être conforme à la charte des publications d'AMU. [†]Coauteur.

6. Direct freezing of whole blood enables analysis of leucocyte markers by flow cytometry: a proof-of-concept study
 Future Microbiology 2021
 Pénélope Bourgoïn, **Inès Ait Belkacem**, Isabelle Arnoux, Pierre-Emmanuel Morange, and Fabrice Malergue
 10.2217/fmb-2021-0034
7. A rapid, easy and scalable whole blood monocyte CD169 assay for outpatient screening during diseases outbreaks
 Moïse Michel[†], Fabrice Malergue[†], **Inès Ait Belkacem**, Pénélope Bourgoïn, Pierre-Emmanuel Morange, Isabelle Arnoux, Tewfik Miloud, Matthieu Million, Hervé Tissot-Dupont, Jean-Louis Mege, Jean-Marc Busnel, and Joana Vitte
 SAGE Open Medicine
 Under review
8. Why is COVID-19 more aggressive toward adults than children? Differential activation of monocytes by SARS-CoV-2 spike protein may explain this bias
Ait-Belkacem Ines[†], Cartagena García Celia[†], Millet-Wallisky Ewa, Izquierdo Nicolas, Loosveld Marie, Arnoux Isabelle, Morange Pierre-Emmanuel, Galland Franck, Lambert Natalie, Malergue Fabrice, and Busnel Jean-Marc
 Scientific reports
 Under review
9. Early monocytic CD4 and HLA-DR decrease predicts COVID-19 pneumonia severity
 Jérôme Allardet-Servent [†], **Ines Ait Belkacem**[†], Tewfik Miloud, Lucas Benarous, Franck Galland, Philippe Halfon, Jean-Louis Mège, Jean-Marc Busnel, and Fabrice Malergue
 Critical care medicine
 Under review

Participation aux conférences² et écoles d'été au cours de la période de thèse :

1. CYTO Congress of the International Society for Advancement of Cytometry (ISAC) 2021 videoconference : Poster « Cell Analysis from Dried Blood Spots: New Opportunities in Immunology, Hematology and Infectious Diseases ».
2. Association Française de Cytométrie (AFC) 2021 videoconference : Poster « Cell Analysis from Dried Blood Spots: New Opportunities in Immunology, Hematology and Infectious Diseases ».
3. Société française d'immunologie (SFI) 2021 Paris : 2 Posters « Why is COVID-19 more aggressive toward adults than children? Pre-existing immune differences, and an unexpected role of the Spike protein may explain the observed bias » et « Cell analysis from dried blood spots: New opportunities in immunology, hematology and infectious diseases ».
4. Congrès de l'école doctorale 2021 videoconference : présentation orale « Research of new flow cytometry methods to address clinical and technical needs for young patients in emergency unit and remote areas ».

² Le terme « conférence » est générique. Il désigne à la fois « conférence », « congrès », « workshop », « colloques », « rencontres nationales et/ou internationales » ... etc.

Résumé

La lutte contre les maladies infectieuses repose sur trois piliers : la prévention (hygiène, gestes barrières, vaccination), la surveillance par des outils diagnostiques, et le traitement. Cette stratégie est mise à mal par la constante évolution des pathogènes et de leur environnement conduisant à l'antibiorésistance des bactéries et à l'émergence de nouveaux virus. Actuellement, le diagnostic des infections n'est pas optimal (délai, coût, performance, accessibilité, inefficacité face aux nouveaux pathogènes). Selon l'OMS, il faudrait pouvoir diagnostiquer toute infection, partout, en quelques minutes, de manière non-invasive et pour un coût modique.

Un début de solution serait un test de triage rapide distinguant la catégorie de pathogène, par exemple virus ou bactérie, afin de restreindre le nombre de tests spécifiques à réaliser et d'orienter la prise en charge comme l'administration d'antibiotiques en cas d'infection bactérienne, ou l'isolation précoce des cas viraux supposés contagieux. La réponse de l'hôte étant différente selon la nature du pathogène, nous avons étudié des biomarqueurs leucocytaires dont l'expression reflète la présence d'une infection bactérienne ou virale. Nous avons aussi identifié certains biomarqueurs associés à la sévérité de l'infection. En parallèle, nous avons optimisé des procédures de cytométrie en flux permettant une analyse au chevet du patient (« Point of care »), ou alors une analyse délocalisée grâce à la préservation du sang par congélation ou séchage à température ambiante. Ces technologies ont ensuite été évaluées dans plusieurs contextes infectieux dont la COVID-19 et pourraient démocratiser le diagnostic d'autres pathologies.

Mots clés

Diagnostic, Biomarqueur, Sang, Infection, Cytométrie, Conservation

Abstract

The fight against infectious diseases is based on three pillars: prevention (hygiene, barrier measures, vaccination), surveillance using diagnostic tools, and treatment. This strategy is challenged by the constant evolution of pathogens and their environment leading to antibiotic resistance of bacteria and the emergence of new viruses. Currently, the diagnosis of infections is not optimal (time, cost, performance, accessibility, inefficiency towards new pathogens). According to the WHO, it is necessary to be able to diagnose any infection, anywhere, in a few minutes, in a non-invasive way and for a modest cost.

One solution would be a rapid triage test distinguishing the category of pathogen, e.g. virus or bacteria, in order to limit the number of specific tests to be performed and to guide management such as the administration of antibiotics in the case of bacterial infection, or the early isolation of viral cases assumed to be contagious. As the host response is different according to the nature of the pathogen, we studied leukocyte biomarkers whose expression reflects the presence of a bacterial or viral infection. We also identified some biomarkers associated with the severity of the infection. In parallel, we have optimized flow cytometry procedures allowing for point-of-care (POC) analysis or delocalized analysis by freezing or drying blood at room temperature. These technologies were then evaluated in several infectious contexts including COVID-19 and could democratize the diagnosis of other pathologies.

Keywords

Diagnosis, Biomarker, Blood, Infection, Cytometry, Preservation

Liste des abréviations

- ACE2. Angiotensin-converting enzyme 2, récepteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2
- ADCC. Antibody-dependent cellular cytotoxicity, Cytotoxicité cellulaire dépendant des anticorps
- ADN. Acide désoxyribonucléique
- AngIpt. , protéine analogue à l'angiopoïétine
- ApoE. apolipoprotéine
- ARN. Acide ribonucléique
- AUC. Area under the curve, aire sous la courbe
- CD. Cluster de différenciation
- CMH. complexe majeur d'histocompatibilité
- COVID-19. maladie à coronavirus de 2019
- CRP. protéine C réactive
- DAMPs. motifs moléculaires associés au danger ou aux dommages
- DAPI. 4',6-diamidino-2-phenylindole
- DBS. Dried Blood Spots
- DHR. Dihydrorhodamine
- DMSO. diméthylsulfoxyde
- EAF. épithélium associé aux follicules
- EBV. Epstein-Barr virus
- EDTA. acide éthylènediaminetétraacétique
- ERO. espèces réactives de l'oxygène
- ERV. entérocoques résistants à la vancomycine
- ESR. erythrocyte sedimentation rate, taux de sédimentation des érythrocytes
- FcR. Recepteur du Fragment cristallisable
- FRA. d'espèces réactives de l'azote
- FSC. forward scatter
- Gal. galectine
- GM-CSF. facteur stimulant les colonies de granulocytes-macrophages
- H₂O₂. peroxyde d'hydrogène
- HClO. acide hypochloreux
- HLA-DR. human leukocyte antigen, antigènes des leucocytes humains
- HNL. Human Neutrophil Lipocalin
- ICAM. Inter-Cellular Adhesion Molecules
- IFN. interféron
- IL. interleukine
- ILCs. Innate Lymphoid Cells
- IOM. Institute of Medicine
- IP-10. Interferon gamma-induced protein 10, CXCL10
- Ipbes. Plateforme intergouvernementale scientifique et politique sur la biodiversité et les services écosystémiques
- IPEX. syndrome d'immunodérégulation, de polyendocrinopathie et d'entéropathie lié au chromosome X

IRF. Interferon regulatory factors
ISG. Interferon-stimulated gene, gènes stimulés par l'interféron
LAMP. l'amplification isothermique à médiation par boucle
LFIA. immuno-essais à flux latéral
LPS. lipopolysaccharides
MAC. Complement Membrane Attack Complex, complexe d'attaque membranaire
MAIT. Mucosal associated invariant T cells
MBL. lectines liant le mannose
mCD169. CD169 sur les monocytes
MPO. myéloperoxidase
MV. mechanical ventilation
MxA. myxovirus resistance protein A
NADPH. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
nCD64. CD64 sur les neutrophiles
NETs. Neutrophil Extracellular Traps
NFkB. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NK. Natural Killers
NKT. Natural Killer T cells
NO. monoxyde d'azote
NO₃⁻. peroxydrite
NOX-2. NADPH oxydase de type 2
O₂⁻. anion superoxyde
OMS. Organisation mondiale de la santé
ORL, 24, OtoRhinoLaryngology
PAMPs. motifs moléculaires associés aux agents pathogènes
PBMC. Peripheral blood mononuclear cell, cellules mononuclées du sang périphérique
PCR. réaction en chaîne de la polymérase
PCT. procalcitonine
PECAMs. Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecules
PF-4. facteur plaquettaire 4
PI. propidium iodide
PMN. Polymorphonucléaire
PMT. photomultiplicateurs
POCT. Point-of care test
Poly IC. acide polyinosinique
PRR. récepteurs de reconnaissance des motifs
qSOFA. quick Sepsis Related Organ Failure
R-CD169. rapport ou ratio du CD169 monocytes/ lymphocytes
RNI. reactive nitrogen intermediate
ROI. reactive oxygen intermediates
ROS. reactive oxygen species
RPA. recombinase-polymérase
RT-PCR. Reverse transcription polymerase chain reaction
SAA. sérum amyloïde A
SPR. résonance des plasmons de surface
SARS-CoV-2. coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère

SS. Side Scatter

sTie-2. récepteur soluble de l'angioprotéine

sTREM-1. soluble Triggering receptor expressed on myeloid cells 1, récepteur soluble sur les cellules myéloïdes

Td. thymo-dépendant

TDR. tests de diagnostic rapide

Th. T helper, T auxiliaires

Ti. thymo-indépendant

TLR. Toll-like receptor

TNF. Tumor necrosis factor

TP. prothrombine

TRAIL. tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand, TNF-related apoptosis-inducing ligand

TROD. tests d'orientation rapide

VEGF. facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

VIH. virus de l'immunodéficience humaine

VM. Ventilation mécanique

Table des matières

.....	1
Affidavit.....	2
Liste de publications et participation aux conférences	3
Résumé.....	5
Abstract.....	6
Liste des abréviations.....	7
Table des matières.....	10
A. INTRODUCTION	12
1. Les maladies infectieuses chez l'Homme	12
1.1. Les maladies infectieuses au cours du vingtième siècle	13
1.2. Les maladies infectieuses au cours du vingt-et-unième siècle	16
1.3. Besoins actuels pour la prévention et la lutte contre les maladies infectieuses.....	21
1.4. Prise en charge clinique : diagnostic et traitement des maladies infectieuses	24
1.5. Conclusion 1.1	33
2. La réponse immunitaire aux infections chez l'Homme	34
2.1. Spécificités de la réponse immunitaire dirigée contre différents types de pathogènes ..	38
2.2. Les biomarqueurs de l'hôte pour déterminer l'étiologie d'une infection aiguë	48
2.3. Conclusion 1.2	53
3. La cytométrie en flux : technique de choix pour l'analyse des globules blancs.....	54
3.1. Les méthodes de préparation des échantillons sanguins pour la cytométrie en flux	55
3.2. Les méthodes de préservation des échantillons sanguins	58
3.3. Conclusion 1.3	60
B. OBJECTIFS DE LA THESE	61
C. ETUDES ADDITIONNELLES	61
D. RESULTATS	62
1. La procédure de marquage rapide.....	62
2. La méthode des « Dried Blood Spots » pour la préservation du sang total	73
3. Evaluation clinique des procédures mises au point	85
3.1. La détection des infections bactériennes et virales en service d'urgences adultes	85
3.2. Le screening des patients atteints de la COVID-19.....	87
3.3. Le suivi et la stratification des patients atteints de la COVID-19.....	88
4. L'étude des mécanismes d'induction des biomarqueurs d'intérêt	129

5. DISCUSSION	157
1. Caractéristiques de la procédure rapide	157
2. Utilité de la préservation du sang dans les études multicentriques et les zones reculées	159
3. Utilité de la procédure rapide dans le triage des patients	162
4. Utilité de la procédure rapide dans la stratification des patients atteints de COVID-19	167
5. Utilité de la procédure rapide dans l'étude de l'induction des biomarqueurs d'intérêt	171
6. CONCLUSIONS GENERALES	175
Bibliographie.....	176
Remerciements.....	204
Annexe	206

A. INTRODUCTION

1. Les maladies infectieuses chez l'Homme

« ... Et parce qu'il y a certaines créatures minuscules que les yeux ne peuvent voir, qui flottent dans l'air et pénètrent dans l'organisme par la bouche et le nez et causent de graves maladies. »

Varron, 36 av. J.-C. ¹,

Durant l'Antiquité, on pensait que certaines maladies, telles que les fièvres, étaient due aux **miasmes** (du grec ancien μίασμα : « pollution »), une forme de « mauvais air » rempli de particules issues de la matière décomposée ². Acceptée depuis les temps anciens en Europe, en Inde et en Chine, la théorie des miasmes est restée populaire jusqu'au moyen Âge. Ce n'est qu'au 19^e siècle, que cette théorie a été battue par la découverte des « microbes » comme source de ces maladies, ce qui a donné lieu à la **théorie microbienne**. Bien que très controversée à ses débuts, cette théorie a été validée entre 1860 et 1864 par le pionnier de la microbiologie Louis Pasteur, qui démontra par des expériences la relation entre les microbes et ces maladies ³. Cette théorie constitue de nos jours un élément fondamental de la médecine moderne et de la microbiologie clinique.

Aujourd'hui, nous connaissons un large éventail de micro-organismes qui causent des infections, incluant les **bactéries, les virus, les champignons, les parasites et les prions**. Notre environnement contient une infinité de ces organismes, certains sont non nuisibles et vivent en harmonie avec nos cellules, d'autres peuvent causer des **maladies infectieuses** aussi appelées maladies **transmissibles** ou **contagieuses** avec différents niveaux d'agressivités. L'infection survient lorsqu'un organisme réussit à contourner les défenses innées et à coloniser une niche dans l'organisme. Il s'ensuit une "course" biologique dans laquelle l'agent pathogène tente de se répliquer et d'étendre sa niche, tandis que le système immunitaire essaie d'éliminer l'agent pathogène (ou du moins de le confiner). Ce n'est que si la réplication de l'agent pathogène entraîne des dommages cliniques détectables que l'hôte est atteint de "maladie" ⁴. Ces maladies recouvrent un large spectre de pathologies **bénignes** comme le rhume ou l'angine, mais également très **graves** comme le SIDA, les hépatites, le paludisme ou la tuberculose. Elles se transmettent directement par contact d'un sujet porteur de germes à un sujet sain, par l'intermédiaire de supports (air, surface) ou de vecteurs (animaux). Ces pathologies peuvent dans certains cas se transmettre rapidement et à grande échelle causant des épidémies ou des pandémies, les plus grandes de l'histoire sont listées dans la table 1.

Table 1 : Principales épidémies et pandémies de l'histoire. Tiré de ⁵.

Année(s)	Nom	Nombre de morts (en millions)	Micro-organisme
165-180	Peste antonine	5	Virus de la variole
541-542	Peste de Justinien	30 à 50	Bacille de la peste
735-737	Épidémie de variole de 735-737 au Japon	1	Virus de la variole
1347-1351	Peste noire	75 à 200	Bacille de la peste
1520	Épidémie européenne de variole	56	Virus de la variole
Années 1600	Pestes du XVII ^e siècle	3	Bacille de la peste
1817-1923	Pandémies de choléra	1	Vibrion cholérique
1855-1920	3 ^e pandémie de peste	12	Bacille de la peste
1889-1890	Grippe russe	1	H3N8 - Grippe A
1918-1919	Grippe espagnole	50 à 100	H1N1 - Grippe A
1957-1958	Grippe asiatique	1,1	H2N2 - Grippe A
1968-1970	Grippe de 1968 (ou de Hong Kong)	1	H3N2 - Grippe A
Depuis 1981	SIDA	25 à 35	VIH
Depuis 2019	COVID-19	5,4	SARS-CoV-2

1.1. Les maladies infectieuses au cours du vingtième siècle

Jusqu'au début du vingtième siècle, les maladies infectieuses, en particulier **la tuberculose, les pneumonies et les maladies diarrhéiques**, étaient la principale cause de décès ⁶. Dans les années 1990, la morbidité et la mortalité dues aux maladies infectieuses se sont considérablement améliorées dans une grande partie du monde développé grâce à une série de facteurs qui diminuaient la sensibilité de l'hôte et réduisaient la transmission des maladies : **une meilleure nutrition et un meilleur logement, des aliments et une eau plus sûre, ainsi qu'une meilleure hygiène et un meilleur assainissement** ⁷.

La mise au point du premier **vaccin** contre la rage par Louis Pasteur en 1885 et la découverte de la pénicilline comme **antibiotique** par Alexander Fleming en 1929 ont généré l'espoir de pouvoir enfin combattre efficacement ces maladies en ouvrant la voie au développement de nombreux traitements.

« Il y a 25 ans, bien rares étaient les microbes dont on pouvait délivrer le corps humain, et il y en a encore quelques-uns qui nous donnent du fil à retordre... Mais ils seront battus avant l'an 2000 ! »

Alexander Fleming, 1929

Les décès dus à des maladies infectieuses avaient diminué, en France on enregistra une **chute** spectaculaire de la mortalité liée à la **tuberculose**, de 50 000 décès annuels dans les années 1930 à moins d'un millier aujourd'hui ⁸. L'influence de la vaccination a également été frappante sur la **poliomyélite paralytique**, aux Etats Unis le nombre de cas enregistré est passé de 57 879 en 1952 à 72 en 1965 ⁹. La **variole**, ayant causé 56 millions de morts, a également été un triomphe de la vaccination et l'une des plus grandes réussites de la santé publique. Elle a été déclarée éradiquée en 1980, grâce à une combinaison de campagnes de vaccination massive dès 1958 et d'une « stratégie de surveillance et d'endiguement » mise en œuvre à partir de 1967. Entre 1900 et 1980, la mortalité due aux maladies infectieuses est passée de 797 à 36 pour

100 000 aux Etats Unis ¹⁰. A la fin du vingtième siècle, dans la plupart des pays développés, la mortalité due aux maladies infectieuses avait été remplacée par la mortalité due aux maladies chroniques telles que les maladies cardiaques, le cancer et les accidents vasculaires cérébraux. Entre 1900 et 1997, la durée de vie moyenne avait augmenté d'environ 60% pour atteindre plus de 76 ans. L'évolution de l'espérance de vie en France entre 1900 et 1994 est représentée sur la **figure 1** où l'on peut voir sa constante amélioration, hormis les effets des deux guerres mondiales.

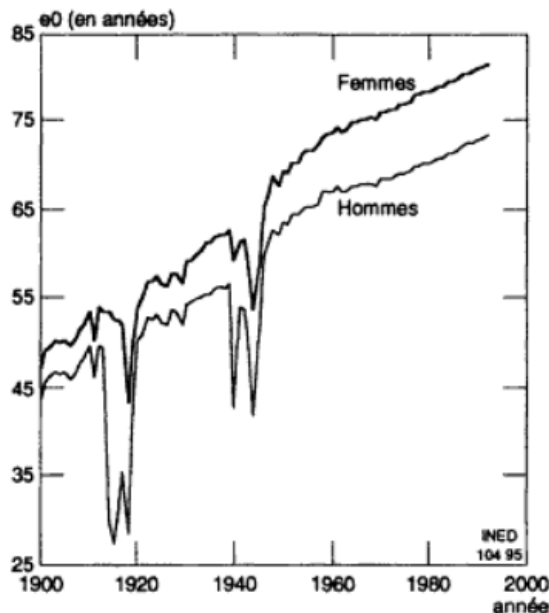


Figure 1 : Evolution de l'espérance de vie en France entre 1900 et 1994. Tiré de ¹¹.

La victoire étant déclarée, l'accent a été mis sur les maladies non infectieuses telles que le cancer et les maladies cardiaques. Souvent, la **recherche sur les maladies infectieuses** ou les activités relatives à leur **prévention** et à leur **contrôle** ont été dépréciées et les ressources ont été **réduites ou supprimées**. Dans une grande partie du monde développé, le public avait oublié l'impact des maladies infectieuses sur les générations précédentes et était convaincu que la médecine et la technologie modernes allaient l'emporter. En France, l'optimisme était même tel que, dans les années 1970, l'Assistance Publique Hôpitaux de Paris songeait à supprimer les lits en service d'infectiologie. En 1983, le plus grand laboratoire pharmaceutique français fermait même, de son côté, un département qui se focalisait sur les médicaments antiviraux ⁸.

Dans les années 80, cet optimisme a été ébranlé par une série d'épidémies et de flambées **d'infections nouvelles, réémergentes et résistantes aux antimicrobiens**. Ces maladies, qui se manifestent à la fois dans les pays en développement et dans les pays développés, montrent que l'on ignore encore beaucoup de choses sur les maladies infectieuses. A la fin du siècle, nous avons aussi découvert une nouvelle catégorie d'agents infectieux, les prions, responsables de la crise de la vache folle. Les causes de mortalité en France entre 1950 et 1991 sont représentées en figure 2.

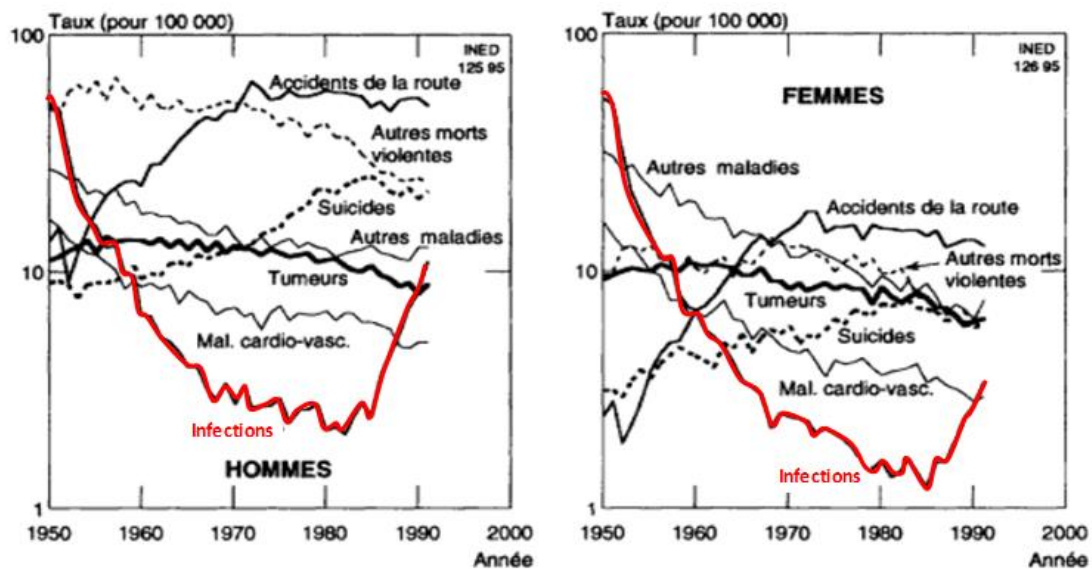


Figure 2 : Causes de mortalité en France entre 1950 et 1991 chez les jeunes entre 15 et 29 ans. Le profil de mortalité à 30-59 ans étant similaire à celui-ci. Tiré de ¹¹.

En 1998, l'Organisation mondiale de la santé estimait que les maladies infectieuses étaient à l'origine de plus de 13 millions de décès - soit près d'un quart des 54 millions de décès dans le monde ¹². De nouveaux agents infectieux, tels que le virus Ebola ou Marburg, étaient susceptibles de se propager rapidement à l'échelle internationale. Des maladies telles que le choléra, la tuberculose, la dengue, la fièvre jaune et le paludisme, qui avaient été contrôlées dans de nombreuses régions du monde, réapparaissaient. Parmi les causes de mortalité les plus courantes figuraient les trois maladies qui avaient été si fréquentes dans le monde développé au début du XXe siècle : les **pneumonies** (3,5 millions), les maladies **diarrhéiques** (2,2 millions) et la **tuberculose** (1,5 million). Les autres causes infectieuses importantes de décès étaient le **SIDA** (2,3 millions), le **paludisme** (1,1 million) et la **rougeole** (1,0 million). Bon nombre de ces décès, en particulier ceux dus aux pneumonies et aux maladies diarrhéiques, sont survenus chez de jeunes enfants.

La **résistance aux agents antimicrobiens** devenait un grave problème mondial même dans les pays développés où la mortalité due aux maladies infectieuses était en augmentation. Aux États-Unis, de 1981 à 1995, cette augmentation s'est faite à un taux de 4,8 % par an, passant de 36 à 63 décès pour 100 000 habitants ¹².

« Le public demandera [des antibiotiques et] ... alors commencera ... une ère d'usage abusif. Les micro-organismes seront éduqués à résister à la pénicilline ... [et dans ces cas] les personnes qui contracteront une septicémie ou une pneumonie ne seront plus sauvées par la pénicilline. Dans ces cas, le personnel qui se sera amusé avec ce traitement à la pénicilline sera responsable moralement de la mort de ces hommes qui succomberont à leur infection par des micro-organismes résistants à la pénicilline ».

Alexander Fleming, 1943

En 1992, l'Institute of Medicine (IOM), reconnaissant ces tendances, a publié un rapport intitulé « Emerging Infections : Microbial Threats to Health in the United States » ¹³. Ce rapport définissait une **infection émergente** comme une « **infection nouvelle, réémergente ou résistante** aux médicaments dont l'incidence a augmenté au cours des deux dernières décennies, ou dont l'incidence menace d'augmenter ». Le rapport examine cette émergence,

identifie les facteurs qui l'influencent et propose des approches pour résoudre le problème. Le rapport de l'IOM a identifié six facteurs qui influencent l'émergence des maladies infectieuses : changements démographiques et comportementaux, changements technologiques et industriels, changements environnementaux et utilisation des sols, voyages et commerce internationaux, adaptation et changements microbiens, échec des mesures de santé publique. Nombre de ces facteurs augmentent la susceptibilité des populations aux maladies infectieuses ou accroissent l'exposition aux agents infectieux ou leur transmission. L'émergence est souvent la conséquence de **changements sociétaux et technologiques** et est fréquemment **inattendue** et **imprévisible**. Dans la plupart des cas, l'émergence d'un agent spécifique résulte d'une **interaction complexe de plusieurs facteurs** qui peuvent varier même selon la zone géographique ⁷.

Par exemple, les entérocoques résistants à la vancomycine (ERV) sont apparus dans les hôpitaux des États-Unis en raison de l'utilisation d'antibiotiques combinée à des pratiques inadéquates de contrôle des infections et à une augmentation simultanée du nombre de personnes sensibles dans les unités de soins intensifs. En Europe, l'émergence des ERV pourrait également avoir été influencée par les utilisations agricoles de l'avoparcine, un antibiotique glycopeptidique utilisé comme promoteur de croissance animale.

Le thème récurrent de tous ces facteurs qui influencent l'émergence des maladies infectieuses est le changement. Au cours du vingtième siècle, d'énormes changements sociétaux et technologiques se sont produits, et il est probable qu'ils se poursuivent ou s'accroissent au cours du vingt-et-unième siècle. Il est utile d'examiner comment ces changements ont influencé l'émergence des maladies infectieuses afin de pouvoir anticiper certains des défis du nouveau siècle ⁷.

"Ceux qui ne se souviennent pas du passé sont condamnés à le répéter".

George Santayana

1.2. Les maladies infectieuses au cours du vingt-et-unième siècle

La situation dans le monde et les pays à faible revenu

De nos jours, malgré un siècle d'efforts de prévention et de contrôle souvent couronnés de succès, les maladies infectieuses restent un problème de santé publique mondial important causant plusieurs millions de décès chaque année. L'évolution de la société, de la technologie et des micro-organismes eux-mêmes contribuent à l'émergence de nouvelles maladies, à la réémergence de maladies autrefois contrôlées et au développement de la résistance aux antibiotiques. Le **contrôle efficace** des maladies infectieuses au cours du nouveau millénaire nécessitera des infrastructures de santé publique efficaces, capables de les **reconnaître** et d'y **répondre rapidement**, et de **prévenir** les problèmes émergents.

Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), en 2019, les **infections des voies respiratoires inférieures, certaines affections transmissibles néonatales ainsi que les maladies diarrhéiques** continuent de faire partie des 10 principales causes de mortalité dans le monde (figure 3). Néanmoins, les maladies infectieuses ont reculé entre 2000 et 2019. Au niveau mondial, certaines maladies infectieuses ne figurent même plus sur la liste du top 10

comme le SIDA, causé par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), dont les décès ont diminué de 51 % au cours des 20 dernières années ¹⁴.

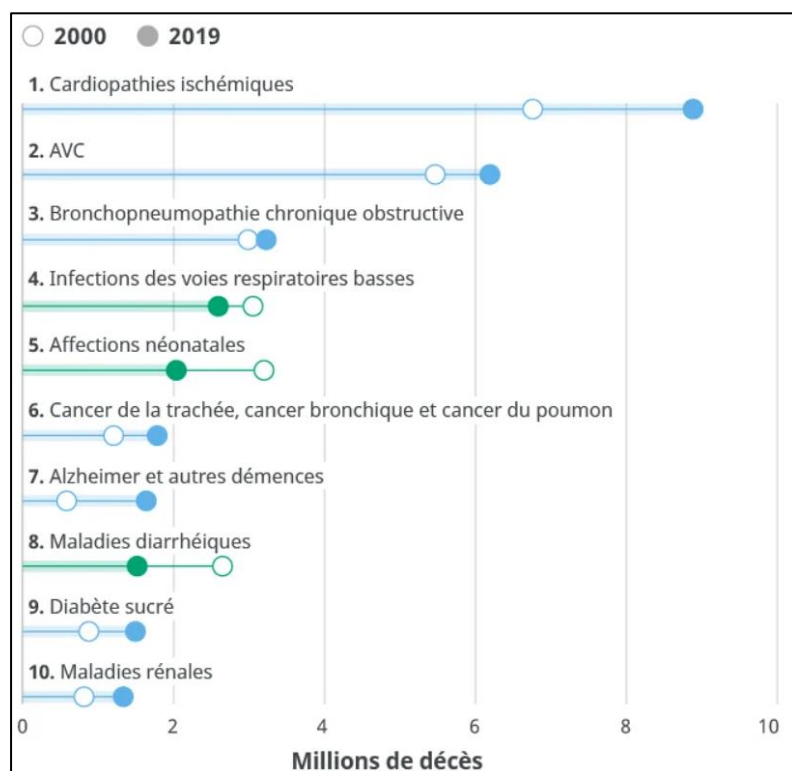


Figure 3 : Les principales cause de mortalité dans le monde en 2000 (rond blanc) et 2019 (rond plein). Les maladies infectieuses sont représentées en vert et les maladies non-infectieuses sont représentées en bleu. Tiré de ¹⁴.

Cependant, dans les pays à **faible revenu**, six des 10 principales causes de mortalité sont des maladies transmissibles. Le **paludisme, la tuberculose et le SIDA** continuent de compter parmi les 10 principales causes de mortalité, bien qu'ils reculent considérablement. Le SIDA avait coûté la vie à 395 000 personnes en 2000 versus 161 000 en 2019, ce qui représente une chute de 59%. Les maladies **diarrhéiques** se placent au cinquième rang des principales causes de décès dans les pays à faible revenu. Elles sont néanmoins en recul et représentent le deuxième déclin le plus important enregistré parmi les 10 principales causes de mortalité (avec 231 000 décès de moins) ¹⁴.

Plus récemment, à travers le monde, l'apparition de nouveaux agents infectieux tels que le coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère (**SARS-CoV-2**) tendent à faire remonter la mortalité due aux maladies infectieuses tout en haut du classement. En effet, en l'espace de deux ans, on dénombre plus de 300 millions de contaminations et plus de 5,4 millions de morts officiellement recensés à la date du 6 janvier 2022 ¹⁵. Dans de nombreux pays, la maladie à coronavirus de 2019 (COVID-19) est désormais l'une des principales causes de décès. Et pourtant, les experts affirment que le véritable bilan de la pandémie est probablement beaucoup plus lourd ¹⁶.

Les difficultés liées à la résistance aux antibiotiques

L'émergence de la **résistance aux antimicrobiens** s'est considérablement aggravée à l'aube du XXI^e siècle, même dans les pays développés. La combinaison d'une pression sélective accrue, due à une utilisation excessive et à une prescription inappropriée d'antibiotiques, à une utilisation agricole extensive, et à un déclin dans le développement de nouveaux antibiotiques, a fait naître un spectre d'infections autrefois traitables qui deviennent impossibles à traiter¹⁷. Le pipeline actuel de l'antibiorésistance est représenté en figure 4.

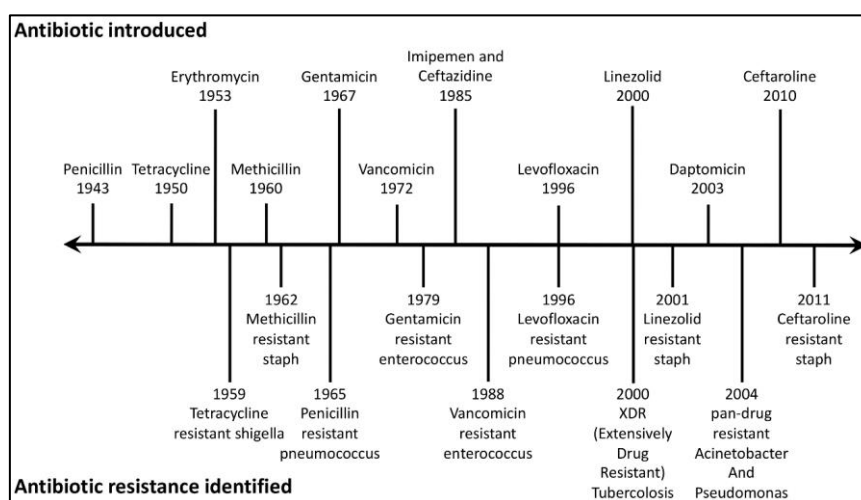


Figure 4 : L'apparition de l'antibiorésistance « Antibiotic Resistance Identified » au cours du temps succédant à la mise sur le marché de la molécule d'antibiotique correspondant « Antibiotic Introduced ». Tiré de¹⁸.

Une liste exhaustive des **bactéries résistantes aux antimicrobiens** a été publiée par l'OMS sur la fiche d'information du 27 février 2017. Les agents pathogènes sont classés comme critiques, élevés et moyens, et cette classification est basée sur la mortalité, le niveau de résistance et la possibilité de traitement. La situation est très critique dans les infections causées par **l'ESKAPEE** : *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp.*, et *Escherichia coli*. *Mycobacterium tuberculosis*, l'agent responsable de la **tuberculose**, qui a été ajouté à cette liste, est considéré comme une priorité de santé mondiale. Elles peuvent provoquer des infections graves et mortelles telles que des infections systémiques et des pneumonies^{18,19}.

Ces bactéries sont **résistantes** à de nombreux antibiotiques du pipeline actuel, y compris les **carbapénèmes et les céphalosporines** de troisième génération - les antibiotiques les plus efficaces pour traiter les bactéries multirésistantes. Cette résistance est associée à une mortalité élevée en raison de l'absence de nouveaux antimicrobiens dans le pipeline²⁰.

Actuellement, les bactéries multirésistantes sont à l'origine d'environ 25 000 décès en Europe chaque année et représentent un fardeau économique d'environ 1,5 milliard d'euros par an. Aux États-Unis, le scénario est similaire, les bactéries multirésistantes causant la mort de 23 000 personnes sur les 2 millions de personnes infectées chaque année. Pour cette raison, l'OMS considère la résistance aux antibiotiques comme l'une des plus importantes menaces pour la santé publique au XXI^e siècle, avec le changement climatique, les maladies non-transmissibles (diabète, cancer et maladies cardiaques), les pandémies de grippe, et les régions fragiles à faibles ressources (famine, guerres, difficulté d'accès au soin)²⁰⁻²³.

L'Union européenne a reconnu la crise imminente de la résistance aux antibiotiques et a établi des méthodes de **surveillance de l'utilisation des antibiotiques** et de la résistance il y a plus de 20 ans. L'utilisation d'antibiotiques est rapportée en tant que dose journalière de médicament pour 1000 habitants par jour selon les registres des pharmacies, et les données sur la résistance sont rapportées par des laboratoires sentinelles utilisant des méthodes standard. Un exemple de l'utilisation des données de l'union européenne est la France, qui présentait des taux élevés de *Streptococcus pneumoniae* multirésistants en 2002 et avait également le taux d'utilisation d'antibiotiques le plus élevé de l'Union européenne (36,5 doses/1000 habitants). Cela a conduit à un ambitieux programme national qui a permis une diminution de 26 % des prescriptions d'antibiotiques à l'échelle nationale pendant la période d'étude ²⁴⁻²⁶. Néanmoins, la réduction de l'usage des antibiotiques n'est pas suffisante, et celle-ci est souvent faite au détriment du confort du patient qui n'est plus systématiquement traité dès les premiers symptômes.

Les difficultés liées au diagnostic

L'antibiorésistance est le résultat d'une utilisation des antibiotiques excessive, mal contrôlée ou même inutile depuis leur introduction dans les pays industrialisés il y a plus de 80 ans. Un **meilleur diagnostic** permettrait une prescription plus sage des antibiotiques et pourrait participer à contrer l'antibiorésistance. Cette politique a été soutenue par les premiers tests diagnostiques rapides tels que Strepto-test qui permet au médecin de ville de confirmer la présence du *Streptococcus A*, l'agent le plus souvent responsable des angines bactériennes, en seulement 10 minutes. Il permet de ne traiter que les patients infectés par cette bactérie et d'éviter de prescrire des antibiotiques aux patients négatifs au test (8 cas sur 10). Malheureusement, malgré la mise à disposition de ce test depuis plusieurs années au sein des cabinets médicaux, les autorités sanitaires notent une faible adhésion des médecins généralistes à la réalisation de ce test. Selon l'Assurance maladie, moins d'un médecin généraliste sur 2 (40 %) en a commandé en 2017 malgré leur gratuité. Depuis 2016, ce test est donc également disponible en pharmacie, sans ordonnance, pour 6 à 7 euros. Le taux de remboursement est fixé depuis 2020 à 70 % par l'Assurance maladie et le reste peut être pris en charge par les complémentaires santé ²⁷.

En 2016, le département américain de la santé (NIH : « National Institutes of Health ») reconnaissant la nécessité de l'amélioration des diagnostics des infections a organisé un concours dans lequel une récompense de 20 millions de dollars a été mise à disposition pour « *la mise au point de tests de diagnostic de laboratoire nouveaux, innovants et inédits qui identifient et caractérisent les bactéries résistantes aux antibiotiques et/ou font la **distinction entre les infections virales et bactériennes** afin de réduire les utilisations inutiles d'antibiotiques, une cause majeure de résistance aux antibiotiques* ». Grâce à la détection en temps réel, les prestataires de soins de santé seraient en mesure d'identifier les agents pathogènes infectants et les facteurs de résistance en quelques heures, plutôt qu'en quelques jours, et d'utiliser ces connaissances pour adapter le traitement à chaque individu. Le gagnant, annoncé en 2020, est le **test rapide gonorrhée** pour la détection visuelle des antigènes de *Neisseria gonorrhoeae*, dans l'échantillon sécrétoire du système urogénital. La gonorrhée est l'une des infections sexuellement transmissibles les plus fréquemment observées, qui représentent une crise de santé publique majeure dans le monde et aux États-Unis. Plus de 580 000 cas de gonorrhée ont été signalés aux États-Unis en 2018, soit une augmentation de 63 % par rapport à 2014 ²⁸. Les résultats du test sont sans ambiguïté et peuvent être lus en **10 à 20 minutes**. Le kit de test est **facile** à utiliser et ne nécessite pas de lavage ni de comparaison avec des normes. Néanmoins, ce test étant spécifique de la Gonorrhée, il ne répond pas au besoin de

triage des patients à grande échelle, pour toutes les maladies, ou au moins les plus communes. En ce sens, on peut considérer que le résultat de ce concours a été un peu **décevant**, et qu'il n'existe à ce jour pas de technique répondant à ces besoins.

Les difficultés liées à la vaccination

Même si la **vaccination** a largement démontré son rôle central dans l'éradication de plusieurs pathogènes, l'**efficacité** de certains vaccins reste imparfaite, on enregistre par exemple 70 à 80% d'efficacité contre la tuberculose, la dengue, le paludisme et le typhus et moins de 70% contre le cholera²⁹⁻³³. De plus, le développement et la mise sur le marché de nouveaux vaccins peuvent s'avérer longs. Par exemple, cela fait 40 ans que d'intenses recherches sont menées afin de mettre au point un vaccin efficace contre le VIH. Même si plusieurs vaccins candidats semblent prometteurs, aucun n'a prouvé à ce jour une protection ou une efficacité suffisante³⁴. A l'inverse, le développement des vaccins contre le SARS-CoV-2 a été réalisé en un temps record (moins d'un an pour les premiers) et ils ont montré de grandes performances. Cependant, la protection apportée par ces vaccins semble diminuer rapidement (96 % dans les 2 premiers mois après la vaccination à 84 % dans les 4 à 7 mois pour le vaccin Pfizer)^{35,36}. Aussi, une étude Israélienne a rapporté sur la base d'une analyse des statistiques sanitaires nationales du pays que l'efficacité du vaccin était de 90 % contre la maladie grave et de 39 % seulement contre l'infection³⁷. Cette étude et plus largement l'épidémie de la COVID-19 ont mis en lumière l'importance de distinguer l'efficacité d'un vaccin à réduire l'infection des individus et la transmission du virus, de l'efficacité à réduire la sévérité des symptômes et la mortalité. Par ailleurs, l'émergence de multiples **variants de virus** peut poser de sérieux problèmes, comme nous avons pu le voir avec certains variants de la grippe saisonnière ou du SARS-CoV-2. Par exemple, l'efficacité vaccinale de deux doses de vaccin à ARNm pour prévenir l'admission à l'hôpital pour la COVID-19 était de 85 % dans la période alpha, de 85 % dans la période delta et de 65 % dans la période omicron. L'efficacité du vaccin pour trois doses de vaccin à ARNm au cours de la période omicron était de 86 %, ce qui était similaire à l'efficacité de deux doses au cours des périodes alpha et delta³⁸. D'autres difficultés liées à la vaccination sont rencontrées, par exemple, certains vaccins contre la COVID-19 tels que Sinovac, AstraZeneca ou le Novovax semblent présenter, bien que rares, des **effets secondaires** notables³⁹⁻⁴¹.

En somme, l'homme a subi pendant des millénaires des infections de toutes natures et à tout âge, de façon chronique ou épidémique. Au vingtième siècle, l'homme a pris sa revanche grâce à l'amélioration des conditions de vie, ainsi qu'au développement de la vaccination et de l'antibiothérapie. Après ce court répit, nous avons découvert que les bactéries développent des résistances aux antibiotiques, que de nouveaux virus émergent, de même que de nouvelles entités infectieuses, tandis que la prévention se relâche parfois, au sein de sociétés toujours plus peuplées, mobiles, vivant dans un environnement parfois dégradé. Ainsi, l'homme doit continuer à faire face à ces problématiques, lui aussi évoluer ... et **établir de nouvelles stratégies pour améliorer la lutte** contre les maladies infectieuses.

1.3. Besoins actuels pour la prévention et la lutte contre les maladies infectieuses

« À moins que l'approche globale de la lutte contre les maladies infectieuses ne soit modifiée, des pandémies futures vont apparaître plus souvent, se propageront plus rapidement, causeront plus de dommages à l'économie mondiale et tueront plus de personnes que la COVID-19 ».

La Plateforme intergouvernementale scientifique et politique sur la biodiversité et les services écosystémiques (Ipbes) dans « ère des pandémies » 2020

Ce rapport, citant près de 700 articles de recherche, conclut que les activités humaines à l'origine du changement climatique (agriculture intensive, artificialisation des sols, mondialisation des échanges commerciaux...) favorisent la diffusion des agents pathogènes pour l'homme : « on estime à 1,7 million le nombre de virus non découverts actuellement présents dans les mammifères et les oiseaux, dont 827.000 pourraient avoir la capacité d'infecter les êtres humains »⁴².

Comme les conditions favorisant l'émergence des maladies infectieuses vont probablement persister au XXI^e siècle, il est nécessaire de développer des stratégies flexibles pour détecter et répondre rapidement à ces problèmes. Plusieurs organisations sanitaires nationales et internationales ont élaboré des plans pour faire face aux maladies infectieuses émergentes.

L'un de ces plans, élaboré par les « Centers for Disease Control and Prevention », identifie quatre stratégies majeures⁴³ :

- **Améliorer la surveillance et la réponse,**
- **Encourager la recherche scientifique appliquée,**
- Renforcer l'infrastructure de la santé publique et offrir des possibilités de formation,
- Elaborer, mettre en œuvre et évaluer des stratégies de prévention et de contrôle.

Le plan d'action mondial l'OMS propose également des stratégies, pour tenter, d'ici 2030, de mettre fin aux épidémies infectieuses. Ces stratégies s'appuient sur un ensemble de documents d'orientation fondés sur des bases factuelles et destinés à aider les pays à concevoir et à mettre en œuvre leurs propres plans⁴⁴. Elles soulignent les possibilités de maximiser l'impact des services de prévention, de traitement et de soins et d'atténuer les répercussions des problèmes biologiques, comme la résistance aux médicaments et aux insecticides, et des changements climatiques. La stratégie implique de :

- Mettre en place de solides systèmes de financement de la santé,
- Constituer une main-d'œuvre qualifiée,
- Améliorer la qualité des traitements,
- **Améliorer les outils de diagnostic et de prévention.**

En 2003, le Programme spécial de recherche et de formation sur les maladies tropicales de l'Organisation mondiale de la santé a publié une série de critères pour le **test idéal** pouvant être utilisé à tous les niveaux du système de santé dans les pays en développement pour **guider les décisions de traitement et de gestion clinique** des maladies infectieuses tropicales et des infections sexuellement transmissibles. Ces critères, connus sous l'acronyme **ASSURED**, sont désormais largement acceptés comme la référence pour un test idéal pouvant être utilisé **auprès du patient** (« **Point-of care test : POCT** »). Il inclut les critères suivants: (1) abordable, (2) sensible, (3) spécifique, (4) utilisation facile, (5) rapide et robuste, (6) sans équipement et (7) livrable aux utilisateurs finaux⁴⁵.

Plus tard, en 2016, un groupe de travail incluant des experts de l'Organisation mondiale de la santé et de Médecins sans Frontières a publié le **profil de produit cible** (PPC) d'un **test de triage** (bactérien versus viral) afin de guider les chercheurs et les développeurs de diagnostics ⁴⁶ (figure 5 et 6).

Characteristic	Acceptable ("must have")	Desired ("would like")
Goal	Rapid, biomarker-based testing to differentiate between bacterial and non-bacterial infections to guide antimicrobial treatment. ^a	
Target population	Children with non-severe, non-malarial acute fever presenting at health facilities. ^{b,c,d}	Total febrile population (including neonates) presenting with fever. ^{b,c,d}
Target level of health system	Level 1, passive case finding	Level 0
Target user	Healthcare worker	Trained lay person
Price of individual test (Ex works)	5 USD ^e	<1 USD ^e
Analytical sensitivity/Limit of detection	Limit of detection should be such that it allows clinically relevant performance as defined below	
Diagnostic sensitivity to differentiate between bacterial and non-bacterial infections	≥90%	≥95%
Diagnostic specificity to differentiate between bacterial and non-bacterial infections	≥80%	≥90%
^a Biomarker: nucleic acid, proteins or any other analytes that is found to be able to differentiate between bacterial and non-bacterial infections ^b Non-severe: definition according to IMCI guidelines[34] ^c Acute fever: less than 14 days ^d Fever: >37.5°C at presentation or within last 48h ^e Ex works as defined by Incoterms 2010 standards		

Figure 5 : Caractéristiques du test de triage définies par le consensus des experts. Tiré de ⁴⁶.

Dans l'idéal, la tranche d'âge cible d'un nouveau test devrait inclure tous les âges, y compris les **nouveau-nés**. Le test devrait être accessible aux environnements à ressources limitées et de ce fait avoir un **cout relativement bas**, entre 1 et 5 dollars, et ne nécessiter qu'une **formation minimale** du personnel de soin. Une **bonne sensibilité (90 à 95%)** permettant la détection précoce des patients nécessitant un traitement antibiotique est important pour une efficacité optimale des traitements. Inversement, pour réduire la surconsommation d'antibiotiques, une **bonne spécificité (80 à 90%)** est nécessaire pour limiter les faux-positifs.

D'un point de vue technique, le test devra permettre la détection de **plusieurs pathogènes** en simultané, avec le moins **d'étapes de préparation** possible. Le **sang capillaire**, la salive et l'urine ont été considérés comme des d'échantillons acceptables. L'obtention de l'échantillon sanguin chez les nourrissons et les petits enfants peut être difficile, de ce fait, les volumes de sang devraient être limités à **25 à 100µL**. Il a été convenu que le test idéal devrait permettre une utilisation **auprès du patient** et dans le temps imparti à une consultation clinique (**10 minutes**), tandis que le délai maximal acceptable pour obtenir un résultat serait de deux heures. Par conséquent, un temps de manipulation de moins de 5 minutes a été défini comme acceptable et de moins d'une minute comme idéale. Par ailleurs, les **conditions** de traitement, de transport et de stockage du test devront être le plus accessibles possible (**température et humidité ambiantes**) (figure 6).

Enfin, le groupe de travail a précisé que cet outil « au lit du patient » permettant le tri des patients en fonction de l'étiologies de l'infection ne constituera que le début d'une investigation diagnostique et ne pourra bien-entendu pas se faire au détriment de tests identifiant spécifiquement le pathogène. Dans l'idéal ces tests seront également complétés par des tests permettant de **prédire la gravité de la maladie** afin de fournir les soins adaptés le plus précocement possible ⁴⁶. En tant qu'équipe de recherche dédiée au développement de tests diagnostiques, ces notions nous ont accompagné tout le long de ce travail de thèse.

Characteristic	Acceptable ("must have")	Desired ("would like")
Multiplexing	≥1 analyte	≥1 analyte plus pathogen specific testing (priority: malaria)
Ease of test performance	≤2 timed steps during assay performance	No timed step during the assay performance
Sample type	Capillary blood or urine	Capillary blood or any less invasive sample than blood, like: Saliva
Volume	- Capillary blood: - patients > 6 years[41] - 100µL (~ 4 drops); - pediatric patients 2–6 years[41]– 50–100µL (~2 drops); - Saliva: < 0.5mL - Urine: ~1mL of urine	- Capillary blood: 25µL (~1 drop) for all age groups - Saliva: <0.5mL for saliva
Sample collection	Transfer and quantification device included in the test	
Additional sample preparation	1 sample-processing steps	None required
Kit configuration	No additional reagents outside of the kit required (including gloves)	
Process control	Internal control to provide test validity and acceptance	
Batch/Quality control	Positive and negative controls required to monitor the quality of kit	
Reagent preparation	- Minimal of one additional step to prepare prior to use - No (precise) measuring required.	No additional reagents required, everything is provided ready-to-use
Time to result (per sample)	<2 hours	<10min
Hands on time	Total hands-on-time should be <5 min	Total hands on time should be <1 min
Sample throughput	Ability to test individual samples or multiple samples if needed (no need for batching)	
Result stability	≥15 min	≥1 hour
Assay type	Qualitative	Quantitative
Biosafety	No need for a biosafety cabinet; basic safety procedures need to be followed	
Waste disposal	Biohazard waste	- Testing device - Compostable plastics for minimal environmental impact
Storage conditions and Self-life	- 12 month at fluctuating temperature (0–40°C) - ≤90% relative humidity - No controlled temperature required	- 24 month at fluctuating temperature (0–50°C) - ≤90% relative humidity - No controlled temperature required
Operation conditions	- Between 5°C—40°C - ≤90% humidity	- Between 5°C—45°C - ≤90% humidity
Shipping conditions	Shipping without cold chain; should tolerate stress during transport (≤72h at +50°C)	
Training requirements^a	<2 days including proficiency panel	<0.5 day including proficiency panel
Equipment (instrument external to test)	Small, robust, dust-resistant, portable or hand-held integrated instrument that must operate on battery	Reusable instrumentation not required
Power supply	Battery or solar powered	None required
Water supply	No external water required	
External maintenance	- Preventative maintenance at 2 year or >4000 samples; simple with only minimal expertise - Maintenance alert should be included.	None required
Calibration	Remote calibration or auto-calibration	No calibration required
Data output	Qualitative	Non-ambiguous results displayed (e.g. bacterial/non-bacterial–yes or no)
Data interpretation^b	Minimal interpretation required	No interpretation required
Connectivity	Not required	Wireless connectivity
Reproducibility	>95% standard deviation between repeats	

^a Training to use the test, not including clinical/treatment implications and consequences.

^b Interpretation of the test result, not the clinical/treatment consequence

Figure 6 : Caractéristiques du test de triage définies par le consensus des experts (suite). Tiré de ⁴⁶.

1.4. Prise en charge clinique : diagnostic et traitement des maladies infectieuses

La fièvre, désignant une température corporelle supérieure à 38°C le matin et 38,3°C le soir, est le symptôme le plus courant d'une infection ⁴⁷. La pathologie peut également s'accompagner des manifestations suivantes : Frissons, sueurs, toux, mal de gorge, crachats, congestion nasale, dyspnée, essoufflement, détresse respiratoire aiguë, diarrhées, vomissements, douleurs abdominales, dysfonctionnements hépatiques, ulcères, raideur de la nuque, céphalées, méningites, lésions, rougeurs, brûlures mictionnelles, insuffisance rénale aiguë, augmentation de la quantité d'urine, pertes ou irritations vaginales inhabituelles ⁴⁸.

Certaines de ces manifestations peuvent se développer en **sepsis**, une **dysfonction d'organe** menaçant le **pronostic vital** et causé par une **réponse inappropriée** de l'hôte à une infection ⁴⁹. La mortalité hospitalière du sepsis est estimée autour de 10%, justifiant d'une prise en charge adaptée rapide. Au niveau pratique : il s'agit d'une augmentation du score SOFA (Sequential Organ Failure Assessment) d'au moins 2 points. Le SOFA basal étant supposé être à zéro en l'absence de dysfonction d'organe, aiguë ou chronique, préexistante. Les paramètres de ce score sont présentés en figure 7.

System	Score				
	0	1	2	3	4
Respiration					
Pao ₂ /Fio ₂ , mm Hg (kPa)	≥400 (53.3)	<400 (53.3)	<300 (40)	<200 (26.7) with respiratory support	<100 (13.3) with respiratory support
Coagulation					
Platelets, ×10 ³ /μL	≥150	<150	<100	<50	<20
Liver					
Bilirubin, mg/dL (μmol/L)	<1.2 (20)	1.2-1.9 (20-32)	2.0-5.9 (33-101)	6.0-11.9 (102-204)	>12.0 (204)
Cardiovascular					
MAP ≥70 mm Hg	MAP <70 mm Hg	Dopamine <5 or dobutamine (any dose) ^b	Dopamine 5.1-15 or epinephrine ≤0.1 or norepinephrine ≤0.1 ^b	Dopamine >15 or epinephrine >0.1 or norepinephrine >0.1 ^b	
Central nervous system					
Glasgow Coma Scale score ^c	15	13-14	10-12	6-9	<6
Renal					
Creatinine, mg/dL (μmol/L)	<1.2 (110)	1.2-1.9 (110-170)	2.0-3.4 (171-299)	3.5-4.9 (300-440)	>5.0 (440)
Urine output, mL/d				<500	<200
Abbreviations: Fio ₂ , fraction of inspired oxygen; MAP, mean arterial pressure; Pao ₂ , partial pressure of oxygen.					
^a Adapted from Vincent et al. ²⁷			^b Catecholamine doses are given as μg/kg/min for at least 1 hour.		
^c Glasgow Coma Scale scores range from 3-15; higher score indicates better neurological function.					

Figure 7 : Paramètres du « sequential organ failure assessment score ». Tiré de ^{49,50}.

Le quick SOFA (qSOFA) présente des critères simplifiés et est utilisable hors réanimation. La présence de 2 critères identifie des patients risquant d'avoir un mauvais pronostic et justifiant d'un monitoring accru, et/ou d'un traitement spécifique et/ou de prendre un avis en réanimation. Les critères de ce score sont les suivants : Pression artérielle systolique inférieure ou égale à 100 mm Hg, Fréquence respiratoire supérieure à 22 c/mn, Confusion (échelle de Glasgow inférieure à 15) ^{51,52}.

Le choc septique quant à lui une forme de sepsis ou il y a besoin de drogues vasopressives (Catécholamines) pour maintenir une pression artérielle moyenne PAM ≥ 65 mmHg, et où les lactates sont > 2 mmol/l (18 mg/dl) malgré un remplissage adéquat. L'acide lactique étant le marqueur d'une hypoperfusion périphérique ⁴⁹.

L'investigation clinique et la mise en place de **tests diagnostiques précoces** et **robustes** pour **identifier l'étiologie** d'une infection sont nécessaires pour un traitement et une résolution efficace afin de **prévenir l'évolution en sepsis**. Néanmoins, les données de la littérature rapportent la **complexité de l'orientation diagnostique** pour identifier la cause d'une infection et donc des délais dans la mise en œuvre des traitements spécifiques.

« Malheureusement, les signes des maladies infectieuses sont presque tous les mêmes : fièvre, maux de tête, agitation ou stupeur, éruption. Seuls leur groupement, leur succession, une observation minutieuse ont pu, après de longs tâtonnements, permettre d'établir des tableaux symptomatiques particuliers et les distinguer entre eux »

Charles Nicolle, 1933 – ⁵³.

L'investigation clinique et la démarche diagnostique en cas de fièvre aigue sont résumées dans la figure 8 A, B et C et comprend les quatre étapes suivantes ⁴⁷:

1. Repérer les signes de gravité et/ou les terrains à risque de complication
2. Recherche d'un point d'appel infectieux
3. Si point d'appel évident : orientation étiologique ou symptomatique probabiliste
4. Si absence de point d'appel évident : examens complémentaires et surveillance

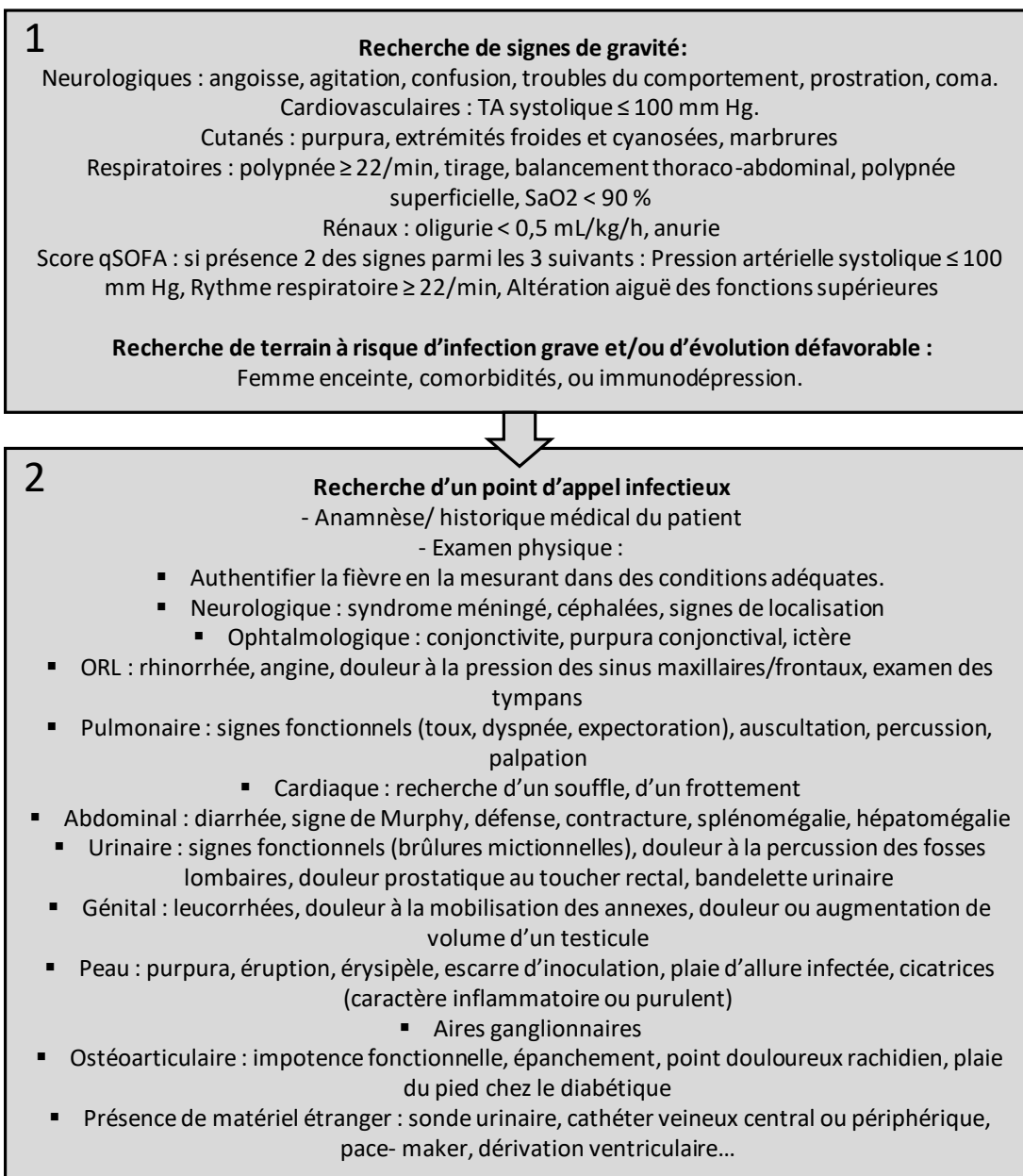


Figure 8 A : Démarche diagnostique en cas de fièvre aiguë. Recherche des signes de gravité et/ou les terrains à risque de complication et mise en évidence d'un point d'appel infectieux. *qSOFA : test rapide de la défaillance organique liée au sepsis « quick Sepsis Related Organ Failure », ORL : OtoRhinoLaryngology.* Adaptée de ⁴⁷.

3 Présence de points d'appel infectieux évidents

Présence de signes de gravité/ terrain à risque : orientation étiologique selon le terrain

Exemples :

Femme enceinte : La pyélonéphrite est recherchée systématiquement surtout au 3ème trimestre. La recherche d'une infection annexielle ou de formes trompeuses d'infections abdominales justifient l'examen gynécologique. La listériose est très rare mais recherchée par les hémocultures devant un tableau pseudo grippal. Les notions de contagé de toxoplasmose ou de rubéole ainsi que la vaccination contre cette dernière maladie sont recherchés.

Sujet âgé : Les pièges sont nombreux. La symptomatologie est souvent atypique, paucisymptomatique, dominée par des manifestations neurologiques (état confusionnel, chute). La fièvre peut être absente. Les urines sont fréquemment colonisées. Les infections pulmonaires, urinaires et digestives dominent chez ces patients.

Antécédents chirurgicaux récents : La recherche d'une infection du site opératoire est systématique.

Diabète : Le diabète, surtout mal équilibré, expose particulièrement aux infections à *Staphylococcus aureus* (rechercher une porte d'entrée cutanée, notamment une plaie de pied) et aux infections du site opératoire.

Immunodépression :

Déficit de l'immunité humorale : hypogammaglobulinémie, splénectomie, asplénisme (myélome, drépanocytose). Les bactéries encapsulées sont particulièrement fréquentes et responsables d'infections sévères (*Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*).

VIH : en-dessous de 200 lymphocytes CD4/mm³ (ou 15 %), une infection opportuniste doit être systématiquement recherchée. Au-dessus de ce seuil, les infections bactériennes, notamment à *Streptococcus pneumoniae*, dominent.

Neutropénie de courte durée : les infections sont liées aux entérobactéries, et aux cocci Gram positif (staphylocoques, streptocoques, entérocoques).

Neutropénie de longue durée : aux agents infectieux cités ci-dessus s'ajoutent *Pseudomonas aeruginosa* et certaines infections fongiques (*Candida*, *Aspergillus*).

Retour d'une zone d'endémie palustre : Toute fièvre au retour des tropiques est un paludisme jusqu'à preuve du contraire et impose la réalisation d'un test diagnostique (frottis/goutte épaisse ou autre).



Traitement étiologique probabiliste

Absence de signes de gravité/ terrain à risque : Traitement adapté selon le point d'appel mis en évidence



Traitement symptomatique ou étiologique probabiliste

Figure 8 B : Prise en charge du patient présentant un point d'appel infectieux évident, en fonction des signes de gravité/ terrains à risque identifiés. L'orientation du traitement du patient est souvent probabiliste (en rouge). *VIH* : *virus de l'immunodéficience humaine*. Adaptée de

47

4 Absence de points d'appel infectieux évidents

Présence de signes de gravité : Examens complémentaires en urgence

- Numération leucocytaire
- Compte de PMN
- Dosage de la CRP
- Dosage de la PCT
- Pour valider la présence d'un micro-organisme suspecté : culture microbiologique /test antigénique/ PCR/ sérologie
- Ionogramme sanguin, urée, créatininémie, bilan hépatique
- TP, fibrinogène, gazométrie artérielle avec lactatémie
- L'imagerie pour évaluer les dégâts tissulaires : radiographie, scanner, échographie



Traitement étiologique **probabiliste** puis **orienté selon bilan**

Absence de signes de gravité : Surveillance et examens complémentaires

- Dans les 3 premiers jours, si le bilan clinique est négatif (ni éléments de gravité ni terrain à risque, ni orientation étiologique), il faut revoir le patient 48 heures plus tard si la fièvre persiste. Il n'y a, en l'absence de foyer infectieux, pas d'indication d'antibiothérapie.
- Chez un enfant, un adolescent ou un adulte jeune, une fièvre isolée bien tolérée traduit le plus souvent une virose isolée (sans infection bactérienne associée). Elle guérit spontanément en moins d'une semaine. En cas de doute, une réévaluation à 48-72 heures sera nécessaire.



Pas de traitement

- Entre J3 et J5, la probabilité d'une virose simple est moins élevée ; si le bilan clinique reste négatif, des examens complémentaires doivent être pratiqués pour orienter le bilan étiologique.
- Dans les formes plus symptomatiques et en l'absence de diagnostic étiologique viral évident, on s'aidera des examens complémentaires de 1^{re} intention.
- En cas de terrain à risque (immunodépression, grossesse, comorbidité), une surveillance rapprochée est le plus souvent nécessaire en hospitalisation. En cas de neutropénie fébrile, une antibiothérapie probabiliste est administrée après réalisation en urgence des prélèvements bactériologiques.



Traitement étiologique **probabiliste** puis **orienté selon bilan**

Figure 8 C : Prise en charge du patient ne présentant pas de point d'appel infectieux évident, en fonction des signes de gravité/ terrains à risque identifiés et éventuellement de tests complémentaires. L'orientation du traitement du patient est souvent probabiliste (en rouge) ou corrigé après les résultats des tests (en orange). Souvent, une virose isolée est suspectée et le patient ne reçoit aucun traitement (en vert). *PMN* : Polymorphonucléaire, *CRP* : protéine C réactive, *PCT* : procalcitonine, *PCR* : réaction en chaîne de la polymérase, *TP* : prothrombine. Adaptée de ⁴⁷.

Cette démarche démontre que le traitement du patient est **souvent probabiliste** (en rouge), sans identification formelle de l'agent responsable, et parfois ajusté après des tests complémentaires. Bien-entendu, la prescription de l'antibiothérapie ne s'effectue pas « à l'aveugle », il s'agit d'une prescription raisonnée prenant en considération tous les éléments disponibles (points d'appel infectieux, signes de gravité, terrains à risque et données épidémiologiques) pour effectuer le meilleur choix possible. Néanmoins, ce choix n'est pas toujours évident.

Par exemple, des points d'appel infectieux similaires peuvent être causés par des pathogènes de différentes étiologies. Dans plusieurs études examinant attentivement la cause de la

pneumonie pédiatrique par rapport aux données cliniques ou épidémiologiques, les signes et les symptômes étaient uniformes entre la pneumonie typique (bactérienne) et la pneumonie atypique (virale ou mycoplasémique).⁵⁴ Il a également été montré que l'identification correcte de la **grippe** est entravée par l'absence de signes ou de symptômes spécifiques, qui peuvent être similaires à ceux causés par d'autres agents infectieux dont certains virus (adénovirus, virus respiratoire syncytial, rhinovirus, parainfluenza) mais aussi certaines bactéries. Cela mène à une faible efficacité du diagnostic clinique de la grippe qui présente une sensibilité inférieure à 40%.^{55,56}

Aussi, les signes et les symptômes de la **pharyngite** à streptocoque A chevauchent avec ceux d'autres causes infectieuses. Dans environ la moitié des cas, les médecins différencient les angines bactériennes des angines virales en se basant uniquement sur les antécédents et les résultats de l'examen physique mais aucun élément des antécédents ou de l'examen physique du patient ne permet de confirmer ou d'exclure de manière fiable une pharyngite à streptocoque A.⁵⁷ Un mal de gorge, une fièvre d'apparition soudaine, une exposition à un streptocoque A au cours des deux semaines précédentes, une lymphadénopathie des ganglions cervicaux ou des exsudats pharyngés ou amygdaliens sont des signes courants et suggèrent une infection à streptocoque A. La toux, la conjonctivite et la diarrhée sont plus fréquents en cas de pharyngite virale (figure 9).

	Facteur	Sensibilité (%)	Spécificité (%)
	Absence de toux	51 to 79	36 to 68
	Ganglions cervicaux antérieurs gonflés ou hypertrophiés	55 to 82	34 to 73
	Maux de tête	48	50 to 80
	Myalgie	49	60
	Pétéchies palatines	7	95
	Exsudats pharyngés	26	88
	Exposition aux streptocoques au cours des deux dernières semaines	19	91
	Température ≥ 100,9° F (38,3° C)	22 to 58	53 to 92
	Exsudats amygdaliens	36	85
	Exsudats amygdaliens ou pharyngés	45	75

Figure 9 : La précision diagnostique des signes et symptômes de l'angine. Adapté de ⁵⁷.

Pour tenter de faire face à la montée de la résistance aux antibiotiques, les systèmes de santé recommandent de limiter la prescription d'antibiotiques lorsque aucun point de gravité ni terrain à risque n'est évident.⁵⁸ Ainsi, l'absence de signe de gravité évident conduit généralement au renvoi du patient à la maison le temps que les symptômes se précisent ou alors à un traitement symptomatique ou étiologique probabiliste si un point d'appel infectieux a été mis en évidence.

Pourtant, l'absence de signe de gravité n'est pas toujours synonyme d'une virose simple car certains signes de gravité ne se voient pas à l'examen physique. Par exemple, lors d'une diarrhée aiguë, le médecin généraliste doit rechercher des signes de déshydratation tels que la bouche sèche ou la langue gonflée, une altération de l'état mental, ou une accélération de la fréquence cardiaque. Un examen abdominal doit être effectué afin de confirmer ou d'exclure un processus abdominal aigu. L'examen rectal est également effectué pour évaluer la présence de sang dans les selles et la consistance des selles.⁵⁹ Néanmoins, il se peut que la diarrhée aiguë ne soit

accompagnée d'aucun de ces signes de gravité visibles mais avec une atteinte hépatique qui passe inaperçue à l'examen physique et ne s'avère présente que lors d'un bilan hépatique. Ainsi, pour compléter l'investigation clinique, les **laboratoires cliniques** centraux proposent en plus des bilans sanguins et urinaires classiques, d'autres tests sensibles et spécifiques, tels que l'hémoculture, les immuno-dosages, la « Polymerase chain reaction » (PCR) et la spectrométrie de masse. Cependant, ces tests ne s'effectuent que dans des laboratoires spécialisés ; ils sont souvent **longs, laborieux, coûteux** et dépendent d'instruments **sophistiqués** et d'opérateurs **bien formés** ⁶⁰⁻⁶³.

Dans ce contexte, il a été proposé que les POCT pourraient améliorer la gestion des maladies infectieuses, en particulier dans les situations où les ressources sont limitées, où l'infrastructure des soins de santé est faible et où l'accès à des soins médicaux de qualité et en temps opportun est un défi. Mais même sans aller si loin, ils seraient extrêmement utiles dans tous les pays car la prise en charge des maladies infectieuses présente encore une marge de progression considérable, que ce soit en période de routine ou de crise épidémique.

En général, les POCT proposés pour les maladies infectieuses peuvent être classés en deux catégories : les **tests spécifiques** d'identification d'un agent pathogène ou les **biomarqueurs de la réponse** de l'hôte. Le nombre de tests disponibles a augmenté de façon exponentielle, notamment en raison de la forte demande dans les milieux à ressources limitées où les infrastructures de laboratoire font défaut.

Les **POCT spécifiques** détectent une variété de biomarqueurs spécifiques à un pathogène donné, notamment les **particules virales, les acides nucléiques, les protéines et les anticorps** ⁶⁴ (figure 10). Ces tests peuvent être effectués dans un laboratoire biologique (tests de diagnostic rapide : TDR), en pharmacie ou dans un cabinet médical (tests d'orientation rapide (TROD), ou même à la maison (autotests).

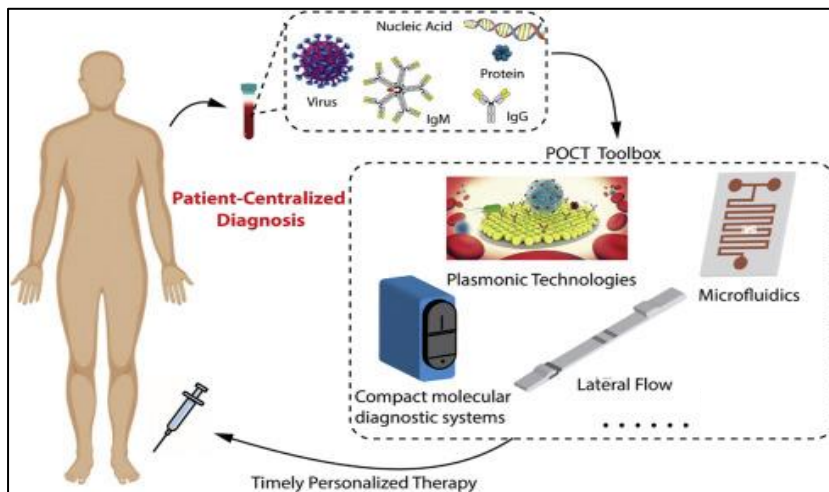


Figure 10 : Les POCT tels que les systèmes de diagnostic moléculaire compacts, les tests à flux latéral, et la microfluidique détectent une variété de biomarqueurs liés aux maladies infectieuses, notamment les particules virales, les acides nucléiques, les protéines et les anticorps. Ils servent de base au diagnostic et au traitement personnalisé des maladies infectieuses. Adapté de ⁶⁴.

Les POCT spécifiques peuvent se présenter sous plusieurs formats :

- **Les immuno-essais à flux latéral (LFIA)** : détectent un **antigène** infectieux via la double liaison en sandwich à des anticorps couplés à un tag et à des anticorps adsorbés sur une surface.

Ce format est le POCT le plus commun et existe pour la détection de divers pathogènes tels que le virus de la grippe A et B, *Streptococcus A* et le SARS-CoV-2. Ces tests se réalisent en 15 minutes et ne requièrent pas d'instrument, ils sont disponibles sur le marché pour 0,78 à 5\$ par test et sont de plus en plus utilisés en clinique.⁶⁵

- **La résonance des plasmons de surface (SPR)** : détecte la liaison d'un **antigène** infectieux à un récepteur adsorbé à la surface d'une couche métallique sensible aux changements des propriétés diélectriques à l'interface entre la couche métallique et la lumière.

Des tests ont été mis au point pour la détection de pathogènes tels que *M. tuberculosis*, le VIH, le virus de l'Ebola, et le virus Zika mais ils ne sont pas disponibles pour une utilisation en routine clinique.

- **Les systèmes de diagnostic moléculaire compacts** : détecte l'ADN ou l'ARN d'un agent infectieux par **PCR** ou par d'autres méthodes d'amplification isothermique telles que l'amplification par recombinaison-polymérase (**RPA**) et l'amplification isothermique à médiation par boucle (**LAMP**).

Différents systèmes de diagnostic moléculaire rapides sont disponibles. Ils sont dotés de petits analyseurs automatiques fonctionnant avec une simple alimentation électrique, mais aucun n'est actuellement utilisé en routine clinique. En voilà quelques exemples :

- Binx IO est le premier test de diagnostic rapide basé sur la PCR pour détecter les infections sexuellement transmissibles telles que la chlamydia et la gonorrhée en 30 minutes⁶⁶.
- ID Now System d'Abbott Diagnostics est un autre test rapide basé sur la LAMP qui fournit des résultats en moins de 15 minutes pour le COVID-19, le virus respiratoire syncytial, le *Streptococcus A* et les gripes A et B.⁶⁷
- Le système cobas® Liat® de Roche permet de cibler le SARS-CoV-2, la grippe A et B, le, *Streptococcus A* ou *C. difficile*. La détection se fait par PCR en 20 minutes.^{68,69}
- Revogene est un dispositif de PCR en temps réel basé sur une cartouche microfluidique qui peut tester le SARS-CoV-2, *C. difficile*, *Streptococcus A* et fournir des résultats en 42 à 85 minutes.⁷⁰
- Alethia est une plateforme de diagnostic basée sur la LAMP qui peut être utilisée pour le *C. difficile*, *Streptococcus A*, le virus de l'herpès simplex, le Mycoplasma, la coqueluche et le cytomégalovirus, le résultat est obtenu en moins d'une heure.⁷¹
- Certains fabricants proposent aussi des tests de **multiplexage** entièrement automatisé permettant d'identifier plusieurs pathogènes à la fois tel que le système BIOFIRE® FILMARRAY® de Biomérieux offrant une large gamme de panels comme le panel respiratoire détectant simultanément plus de 20 pathogènes en une heure pour une centaine de dollars par test.⁷²

Aujourd'hui, certains de ces tests satisfont (ou presque) aux critères ASSURED. Il s'agit de tests pour le VIH, le paludisme, la syphilis et la tuberculose^{73,74} (figure 11).

Test parameters	HIV	Malaria	Syphilis	CT/NG	POC TB
Diagnostic target	Antibody	Antigen	Antibody	Antigen	DNA and RIF resistance
Test format	Lateral flow ICT	Lateral flow ICT	Lateral flow ICT	Lateral flow ICT with specimen processing	Nucleic acid amplification test
Affordable (US\$)	1.00	0.50–0.75	0.50–1.00	6.00–7.00	10.00
Sensitive (%) ^a	>98		>75	<50	
Specific (%) ^a	>99.8		>92	>98	
User-friendly	3 steps	3 steps	3 steps	6–7 steps	Sample-in, answer-out
Rapid and robust (min)	15–20	15–20	15–20	<60	90
Equipment free	Yes	Yes	Yes	Yes	POC device
Deliverable	Yes	Yes	limited	Used in labs	Only with donor support

Figure 11 : Les POCT qui satisfont (ou presque) aux critères ASSURED en 2019. CT/NG : *Chlamydia trachomatis/ Neisseria gonorrhoeae*. TB : Tuberculose. Tiré de ⁷³.

Le test rapide du VIH est le premier test à remplir les critères ASSURED, suivi de près par les tests rapides du paludisme et de la syphilis et, récemment, par un test quasi-POCT pour la tuberculose. Cependant, ce type de tests n'existe pas encore pour les autres maladies infectieuses. Par ailleurs, étant donné la grande diversité des pathogènes existants, bien que la plupart de ces tests soient abordables, il peut être très lourd de tester l'ensemble des microorganismes suspectés un par un et les tests de multiplexages disponibles sont onéreux et ne couvrent pas l'ensemble des pathogènes existants⁷⁴.

Afin de restreindre le nombre de pathogènes à rechercher à moindre coût, les POCT non spécifiques ont été développés pour permettre un premier **triage rapide selon la catégorie de pathogènes**, un virus ou une bactérie par exemple, en détectant des biomarqueurs de l'hôte. La « C-reactive protein » (**CRP**) et la procalcitonine (**PCT**) sont deux marqueurs sur lesquels reposent la majorité des tests actuellement utilisés. Parmi les autres biomarqueurs, une poignée a été incorporée dans le développement de diagnostics tels que :

- MiniCare HNL de PHILIPS, basé sur la mesure de la Human Neutrophil Lipocalin (HNL)^{75–78}
- Accellix de LEUKO DX, basé sur la mesure du cluster de différenciation 64 (CD64) ou du « Human Leukocyte Antigen – DR isotype » (HLA-DR)^{79–81}
- ImmunoXpert™ de MEMED, basé sur la mesure de la CRP, TRAIL et IP-10^{61,82}
- FebriDx® de MEMED, intégrant deux biomarqueurs, la CRP et MxA^{82–90}

À l'exception de la CRP et la PCT, ces tests ne sont pas utilisés en routine clinique et présentent par ailleurs certaines **limites**. De même que pour la PCT et la CRP, les tests reposant uniquement sur la HNL, le CD64 et le HLA-DR orientent vers une infection bactérienne ou un sepsis mais n'informent que de par leur négativité sur la possibilité d'une infection virale et les co-infections ne peuvent être détectées. La PCT peut s'élever en réponse à des infections fongiques et la CRP peut augmenter en réponse à des processus inflammatoires non infectieux

ou viraux⁹¹⁻⁹⁵. La combinaison de ces deux biomarqueurs a également donné des résultats non concluants comme dans le cas de détection de pneumopathie chez les patients admis en service d'urgence. Leur capacité diagnostique est ainsi régulièrement remise en cause^{96,97}. Ainsi, les performances cliniques de la PCT et de la CRP sont très variables d'une étude à l'autre et les performances cliniques des autres marqueurs ne sont pas encore suffisamment évaluées et aucun n'est aujourd'hui utilisé en routine.⁹⁸

De nos jours, même dans les pays les plus développés, il est fréquent en cas d'infection de se voir prescrire des antibiotiques de manière non appropriée ou à l'inverse de subir une errance de plusieurs jours, le temps que les symptômes se précisent et que des tests de laboratoires soient demandés et retournés. Ce délai dans le diagnostic constitue une souffrance pour le malade, qui doit subir les symptômes pendant plusieurs jours, et pour son entourage (stress, garde d'enfants...etc.) ainsi qu'un risque de complications graves (démarrage tardif du traitement). A l'inverse, la prescription inappropriée d'antibiotiques contribue au développement de l'antibiorésistance et constitue une perte économique conséquente pour les systèmes de santé. Une étude réalisée au royaume uni qui présente une population comparable à celle de la France (plus de 60 millions d'habitants) a estimé le cout annuel direct des prescriptions d'antibiotiques à 28 millions d'euros, au lieu de 5 millions si les prescriptions étaient appropriées⁹⁹. Le cout indirect dû à l'antibiorésistance est quant à lui estimé à 350 millions d'euros. Pour toutes ces raisons, il est dommage de ne pas mettre l'accent sur la généralisation de diagnostics rapides auprès du patient. Il en existe déjà à différents stades de développement, mais très peu sont disponibles pour une utilisation en routine ou sont réservés aux situations critiques.

1.5. Conclusion 1.1

Les maladies infectieuses constituent un problème de santé publique mondial. Au cours de l'histoire, l'évolution de la société, de la technologie et des micro-organismes eux-mêmes ont contribué et continueront encore à contribuer à l'émergence de nouvelles maladies, à la réémergence de maladies autrefois contrôlées et au développement de la résistance aux antibiotiques. La promotion de la **recherche scientifique** et l'amélioration de la **surveillance et des outils diagnostiques** sont des axes fondamentaux de la stratégie de lutte contre les maladies infectieuses. Une surveillance générale optimale nécessite le développement d'un **outil diagnostique robuste** qui permettrait d'orienter rapidement et à grande échelle **l'étiologie de l'infection virale / bactérienne** afin d'isoler plus précocement les cas viraux contagieux, et d'administrer des antibiotiques à bon escient. Cet outil permettrait également d'appliquer en second lieu, de manière ciblée, des tests spécifiques identifiant l'agent pathogène et donnant lieu à une utilisation plus efficace des traitements antibiotiques, à un gain de temps pour le médecin et le patient, mais aussi à un gain économique conséquent pour les systèmes de financement de santé. Le besoin est donc de pouvoir déployer ce genre d'outil de manière **rapide et à grande échelle** impliquant le développement d'un **test rapide simple et pas cher**. La mise au point d'un tel outil passe par une compréhension extensive des mécanismes d'invasion des micro-organismes ainsi que les **spécificités des réponses immunitaires engagées** en fonction du type de pathogène. L'ensemble de ces thématiques constitueront la base des recherches effectuées dans le cadre de la présente thèse.

2. La réponse immunitaire aux infections chez l'Homme

Les cellules immunitaires du sang périphérique (globules blancs ou leucocytes) ainsi que les cellules immunitaires tissulaires constituent un maillon important dans la **protection contre les infections** ¹⁰⁰. Ces cellules sont issues d'un précurseur commun, la cellule souche hématopoïétique pluripotente, située dans la moelle osseuse, capable d'autorenouveau et de différenciation en cellules souches à plus haut niveau de différenciation puis en progéniteurs. Classiquement, les progéniteurs sont classés en deux familles :

- Ceux qui proviennent d'une cellule souche myéloïde et donnent naissance aux granulocytes, aux monocytes/ macrophages, aux cellules dendritiques ;
- Ceux qui proviennent d'une cellule souche lymphoïde et donnent naissance aux lymphocytes T, B et NK (Natural Killers), aux ILCs (Innate Lymphoid Cells), aux NKT (Natural Killer T) et aux MAIT (Mucosal associated invariant T cells).

Plus récemment, un rôle dans l'immunité a été reconnu à des cellules telles que les cellules épithéliales, les cellules endothéliales ou même les plaquettes ¹⁰¹.

Les premiers obstacles rencontrés par un micro-organisme sont la **peau et les muqueuses** intactes. Les agents pathogènes sont empêchés de se fixer sur la peau grâce à la résistance et à l'élimination régulière des couches de kératine qui protègent l'épiderme, mais aussi parce qu'ils doivent entrer en compétition avec des micro-organismes commensaux. Les agents pathogènes ingérés dans l'intestin ou inhalés dans les voies respiratoires sont piégés par le mucus ou succombent aux molécules microbicides des sécrétions corporelles ou au faible pH et aux hydrolases de l'intestin. Cependant, une brèche dans la peau ou les muqueuses peut permettre à un agent pathogène d'accéder aux tissus sous-épithéliaux. La pénétration de la barrière peut également se produire chez les personnes dont le système immunitaire a été compromis par une maladie ou une immunosuppression thérapeutique. Ces défaillances des défenses immunitaires peuvent permettre à des agents pathogènes opportunistes, qui sont normalement inoffensifs pour un individu sain, de provoquer une maladie. En revanche, les agents pathogènes invasifs peuvent pénétrer dans l'organisme même lorsque les défenses de surface sont intactes. Les organismes invasifs qui attaquent les muqueuses y accèdent souvent par les cellules à plis microscopiques (cellules M) de l'épithélium associé aux follicules (EAF) ou en se liant à des molécules de la surface de la cellule hôte qui déclenchent une internalisation médiée par des récepteurs ⁴.

Grace à leur coopération, les cellules immunitaires permettent de repousser ou d'éliminer de nombreux agents étrangers. Il existe deux grandes catégories de cellules d'un point de vue fonctionnel, les leucocytes de **l'immunité innée** et les leucocytes de **l'immunité adaptative** ¹⁰⁰ (figure 12). En plus des **acteurs** de type **cellulaire**, le système immunitaire comprend de nombreuses **molécules solubles** présentes dans la circulation, dans les espaces extra-cellulaires, **ou associées aux membranes**.

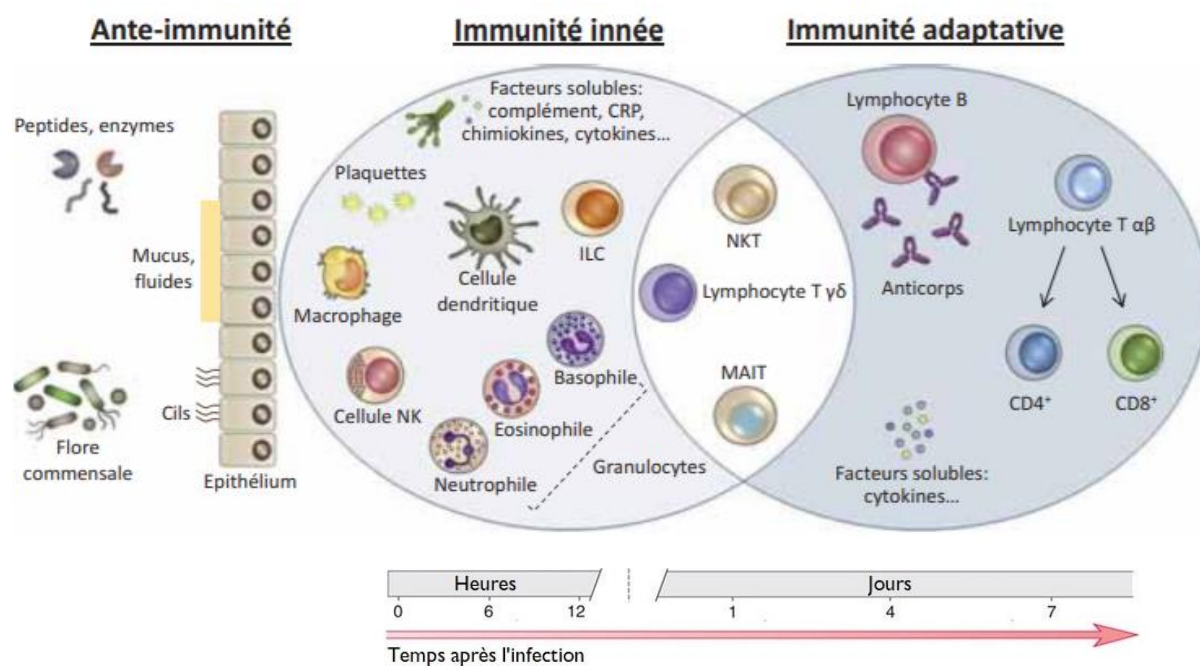


Figure 12 : Acteurs de la réponse immunitaire anti-infectieuse. Adapté de ¹⁰¹.

Dans le site d'attaque du pathogène, les leucocytes locaux (principalement les macrophages, les cellules dendritiques et les mastocytes) sont activés par l'engagement de leurs **récepteurs de reconnaissance de l'immunité innée** qui reconnaissent différents types de signaux associés à une rupture de l'homéostasie de l'organisme et tendent à induire des réponses permettant le retour à l'état normal ¹⁰²⁻¹⁰⁴. Parmi ces signaux de dangers figurent des structures moléculaires partagées par les micro-organismes qui sont absentes des cellules de l'hôte. Ces signaux avaient été initialement appelés motifs moléculaires associés aux agents pathogènes (**PAMPs**), détectés par des récepteurs de reconnaissance des motifs (**PRR**) ¹⁰⁵. Les PAMPs ont ensuite été inclus dans la catégorie plus vaste des motifs moléculaires associés au danger ou aux dommages (**DAMPs**), incluant des molécules du soi induites ou modifiées en réponse à une atteinte à l'intégrité de l'organisme comme lors d'une infection, d'une blessure, d'une agression chimique ou d'un cancer ¹⁰⁶. Lorsqu'un DAMP est reconnu par un récepteur de reconnaissance de l'immunité innée, il en résulte l'activation de programmes de **signalisation** qui exécutent la première ligne de défense de l'hôte nécessaire pour rétablir l'homéostasie de l'organisme.

Les **cellules résidentes** activées par l'engagement de leurs récepteurs de reconnaissance de l'immunité innée sont les premières à sécréter des cytokines pro-inflammatoires comme les **interleukines (IL) -1, -6, -8**, le « **Tumor necrosis factor alpha** » **TNF- α** , et l'**interféron (IFN) - γ** . Le foie répond à ces signaux en produisant des **protéines de phase aiguë** dont la **CRP**, le **sérum amyloïde A (SAA)**, et l'**haptoglobine**, ainsi que des facteurs de **coagulation** et des composants **du complément** jouant un rôle important dans l'opsonisation du pathogène ¹⁰¹.

Les **mastocytes résidents** des tissus activés par l'engagement de leurs récepteurs de reconnaissance de l'immunité innée sécrètent des substances actives comme l'**histamine**, le **TNF- α** et l'**IL-8** qui stimulent les cellules endothéliales (expression de molécules d'adhérence) et provoquent une **vasodilatation** et une **chemo-attraction**. Ce processus

permet de faciliter le recrutement des cellules immunitaires circulantes, en particulier les **neutrophiles et les monocytes**, depuis le sang vers les tissus (**diapédèse**). Cliniquement, cette activation va se traduire par les 4 signes cardinaux de **l'inflammation** : rougeur, chaleur, douleur, tuméfaction (œdème) ^{101,107}.

La première étape de ce recrutement/ migration fait intervenir une **adhérence réversible** aux cellules endothéliales par l'intermédiaire de molécules de la famille des **sélectines** telles que le **CD62L** à la surface des polynucléaires **neutrophiles et des monocytes** interagissant avec les P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) des cellules endothéliales. Ceci induit un ralentissement du flux des leucocytes et initie la phase dite de **roulement** à la surface de l'endothélium activé. Les liaisons avec les protéines d'adhérence ainsi que le contact avec les chimiokines fixées à l'endothélium vont permettre l'activation des **intégrines** de surface du polynucléaire, en particulier la **β 2-intégrine CD11b/CD18**. Les β 2-intégrines se lient aux molécules d'adhérence ICAM (Inter-Cellular Adhesion Molecules) exprimées à la surface des cellules endothéliales. Cette liaison est irréversible et provoque l'arrêt des cellules et leur **immobilisation** sur l'endothélium inflammatoire. Les cellules immobilisées peuvent ensuite traverser la paroi vasculaire vers le foyer inflammatoire (**diapédèse**) (figure 13). Cette diapédèse est active et fait intervenir en particulier la contraction réversible des cellules endothéliales et un grand nombre de molécules d'adhérence, comme les PECAMs (Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecules) ^{101,108,109}.

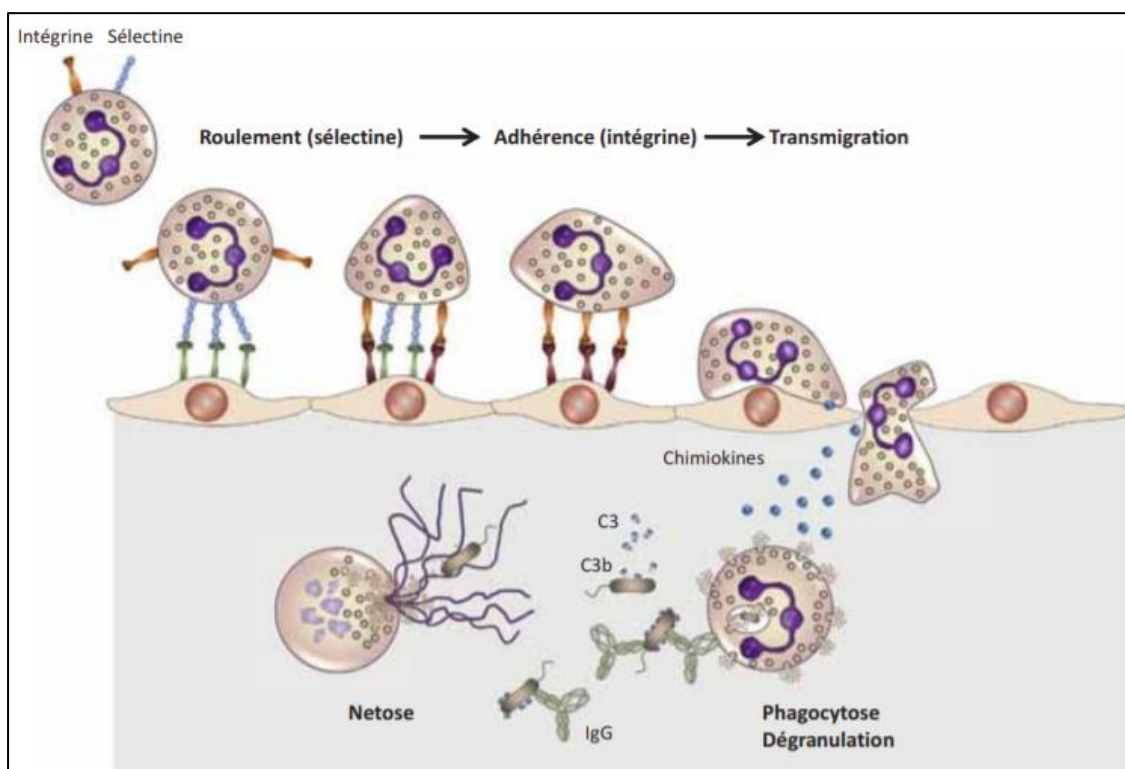


Figure 13 : Principaux mécanismes fonctionnels successifs des polynucléaires neutrophiles conduisant à leur adhérence aux cellules endothéliales, leur transmigration vers la cible puis la destruction de celle-ci par des mécanismes variés et complémentaires incluant l'opsonisation, la phagocytose, la dégranulation, l'explosion oxydative et la NETose. Tiré de ¹⁰¹.

Arrivés au contact de l'agent pathogène, les polynucléaires neutrophiles et les monocytes reconnaissent leur cible via leurs récepteurs de reconnaissance de l'immunité innée activant des facteurs de transcription tels que le **NFkB** et/ou **IRF** (figure 14). La principale conséquence de l'activation de la voie NF-KB est l'expression de **cytokines pro-inflammatoires** et la

modification de la perméabilité vasculaire permettant le **recrutement et l'activation** d'autres effecteurs cellulaires. Les IRF permettent l'expression de médiateurs antimicrobiens tels que les **IFN de type I**, importants pour la réponse anti-virale¹⁰¹. NF-κB serait également requis comme cofacteur, bien qu'il y ait un certain désaccord sur l'importance de cette voie dans la production des IFN de type I¹¹⁰⁻¹¹³.

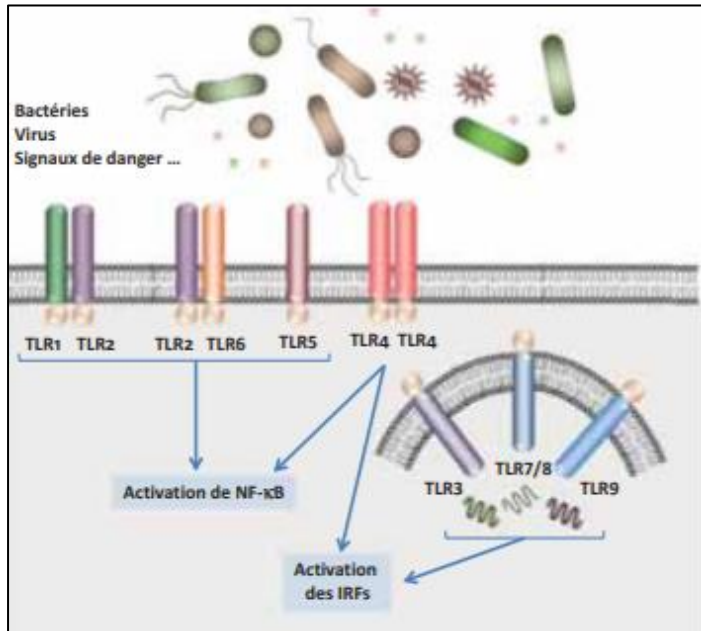


Figure 14 : Principaux PRR membranaires chez l'homme. *TLR* : *Toll-Like receptors*. Tiré de 101.

La reconnaissance et l'adhérence des monocytes et des neutrophiles à la cible sont le plus souvent suivies par l'ingestion de la particule lorsque sa taille le permet (**phagocytose**) accompagnée d'une **explosion oxydative** dans laquelle est produit l'anion superoxyde (O_2^-), composé instable qui permet la production d'espèces réactives de l'oxygène microbicides (ERO) « reactive oxygen intermediates or species (ROI or ROS) » comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou l'acide hypochloreux ($HClO$). Cette production se fait par le système enzymatique de la NADPH oxydase de type 2 (NOX-2). De plus, la NO-synthase inductible, autre enzyme des cellules de l'immunité innée, permet la production d'espèces réactives de l'azote (FRA) « reactive nitrogen intermediate (RNI) » : le monoxyde d'azote (NO), qui combiné à l'anion superoxyde forme du peroxyde d'azote (NO_2^-) également microbicide. Ces ions altèrent la structure des protéines, des lipides et des acides nucléiques, participant ainsi à la destruction des microorganismes infectieux^{4,114} (figure 12).

Les neutrophiles activés peuvent dégranuler rapidement (en quelques secondes) pour déverser des substances bactéricides à l'extérieur de la cellule ou dans le phagosome (figure 12). Les mieux connues sont la **myéloperoxydase (MPO)** qui fabrique des composés **bactéricides**, et les **protéases** comme l'élastase qui dégrade les structures bactériennes. En plus des enzymes, les granulations contiennent d'autres molécules bactéricides non-enzymatiques, des médiateurs de l'inflammation et des cytokines^{4,115}.

La production de Neutrophil Extracellular Traps (**NETs**) est un mécanisme appelé NETose, correspondant à la libération de **filaments d'ADN** issus du noyau ou des mitochondries, recouverts de nombreux composants **microbicides** provenant des granulations ou du cytoplasme (figure 12). Ces NETs constituent des **pièges** physiques pour capter, en particulier, les micro-organismes de grande taille comme les champignons¹¹⁶.

Il est important de noter que produits de façon excessive ou inappropriée dans le milieu extracellulaire, tous les composants microbicides décrits ci-dessus peuvent participer à la survenue de **lésions tissulaires** au site inflammatoire. C'est la raison pour laquelle il est nécessaire qu'une phase de **régulation** de l'inflammation et de **réparation** tissulaire se mette rapidement en place⁴.

Au fur et à mesure que la réponse innée progresse, les **cellules dendritiques** locales qui ont mûri en raison de l'engagement de leurs récepteurs de reconnaissance de l'immunité innée aux composants de l'agent pathogène deviennent compétentes pour **présenter** les peptides antigéniques dérivés de l'agent pathogène aux cellules **T naïves**, déclenchant ainsi la **réponse adaptative**. Cette activation des lymphocytes T et l'activation ultérieure des **lymphocytes B** ont lieu dans les ganglions drainants et les cellules effectrices générées migrent vers des sites effecteurs aux portes de l'organisme pour combattre l'agent pathogène. Une réponse immunitaire systémique suivra rapidement si les cellules dendritiques matures portant des antigènes de pathogènes migrent vers des follicules lymphoïdes, dans le ganglion lymphatique de drainage ou la rate et activent les cellules T et B naïves dans ces endroits^{4,101}.

Selon la nature du micro-organisme causal (virus, bactérie, ou autres), sa localisation (intracellulaire, extracellulaire) et son mode de transmission (entre espèces, entre individus, par voie aérienne, par piqûre), la réponse immunitaire déclenchée sera différente.

2.1. Spécificités de la réponse immunitaire dirigée contre différents types de pathogènes

Spécificités de la réponse immunitaire dirigée contre les bactéries à multiplication extracellulaire

Les bactéries extracellulaires qui tentent d'établir une infection ont tendance à s'accumuler dans les régions interstitielles des tissus conjonctifs, dans les lumières des voies respiratoires, urogénitales et gastro-intestinales, et dans le sang. Ces organismes sécrètent souvent des protéines qui pénètrent ou clivent les composants de l'épithélium de la muqueuse, permettant ainsi l'accès aux tissus sous-jacents. Une grande variété de bactéries extracellulaires pénètre dans les cellules M des EAF, tandis que d'autres exploitent les récepteurs de surface d'autres types de cellules hôtes. De nombreux symptômes de maladies causées par des bactéries extracellulaires peuvent être attribués à leurs toxines. Les **exotoxines** sont des protéines toxiques activement sécrétées par des bactéries à Gram positif ou à Gram négatif. Les **endotoxines** sont des lipopolysaccharides (LPS) incorporées dans les parois des bactéries Gram-négatives. Ce sont des PAMPs ligands du « Toll-Like receptor » (TLR) -4 libérées uniquement lorsque les parois cellulaires des bactéries Gram-négatives sont endommagées⁴.

Des exotoxines et des endotoxines différentes provoquent des maladies par des moyens différents et à des endroits différents. Par exemple, l'infection par *Vibrio cholerae* entraîne la libération locale d'une exotoxine qui se lie aux cellules épithéliales de l'intestin et provoque la diarrhée grave qui caractérise le choléra. *Clostridium botulinum* produit une neuro-exotoxine qui bloque la transmission des impulsions nerveuses aux muscles, entraînant la paralysie caractéristique du botulisme. Le LPS des bactéries Gram-négatives active les **macrophages** et les incite à libérer des **cytokines pro-inflammatoires**, en particulier le **TNF**, l'**IL-1** et l'**IFN- γ** . Des concentrations très élevées de ces cytokines peuvent induire une forte fièvre et un choc endotoxique (septique)^{4,117}. Des exemples de bactéries à développement extracellulaires et les maladies associées sont donnés dans la table 2.

Table 2 : Exemples de bactéries à multiplication extracellulaires et maladies associées. Tiré de ⁴.

Pathogène (ou famille de pathogène)	Maladie (s)
<i>Bacillus anthracis</i>	Anthrax
<i>Borrelia burgdorferi</i>	Maladie de Lyme
<i>Clostridium botulinum</i>	Botulisme
<i>Clostridium tetani</i>	Tétanos
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Diphthérie
<i>Escherichia coli</i>	Colite hémorragique
<i>Helicobacter pylori</i>	Ulcères
<i>Haemophilus influenzae</i>	Méningite bactérienne
<i>Neisseria meningitidis</i>	Méningite bactérienne
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Gonorrhée
<i>Staphylococcus aureus</i>	Intoxication alimentaire, choc toxique, infections des plaies chirurgicales
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Angine, maladie mangeuse de chair
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Pneumonie, otite moyenne
<i>Treponema pallidum</i>	Syphilis
<i>Vibrio cholerae</i>	Choléra
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Diarrhée sévère
<i>Yersinia pestis</i>	Peste bubonique

Les LPS bactériens agissant comme antigènes thymo-indépendant (Ti) activent les **cellules B** qui génèrent des **plasmocytes** produisant des anticorps IgM antibactériens. Les antigènes thymo-dépendant (Td) bactériens activent des cellules B antibactériennes supplémentaires grâce aux cellules T auxiliaires (T helper : **Th**) **2** générant des plasmocytes produisant des anticorps IgM et IgG. Ces **anticorps neutralisants** reconnaissant les composants bactériens bloquent l'accès des bactéries aux récepteurs glycoprotéiques des cellules hôtes ⁴. Les bactéries opsonisées recouvertes d'anticorps sont captées par les récepteurs Fc (**FcR**) **des macrophages et des neutrophiles**, comme le **CD64 des neutrophiles** dont l'expression est induite par l'**IFN-II**.¹¹⁸ Une fois capturées à l'intérieur du phagocyte, les bactéries extracellulaires sont généralement très vulnérables à la destruction par les changements de pH, les **défensines** et les ROI et RNI associés à l'**explosion oxydative**. Les anticorps **antitoxines** neutralisants se lient aux molécules de toxines bactériennes et les empêchent d'endommager les surfaces cellulaires. Les bactéries liées aux anticorps, aux fragments C1 ou C3b du complément, ou aux lectines liant le mannose (MBL), activent le **complément**. L'infection d'un hôte par un agent pathogène qui colonise préférentiellement les muqueuses, comme *S. pneumoniae* ou *Helicobacter pylori*, entraîne souvent la génération de cellules effectrices **Th17** qui jouent un rôle clé dans la clairance bactérienne. Certaines études montrent qu'une cellule muqueuse infectée qui subit une apoptose dans un environnement inflammatoire fournit une combinaison de PAMPs et de DAMPs qui incitent les cellules dendritiques à produire du « Transforming growth factor beta » (**TGF-β**) **et de l'IL-6**. Toute cellule Th0 interagissant avec ces cellules dendritique est alors dirigée vers la différenciation des cellules Th17 ^{4,117,119} (figure 15).

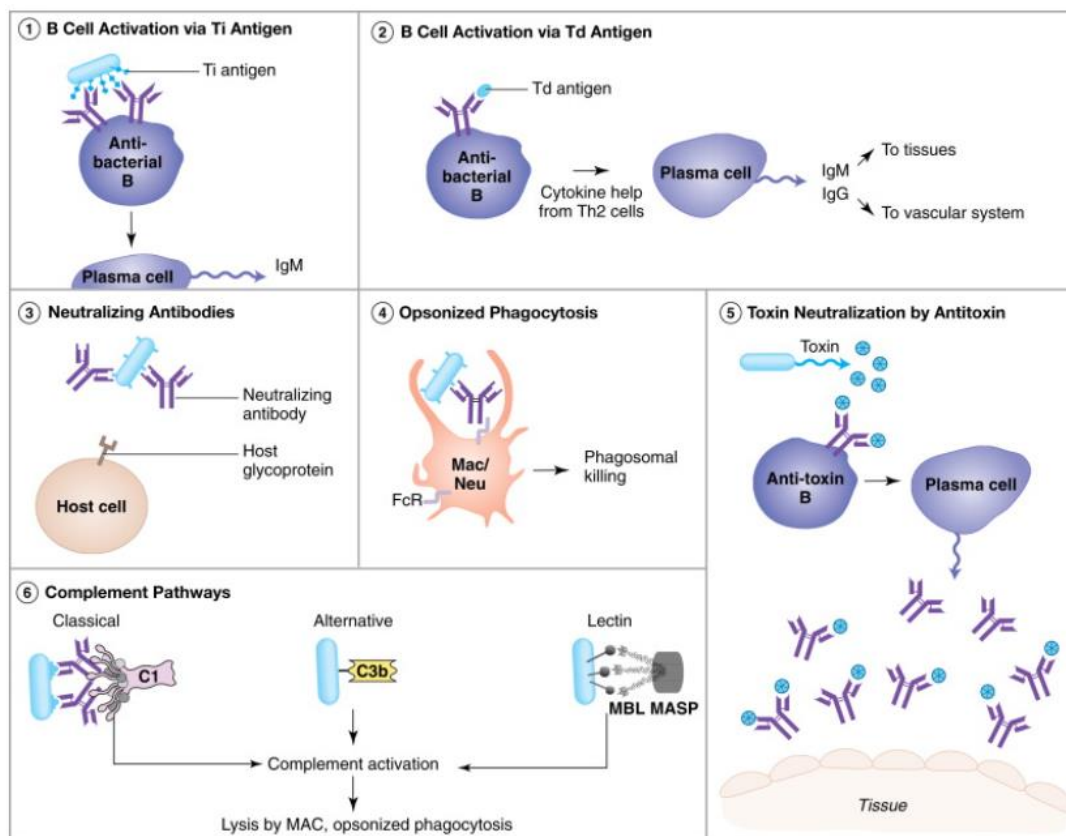


Figure 15 : Principaux mécanismes de défense immunitaire contre les bactéries extracellulaires. *Ti* : thymo-indépendant, *Td* : thymo-dépendant, *Mac* : macrophage, *Neu* : neutrophile, *FcR* : Récepteur du fragment cristallisable, *C1* et *C3b* : fragments du complément, *MBL* : lectine liant le mannose, *MASP* : protéase à sérine associée à *MBL*. Tiré de ⁴.

Spécificités de la réponse immunitaire dirigée contre les bactéries à développement intracellulaire

Comme les bactéries extracellulaires, la plupart des bactéries intracellulaires accèdent à l'hôte par des brèches dans les muqueuses et la peau, mais certaines sont introduites directement dans la circulation sanguine par la piqûre de vecteurs tels que les tiques, les moustiques et les acariens. Une fois à l'intérieur de l'hôte, les bactéries intracellulaires échappent aux phagocytes, au complément et aux anticorps en se déplaçant directement dans les cellules de l'hôte pour se reproduire. Les cellules épithéliales et endothéliales, les hépatocytes et les macrophages sont leurs cibles. Les macrophages étant mobiles, les bactéries qui infectent ces cellules sont rapidement disséminées dans tout l'organisme. Certaines bactéries ont un développement intracellulaire, comme *Mycobacterium tuberculosis* responsable de la tuberculose dont la principale cible est le macrophage. La porte d'entrée de cette bactérie est habituellement le tractus respiratoire. D'autres bactéries à développement intra-cellulaire peuvent entrer via le tube digestif comme *Salmonella typhi* et *Listeria monocytogenes* et ont également pour cible cellulaire les macrophages ⁴. Des exemples de bactéries à développement intracellulaires et les maladies associées sont donnés dans la table 3.

Table 3 : Exemples de bactéries à multiplication intracellulaires et maladies associées. Tiré de 4.

Pathogène (ou famille de pathogène)	Maladie (s)
<i>Bordetella pertussis</i>	Diphtérie (coqueluche)
<i>Brucella melitensis</i>	Fièvres élevées, brucellose
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Maladies oculaires et génitales
<i>Legionella pneumophila</i>	Maladie du légionnaire (Légionellose)
<i>Listeria monocytogenes</i>	Listeriose
<i>Mycobacterium leprae</i>	Lèpre
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tuberculose
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Pneumonie atypique
<i>Rickettsia rickettsii</i>	Fièvre boutonneuse des montagnes Rocheuses
<i>Salmonella typhi</i>	Fièvre typhoïde
<i>Salmonella typhimurium</i>	Intoxication alimentaire
<i>Shigella flexneri</i>	Maladie entérique/ diarrhéique

Les bactéries intracellulaires pénètrent généralement dans les cellules hôtes par **endocytose** médiée par la clathrine et sont donc d'abord confinées dans une vésicule recouverte de clathrine. Certaines espèces restent dans la vésicule, tandis que d'autres s'échappent et s'installent dans le cytoplasme pour se répliquer dans une cellule hôte et la maintenir en vie à cette fin, les bactéries intracellulaires sont généralement peu toxiques et **ne produisent pas de toxines bactériennes** nocives pour les tissus. Cependant, leur mode de vie intracellulaire rend ces organismes difficiles à éradiquer complètement et une **maladie chronique peut en résulter** 4.

Les cellules dendritiques activées secrètent de l'**IL-23** qui induit la différenciation des cellules Th en Th17. L'**IL-17** produit recrute les **neutrophiles** sur le site de l'infection où ils produisent des **défensines**, capturent les bactéries intracellulaires par **phagocytose** lorsqu'elles sont encore dans le milieu extracellulaire, et les tuent par une **explosion oxydative**. L'**IL-17** recrute également les **macrophages** qui sont ensuite activés par l'engagement du **TLR** ou la **phagocytose** des bactéries intracellulaires, et secrètent des **cytokines pro-inflammatoires** (**IFN- γ** , **TNF**, **IL-1**, **IL-12**). Les cellules **NK** activées par l'**IL-12** tuent les cellules hôtes infectées par **cytotoxicité** et secrètent de l'**IFN- γ** .

Les **cellules dendritiques** activées **présentent les peptides** bactériens sur le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II aux cellules T CD4+, qui génèrent des effecteurs **Th1** en présence de l'**IL-12**. Ces cellules **Th1** fournissent de l'**IFN- γ** pour induire l'**hyperactivation des macrophages**. Un macrophage hyperactivé produit de grandes quantités de **ROI** et de **RNI** qui tuent efficacement presque tous les pathogènes intracellulaires. Les cellules **Th1** fournissent également de l'**IL2** pour soutenir l'expansion des cellules T CD8+.

Les **cellules dendritiques** incitent la réponse cytolytique en **présentant les peptides** bactériens sur le CMH I aux cellules T CD8+. Les métabolites bactériens phosphorylés activent les cellules $\gamma\delta$ T qui se différencient en **lymphocytes $\gamma\delta$ T cytolytiques** ou en **$\gamma\delta$ Th1 produisant de l'IFN- γ** . Les lymphocytes cytolytiques éliminent leurs cibles en s'appuyant sur la sécrétion de **TNF** et l'**IFN- γ** ainsi que des enzymes effectrices (**perforines** et **granzymes**). Lorsqu'un agent pathogène intracellulaire comme *Mycobacterium tuberculosis* est capable de résister à la destruction par les lymphocytes T CD8+ et les macrophages hyperactivés, l'organisme tente de le retenir dans une structure cellulaire appelée **granulome** qui se forme autour des macrophages infectés. Les composants bactériens libérés par une cellule infectée mourante activent les **cellules B** qui se différencient en **plasmablastes** produisant des **anticorps neutralisants** qui

interceptent toute bactérie temporairement extracellulaire. Les bactéries liées aux anticorps sont reconnues par les **FcR des macrophages et des neutrophiles**, dont le **CD64**, qui phagocytent et tuent l'agent pathogène^{4,120,121} (figure 16).

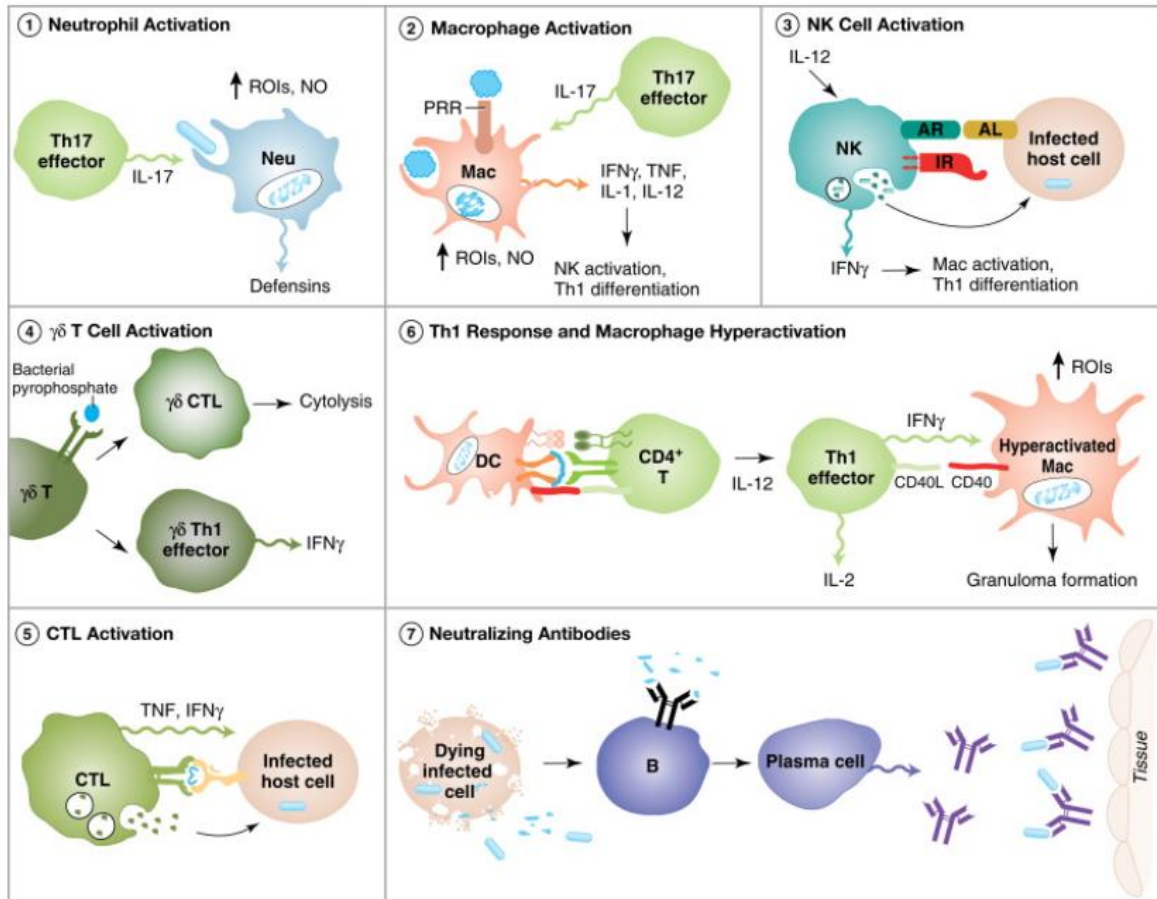


Figure 16 : Principaux mécanismes de défense immunitaire contre les bactéries intracellulaires. AR : récepteur activateur, IR : récepteur inhibiteur, AL : ligand activateur, CTL : lymphocyte T cytolytique, DC : cellule dendritique, Mac : macrophage. Tiré de⁴.

Ainsi, selon la nature de la bactérie, différents mécanismes immunitaires antibactériens sont enclenchés. Les bactéries intracellulaires induisent une réponse qui sera majoritairement cytotoxique médiée par les cellules NK ainsi que les lymphocytes T cytotoxiques activés par les lymphocytes auxiliaires polarisés TH1. Les bactéries extracellulaires quant à elles induisent une réponse humorale prépondérante médiée par les lymphocytes B activés eux-mêmes par les lymphocytes polarisés TH2. Néanmoins, une **réponse immunitaire non spécifique, immédiate et communes aux différents types de bactéries est initiée** pour éliminer l'agent pathogène impliquant l'activation des cellules dendritiques, le recrutement de neutrophiles et de macrophages, l'activation du complément et la production de composés microbicides et de cytokines telles que l'IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL-12, et IL-18. Certaines de ces cytokines induisent l'expression de molécules membranaires telles que les molécules d'adhésion cellulaire ou les Fc récepteurs comme le **CD64** facilitant la destruction des bactéries ou des cellules infectées par phagocytose ou cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps.

Spécificités de la réponse immunitaire dirigée contre les virus

Les virus sont des parasites intra-cellulaires obligatoires qui consistent en un génome d'acide nucléique emballé dans une enveloppe protéique appelée capsid. Le génome viral peut être de l'ADN ou de l'ARN, et la capsid peut ou non être recouverte d'une structure membraneuse appelée enveloppe. La plupart des virus **pénètrent dans une cellule hôte en se liant à un récepteur de la surface de l'hôte**. S'ensuivent la **réplication du génome viral et la synthèse des ARNm viraux**, qui peuvent être effectuées par des enzymes de l'hôte ou du virus, selon le virus. Cependant, tous les virus sont dépourvus de mécanismes de synthèse des protéines et dépendent de la cellule hôte pour la traduction des protéines virales et l'assemblage des progénitures virales. Les virions de la descendance libérés d'une cellule infectée attaquent les cellules hôtes voisines et initient de nouveaux cycles de réplication qui conduisent à une large diffusion du virus. Les virions de la descendance qui atteignent le sang sont libres de se **propager de manière systémique** ⁴. Des exemples de virus et les maladies associées sont donnés dans la table 4.

Table 4 : Exemples de virus et maladies associées. Tiré de ⁴.

Pathogène (ou famille de pathogène)	Maladie (s)
Adénovirus	Infections respiratoires aiguës
Cytomégalovirus (CMV)	Pneumonie, hépatite
Virus Ebola	Fièvre hémorragique
Virus d'Epstein-Barr (EBV)	Mononucléose infectieuse, lymphome de Burkitt
Virus de l'hépatite (HVA, HVB, HVC)	Hépatite, cirrhose, cancer du foie
Herpès simplex (HSV)	Herpès
Virus de l'immunodéficience humaine (VIH)	Syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA)
Virus du papillome humain (HPV)	Verrues cutanées, verrues génitales, cancer du col de l'utérus
Virus de la leucémie humaine à cellules T 1 (HTLV-1)	Leucémies et lymphomes à cellules T
Virus de l'influenza	La "grippe"
Virus de l'herpès du sarcome de Kaposi (KSHV)	Sarcome de Kaposi
Virus de la rougeole (MV)	Rougeole
Poliovirus	Poliomyélite
Virus du polyome	Infections du système respiratoire, des reins, du cerveau
Virus de la rage	Rage
Rhinovirus	Rhume commun
Virus du SARS (syndrome respiratoire aigu sévère)	Syndrome respiratoire aigu sévère
Virus de la vaccine	Asymptomatique chez la plupart des humains en bonne santé, ou éruption cutanée légère et fièvre
Virus varicelle-zona (VZV)	Varicelle, zona
Virus de la variole	Variole
Virus du Nil occidental (VNO)	Syndrome grippal, fatigue, encéphalite

Les virus provoquent des maladies à la fois directement et indirectement. Les virus tuent fréquemment les cellules de l'hôte ou, du moins, les inactivent, privant l'hôte des fonctions normales de ces cellules, de sorte que des symptômes cliniques apparaissent. De même, la **réponse immunitaire à l'infection virale endommage fréquemment les tissus de l'hôte et induit une inflammation, provoquant une maladie immuno-pathique.** Les cliniciens classent les maladies causées par les virus en deux catégories : aiguës et chroniques. Lorsqu'un hôte est initialement infecté par un virus, il est atteint d'une maladie aiguë en ce sens que la maladie peut être légère ou grave (selon le degré de pathogénicité ou de virulence du virus), mais qu'elle n'est que de courte durée. Une réponse immunitaire efficace élimine complètement le virus de l'organisme. Cependant, il arrive que les virus ne soient pas complètement éliminés après l'infection aiguë et restent dans l'organisme pour établir des infections persistantes provoquant des maladies à long terme ou récurrentes qui sont considérées comme des maladies chroniques. Dans certains cas, un hôte ne présentera aucun symptôme de maladie chronique si sa réponse immunitaire à médiation cellulaire est suffisamment efficace pour bloquer l'assemblage de nouvelles particules virales. Toutefois, si la réponse à médiation cellulaire de l'hôte s'affaiblit en raison du vieillissement ou d'une immunosuppression, le virus latent se réactive, se réplique et provoque à nouveau une maladie aiguë ⁴.

Le mode de défense du système immunitaire le plus connu face aux virus est basé sur les IFN. **Les IFN- α/β** sont des IFN de type I sécrétés par les cellules **hôtes infectées** puis par les **cellules dendritiques plasmacytoides** activés par l'interaction de leurs PRR avec les PAMPs viraux. L'**IFN- γ** est sécrété par les **macrophages** et les cellules **NK** activés, puis par les **cellules Th1 activées** ¹²². Ces IFN régulent l'expression des gènes appelés **ISG** (« **IFN stimulated genes** »), comme **MxA/B** et **CD169** (tous deux induits par l'IFN-I) ^{123,124}. Cette reprogrammation transcriptionnelle induit la mise en place d'un **état dit antiviral** à la fois dans les cellules infectées et dans les cellules avoisinantes. L'IFN de type I interfère avec **la réplication virale** en activant l'expression de molécules antivirales. Il induit **la différenciation des cellules dendritiques** et favorise la présentation de l'antigène (**expression du CMH I**) pour stimuler les cellules T et B. Les IFN- I et II activent les cellules **NK** qui détectent les cellules infectées et les détruisent par **cytolyse** directe ou par production de cytokines inflammatoires ¹²².

Le **TNF- α** est une autre cytokine pléiotrope produite par les cellules infectées et les cellules immunitaires innées et adaptatives, y compris les macrophages, les cellules dendritiques, les NK et les lymphocytes T et B après avoir été activés. Cette cytokine peut activer la production de molécules d'adhésion dans les cellules endothéliales et favoriser l'extravasation des neutrophiles, des monocytes et d'autres cellules immunitaires pour les attirer vers les foyers d'infection. Le TNF peut également participer à l'apoptose en activant les caspases. Les **macrophages** activés par leurs PRR et le TNF- α , associé à l'IFN- γ , **phagocytent** et tuent efficacement les virus, et produisent du **NO et des cytokines inflammatoires (IL-1, IL-6, IL-12, TNF)** ¹²⁵.

Les **cellules dendritiques** infectées, ou celles qui ont capturé des virions ou des produits viraux, activent les lymphocytes **T CD4+** qui fournissent l'aide nécessaire à l'activation des lymphocytes **T CD8+** et des lymphocytes **B**. Ces derniers se différencient en **plasmocytes** produisant des anticorps neutralisants ou en cellules **B à mémoire** qui sont généralement indispensables à la résolution complète de l'infection virale. À la fin de la réponse primaire, des **anticorps neutralisants** sont libérés dans la circulation et bloquent la propagation du virus ⁴.

Les **lymphocytes CD8+** tuent les cellules hôtes infectées par le virus par le biais de la destruction par **Fas ou perforine/granzyme** et des cytokines cytotoxiques (**TNF, IFN- γ**). Les anticorps liés à un antigène viral à la surface d'une cellule hôte infectée peuvent engager les

FcR sur une cellule NK, un macrophage ou un neutrophile et déclencher une cytotoxicité cellulaire dépendant des anticorps (**ADCC**) ou une **phagocytose** facilitée par l'opsonisation. Si l'anticorps lié se lie au C1, l'activation classique du complément peut conduire à la destruction de la cellule infectée par le complexe d'attaque membranaire (MAC). Les particules virales liées au C3b libre peuvent se lier au CR1 et être prises en charge par phagocytose opsonisée^{4,126} (figure 17).

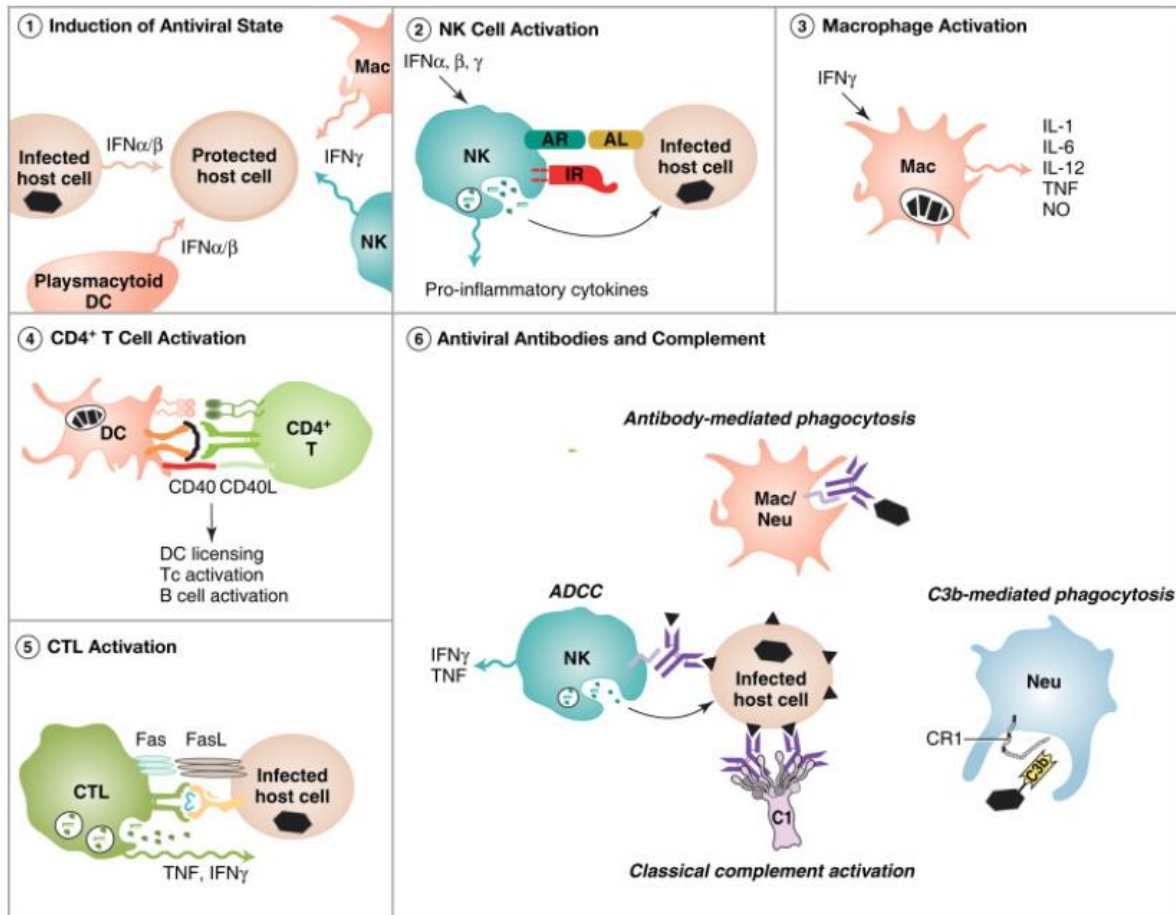


Figure 17 : Principaux mécanismes de défense immunitaire contre les virus. Tiré de ⁴.

A titre d'exemple, la compréhension actuelle du processus physiopathologique du virus SARS-CoV-2 suggère un rôle crucial de la liaison de la protéine Spike des virions CoV-2 du SARS aux récepteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 (**ACE2**) exprimés à la surface des cellules épithéliales et alvéolaires des voies respiratoires¹²⁷. Lors de l'infection, l'hôte déclenche une cascade immunitaire complexe impliquant la production rapide d'**IFN de type I**, suivie d'une stimulation des ISG qui facilitent les réponses immunitaires innées et adaptatives efficaces¹²⁸. Cependant, des schémas immunitaires déréglés ont été observés chez les patients atteints de la forme la plus grave, notamment un processus inflammatoire local prolongé et incontrôlé qui entraîne des lésions alvéolaires et endothéliales et une thrombose¹²⁹⁻¹³⁶. Plusieurs études ont signalé des **dysfonctionnements myéloïdes et lymphoïdes** périphériques, notamment une lymphopénie, un épuisement et une sénescence des lymphocytes T et une augmentation des neutrophiles. L'étendue de ces altérations est **corrélée** à la **sévérité** de la maladie¹³⁷⁻¹⁴².

Ainsi, même si l'ensemble des acteurs immunitaires cellulaires et humoraux sont engagés lors de la réponse anti-infectieuse, certains mécanismes sont majoritaires selon la nature du

pathogène. Par exemple, les **IFN**, jouant un rôle central dans la lutte contre les infections, sont **secrétés précocement** en réponse à une invasion par un pathogène donné (une bactérie ou un virus). Les IFN-I et II sont tous deux nécessaires pour la mise en place d'une réponse **antivirale** efficace mais avec une **large prépondérance des quantités d'IFN-I, produites principalement par les cellules dendritiques plasmacytoïdes**. Lors d'une infection **bactérienne, l'IFN-II**, produit également précocement par les **cellules NK et les macrophages**, a un effet microbicide contre les bactéries intracellulaires et extracellulaires. Cependant, la littérature suggère que l'IFN-I a un effet suppressif sur les macrophages en régulant à la baisse l'expression du récepteur de l'IFN- γ , ce qui les rend moins sensibles à la stimulation par l'IFN- γ . Cette hypothèse est renforcée dans certaines infections bactériennes telles que *mycobacterium tuberculosis*, où la signalisation de l'IFN-I est préjudiciable à l'hôte. Ainsi, il semble qu'une certaine « dichotomie » des IFN existe entre la réponse infectieuse antibactérienne et antivirale avec une prépondérance de l'IFN-I lors des infections virales et une prépondérance de l'IFN-II lors des infections bactériennes.

Spécificités de la réponse immunitaire dirigée contre les parasites

Les différents parasites suscitent différents types de réponses immunitaires, en fonction de la taille et de la cellularité de l'envahisseur et de son cycle de vie. En général, les parasites protozoaires ont tendance à induire des réponses **Th1 où l'IFN- γ** est la cytokine prédominante dans l'activation des neutrophiles et des macrophages. Les infections par des vers helminthes et les ectoparasites sont habituellement traitées par des réponses **Th2 où l'IL-4** joue un rôle prépondérant dans l'élévation des mécanismes immunitaires humoraux et stimule la synthèse des IgE induisant une hyperplasie des mastocytes et des éosinophiles, déclenchant des réactions d'hypersensibilité immédiate et favorisant l'expulsion des parasites de l'intestin ^{125,143}.

Bien que l'IFN- γ soit reconnu depuis longtemps comme un effecteur immunitaire antiparasitaire essentiel, des études récentes soulignent que les **IFN de type I** peuvent être induits en réponse à une infection parasitaire et influencer l'issue de l'infection ^{144,145} (table 5).

Table 5 : Exemples de parasites et maladies associées. Tiré de ⁴.

Exemples de protozoaires parasites et de maladies qu'ils provoquent	
Pathogène (ou famille de pathogène)	Maladie (s)
<i>Entamoeba histolytica</i>	Maladie entérique
<i>Leishmania donovani</i>	Leishmaniose des viscères
<i>Leishmania major</i>	Leishmaniose du visage, des oreilles, de la peau
<i>Plasmodium falciparum</i>	Paludisme
<i>Toxoplasma gondii</i>	Toxoplasmose
<i>Trypanosoma brucei</i>	Maladie du sommeil africaine
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Maladie de Chagas
Exemples de vers helminthes parasites et de maladies qu'ils provoquent	
Pathogène (ou famille de pathogène)	Maladie (s)
<i>Ascaris</i>	Ascariose
<i>Cestode</i>	Ver solitaire
<i>Echinococcus</i>	Echinococcose alvéolaire
<i>Onchocerca</i>	Cécité des rivières africaine
<i>Schistosoma</i>	Schistosomiase
<i>Trichinella</i>	Trichinose
<i>Wuchereria</i>	Elephantiasis

Exemples d'ectoparasites et de maladies qu'ils causent/transmettent		
Pathogène ou vecteur	Rôle dans la maladie	Maladie (s)
<i>Acari (tiques, certains acariens)</i>	Agent pathogène	Dermatite
<i>Acari (tiques, certains acariens)</i>	Vecteur	Maladie de Lyme
<i>Cimicidae (punaises de lit)</i>	Pathogène	Éruptions cutanées
<i>Demodex (acariens des cils)</i>	Pathogène	Blépharite, dermatite
<i>Hippoboscoidea (mouche tsé-tsé)</i>	Vecteur	Éléphantiasis et maladie du sommeil
<i>Oestridae (mouches du vinaigre)</i>	Pathogène	Myiase
<i>Phthiraptera (poux)</i>	Pathogène	Pédiculose
<i>Sarcoptes scabiei (acariens)</i>	Pathogène	Gale
<i>Siphonaptères (puces)</i>	Pathogène	Démangeaisons
<i>Siphonaptères (puces)</i>	Vecteur	Eruption cutanée

Spécificités de la réponse immunitaire dirigée contre les champignons

Chez l'Homme, les infections fongiques sont souvent opportunistes, et touchent le plus souvent des patients immunodéprimés (table 6). Les neutrophiles et les macrophages activés par les PRR effectuent la phagocytose des cellules fongiques et sécrètent des peptides et des cytokines antifongiques (**IL-1, IL-12, TNF**). La formation de NET, et la production de ROI et de RNI vont également permettre l'élimination du pathogène. Les cellules T $\gamma\delta$ de la muqueuse étant activées, elles génèrent des effecteurs qui sécrètent des cytokines. Les cellules NK activées par l'IL-12 tuent les champignons en sécrétant des cytokines cytotoxiques (**IFN- γ et TNF**). Les ligands PRR des champignons activent les DC qui entraînent la différenciation des effecteurs T CD4+ en **Th1** (secrétant de l'**IFN- γ**) ou en **Th17** (secrétant de l'**IL-17 et IL-22**) ce qui conduit à l'hyperactivation des macrophages et à la formation de granulomes ou au recrutement de neutrophiles. Les champignons recouverts d'anticorps antifongiques ou de C3b subissent une phagocytose facilitée par l'opsonisation par les macrophages et les neutrophiles. Notez que la structure de la paroi cellulaire fongique permet aux cellules fongiques de résister à la lyse médiée par le MAC ¹⁴⁶ (table 6).

Table 6 : Exemples de champignons et maladies associées. Tiré de ⁴.

Pathogène (ou famille de pathogène)	Maladie (s)
<i>Aspergillus species</i>	Infections respiratoires, pneumonies aiguës et chroniques
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	Blastomycose ; lésions cutanées, pneumonies aiguës et chroniques.
<i>Candida species</i>	Infections à levures, vaginite, cystite
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Méningite, pneumonie
<i>Histoplasma capsulatum</i>	Histoplasmose ; lésions pulmonaires
<i>Mucormycotina</i>	Mucormycose ; lésions dans le cerveau, les sinus et les poumons ; gonflement des yeux
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Ulcérations des muqueuses du nez et de la bouche
<i>Pneumocystis (carinii) jiroveci</i>	Pneumonie à PCP et lésions pulmonaires
<i>Dermatophytes</i>	Infections de la peau, des ongles et des cheveux

2.2. Les biomarqueurs de l'hôte pour déterminer l'étiologie d'une infection aiguë

Comme nous avons pu le voir précédemment, la **réponse de l'hôte à une infection** fait intervenir **différents acteurs cellulaires** mais aussi **des molécules solubles, intracellulaires ou membranaires**. Une revue exhaustive des études menées jusqu'en 2015 a évalué plus d'une centaine de ces acteurs afin d'identifier de potentiels **biomarqueurs** permettant de déterminer l'étiologie bactériennes versus non-bactériennes, virales ou fongiques d'une infection ¹⁴⁷. Les biomarqueurs de l'hôte les plus fréquemment évalués sont la CRP, le nombre de leucocytes, la PCT, le nombre de neutrophiles et l'IL6. Les biomarqueurs ayant montré des différences statistiquement significatives entre les patients atteints d'une infection bactérienne et ceux atteints d'une infection non bactérienne ou virale sont les suivant :

Les marqueurs hématologiques : le nombre de leucocytes polymorphonucléaires/**granulocytes** (PMN), le nombre de **neutrophiles**, le nombre de **leucocytes**, le taux de sédimentation des érythrocytes (ESR), le nombre de globules rouges, le nombre de **monocytes** et de **lymphocytes** et l'haptoglobine (figure 18).

Biomarker (sample type)	No. Studies	Study Size Range	B vs. NonB ^a	B vs. V ^b	B vs. F ^c	Cut-off Range	% Sensitivity Range (No. studies)	% Specificity Range (No. studies)
PMN (blood, CSF)	5 (2 blood, 3 CSF)	28–135	1/1	3/4	0	30 to 49 cells/µl (CSF)	93.3–96 CSF (2)	84.9–95.8 CSF (2)
Neutrophil (blood, CSF, synovial)	13 (10 blood, 2 CNS, 1 synovial)	22–286	1/1	10/11	0/1	4900 to 10000 cells/µl (Blood); 83%, 118 cells/µl (CSF)	42–76 blood (3); 80–90.9 CSF (2)	71.4–88 blood (3); 71.6–85 CSF (2)
WBC (blood, CSF, synovial)	28 (1 blood & CSF, 22 blood, 5 CSF, 1 synovial)	22–1743	5/5	16/22	0/1	7200 to 17000 cells/µl (Blood); 128 to 10500 cells/µl (CSF)	17–82 blood (6); 66.7–88 CSF (4)	53–82 blood (6); 66–92.5 CSF (4)
ESR (blood)	7	22–1031	0	5/6	0/1	≥25.5 to ≥32.5 mm/hr	77.4–85 blood	78.3–90 blood
RBC (CSF)	1	83	0	1/1	0	26 cells/µl (CSF)	57.1 CSF	86.9 CSF
Monocyte (blood, CSF)	5 (3 blood, 2 CSF)	22–135	0	2/4	0	40% (CSF)	40 CSF (1)	92.4 CSF (1)
Lymphocyte (blood, CSF)	7 (6 blood, 1 CSF)	22–131	0/2	4/6	0/0	-/-	-/-	-/-
Platelet (blood)	3	22–158	0	0/3	0	-/-	-/-	-/-
Haptoglobin (CSF)	1	80	0	1/1	0	-/-	-/-	-/-
Hematocrit (blood)	1	22	0	0/1	0	-/-	-/-	-/-
Hemoglobin (blood)	1	22	0	0/1	0	-/-	-/-	-/-
MCHC (blood)	1	22	0	0/1	0	-/-	-/-	-/-
Reticulocyte (blood)	1	22	0	0/1	0	-/-	-/-	-/-

Figure 18 : Seuils et performances des marqueurs hématologiques dans la discrimination étiologique des infections bactériennes versus non-bactériennes, virales ou fongiques. ^aNonB : non-bactériennes, ^bV : virales, ^cF : fongiques. Tiré de ¹⁴⁷.

Les marqueurs d'inflammation : **CRP, PCT**, calprotectine, récepteur soluble de l'angiopoïétine 2 (sTie-2), et récepteur soluble sur les cellules myéloïdes (sTREM-1) (figure 19).

Biomarker (sample type)	No. Studies	Study Size Range	B vs. NonB ^a	B vs. V ^b	B vs. F ^c	Cut-off Range	% Sensitivity Range (No. studies)	% Specificity Range (No. studies)
CRP (blood)	36	22–1743	6/6	27/28	1/3	>10 to ≥125 mg/L	61.2–100 blood (18)	26–100 blood (18)
PCT (blood)	20	22–1743	3/3	15/16	1/1	0.015 to 1.55 ng/ml	38–97 blood (17)	31–100 blood (17)
Calprotectin (fecal)	2	107–108	0	2/2	0	103.9 to 200 µg/g	87–93 fecal (2)	65–88 fecal (2)
sTie-2 (blood)	1	160	0	1/1	0	≤9.18 ng/ml	72.6 blood (1)	68.1 blood (1)
CC16 (blood)	1	144	0/1	0	0	-/-	-/-	-/-
Neopterin (blood)	1	69	0	0/1	0	-/-	-/-	-/-
sTie-1 (blood)	1	160	0	0/1	0	-/-	-/-	-/-
sTREM-1 (blood)	2	56–300	1/1	1/1	0	755 pg/ml	53.2 blood (1)	86.3 blood (1)
suPAR (blood)	1	47	0	0/1	0	-/-	-/-	-/-

Figure 19 : Seuils et performances des marqueurs d'inflammation dans la discrimination étiologique des infections bactériennes versus non-bactériennes, virales ou fongiques. ^aNonB : non-bactériennes, ^bV : virales, ^cF : fongiques. Tiré de ¹⁴⁷.

Les cytokines : IL-4, IL-6, IL-8, IL-5, IL-18, IL-12, IL-13, IL-9, **IFN-I**, **IFN-II**, protéine 10 inductible par l'IFN gamma (**IP-10/ CXC10**), facteur plaquettaire 4 (PF-4), éotaxine, TNF-related apoptosis-inducing ligand (**TRAIL**), facteur stimulant les colonies de granulocytes-macrophages (GM-CSF) et le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) (figure 20 et 21).

Biomarker (sample type)	No. Studies	Study Size Range	B vs. NonB ^a	B vs. V ^b	B vs. F ^c	Cut-off Range	% Sensitivity Range (No. studies)	% Specificity Range (No. studies)
Interleukins								
IL-4 (blood, saliva)	2 (1 blood & saliva, 1 blood)	76–80	0	2/2	0	9 pg/ml	100 blood (1)	76.5 blood (1)
IL-6 (blood, CSF, saliva)	12 (1 blood & saliva, 9 blood, 2 CSF)	26–163	2/3	6/8	1/1	0.15 to <74.5 ng/ml (blood), 51.6 ng/ml (CSF)	50–64.3 blood (2); 61.9 CSF (1)	82.8–97.1 blood (2); 95.1 CSF (1)
IL-8 (blood, CSF, saliva)	6 (1 blood & saliva, 2 blood, 3 CSF)	60–83	0	5/6	0	1.14 to 3600 pg/ml (CSF)	82.5–100 CSF (3)	67.2–94 CSF (3)
IL-5 (blood, saliva)	2 (1 blood & saliva, 1 blood)	76–80	0	2/2	0	30 pg/ml (blood)	85.7 blood (1)	67.6 blood (1)
IL-10 (blood, saliva)	4 (1 blood & saliva, 3 blood)	76–160	0	0/4	0	-/-	-/-	-/-
IL-18 (blood, saliva)	2	56–160	0	1/2	0	-/-	-/-	-/-
IL-2 (blood, saliva)	2 (1 blood & saliva, 1 blood)	76–80	0	0/2	0	-/-	-/-	-/-
IL-1 beta (blood, saliva)	1	76	0	0/1	0	-/-	-/-	-/-
IL-12 (blood, saliva)	1	76	0	1/1	0	-/-	-/-	-/-
IL-13 (blood, saliva)	1	76	0	1/1	0	-/-	-/-	-/-
IL-15 (blood, saliva)	1	76	0	0/1	0	-/-	-/-	-/-
IL-17 (blood, saliva)	1	76	0	0/1	0	-/-	-/-	-/-
IL-1ra (blood, saliva)	1	76	0	0/1	0	-/-	-/-	-/-
IL-7 (blood, saliva)	1	76	0	0/1	0	-/-	-/-	-/-
IL-9 (blood, saliva)	1	76	0	1/1	0	-/-	-/-	-/-

Figure 20 : Seuils et performances des cytokines et autres médiateurs solubles dans la discrimination étiologique des infections bactériennes versus non-bactériennes, virales ou fongiques. ^aNonB : non-bactériennes, ^bV : virales, ^cF : fongiques. Tiré de ¹⁴⁷.

Interferon								
IFN gamma (blood, saliva)	4 (1 blood & saliva, 3 blood)	76–108	0	2/4	0	0 to 3.42 pg/ml (blood)	40–100 blood (2)	85–88.2 blood (2)
IFN alpha (blood, saliva)	2 (1 blood & saliva, 1 blood)	76–108	0	1/2	0	-/-	-/-	-/-
Chemokine								
IP-10 (blood, saliva)	3 (1 blood & saliva, 2 blood)	76–765	0	3/3	0	>0.96 ng/ml (blood)	82.3 blood (1)	72.3 blood (1)
PF-4 (blood)	1	160	0	1/1	0	>29.98 µg/ml	39.8 blood (1)	97.9 blood (1)
Eotaxin (blood, saliva)	1	76	0	1/1	0	-/-	-/-	-/-
MCP-1 (blood, saliva)	1	76	0	0/1	0	-/-	-/-	-/-
MIP-1 alpha (blood, saliva)	1	76	0	0/1	0	-/-	-/-	-/-
MIP-1 beta (blood, saliva)	1	76	0	0/1	0	-/-	-/-	-/-
RANTES (blood, saliva)	1	76	0	0/1	0	-/-	-/-	-/-
Tumor necrosis factors								
TNF alpha (blood, saliva)	4 (1 blood & saliva, 3 blood)	76–108	0	0/4	0	-/-	-/-	-/-
TRAIL (blood)	1	765	0	1/1	0	-/-	-/-	-/-
Other Cytokines								
GM (CSF)	1	80	0	1/1	0	30 pg/ml	78.6 CSF (1)	80.9 CSF (1)
VEGF (blood, saliva)	2	76–160	0	1/2	0	-/-	-/-	-/-
Ang-1 (blood)	1	160	0	0/1	0	-/-	-/-	-/-
Ang-2 (blood)	1	160	0	0/1	0	-/-	-/-	-/-
G-CSF (blood, saliva)	1	76	0	0/1	0	-/-	-/-	-/-

Figure 21 : Seuils et performances des cytokines et autres médiateurs solubles dans la discrimination étiologique des infections bactériennes versus non-bactériennes, virales ou fongiques (suite). ^aNonB : non-bactériennes, ^bV : virales, ^cF : fongiques. Tiré de ¹⁴⁷.

Les marqueurs de surface cellulaire : **CD64**, galectine (Gal)-9, CD35, CD55, CD32, CMH1, CD88, CD14, CD46, et CD59 (figure 22).

Biomarker (sample type)	No. Studies	Study Size Range	B vs. NonB ^a	B vs. V ^b	B vs. F ^c	Cut-off Range	% Sensitivity Range (No. studies)	% Specificity Range (No. studies)
CD64 (blood)	3	57–1921	2/2	1/1	0	1800 molecules/cell; 1.64 index	71–96 blood (3)	87–95.2 blood (3)
Gal-9 (blood)	1	63	0	1/1	0	>64.5 pg/ml	81.4 blood (1)	75 blood (1)
CD35 (blood)	3	47–286	0	3/3	0	≥1.5 index	67.5–81 blood (3)	68.9–77 blood (3)
CD55 (blood)	1	286	0	1/1	0	≥1.25 index	81 blood (1)	77 blood (1)
CD32 (blood)	1	286	0	1/1	0	≥92 to 110,000 molecules/cell	71.4–77.9 blood (1)	72.1–82.0 blood (1)
MHC1 (blood)	1	286	0	1/1	0	≥0.345 ratio	76 blood (1)	91 blood (1)
CD88 (blood)	1	286	0	1/1	0	≥81,804 molecules/cell	65.3 blood (1)	68.9 blood (1)
CD14 (blood)	1	81	0	1/1	0	-/-	-/-	-/-
CD46 (blood)	1	286	0	1/1	0	-/-	-/-	-/-
CD59 (blood)	1	286	0	1/1	0	-/-	-/-	-/-
HLA-DR (blood)	1	81	0	0/1	0	-/-	-/-	-/-
TLR2 (blood)	1	81	0	0/1	0	-/-	-/-	-/-
TLR4 (blood)	1	81	0	0/1	0	-/-	-/-	-/-

Figure 22 : Seuils et performances des marqueurs de surface cellulaire dans la discrimination étiologique des infections bactériennes versus non-bactériennes, virales ou fongiques. ^aNonB : non-bactériennes, ^bV : virales, ^cF : fongiques. Tiré de ¹⁴⁷.

Les marqueurs de l'activité métabolique : Glucose-CSF, lactate-CSF, protéine-CSF, protéine analogue à l'angiopoïétine (Anglpt)-3, espèces réactives de l'oxygène (ROS), L-lactate-CSF, apolipoprotéine E (ApoE), cortisol, urée et azote uréique (figure 23).

Biomarker (sample type)	No. Studies	Study Size Range	B vs. NonB ^a	B vs. V ^b	B vs. F ^c	Cut-off Range	% Sensitivity Range (No. studies)	% Specificity Range (No. studies)
Glucose (CSF)	5	28–253	1/1	3/4	0	2.2 to 2.5 mmol/l; 40 mg/dL	61.1–97 CSF (3)	49–92.3 CSF (3)
Lactate (CSF)	3	77–1692	0	3/3	0	3.8 mmol/L	94–96 CSF (2)	94–97 CSF (2)
Protein (CSF)	6	28–253	1/1	5/5	0	1000 to 1880 mg/l	84.2–89 CSF (3)	76.9–93.7 CSF (3)
Angplt-3 (blood)	1	160	0	1/1	0	>135.75 ng/ml	81.4 blood (1)	63.8 blood (1)
ROS (blood)	1	69	0	1/1	0	-/-	75 blood (1)	100 blood (1)
L-Lactate (CSF)	1	83	0	1/1	0	3.3 mmol/l	71.4 CSF (1)	98.4 CSF (1)
Angplt-4 (blood)	1	160	0	0/1	0	-/-	-/-	-/-
ApoE (CSF)	1	80	0	1/1	0	-/-	-/-	-/-
Cortisol (blood)	1	81	0	1/1	0	-/-	-/-	-/-
Creatine (blood)	1	47	0	0/1	0	-/-	-/-	-/-
Urea (blood)	1	47	0	1/1	0	-/-	-/-	-/-
Urea nitrogen (blood)	1	158	0	1/1	0	-/-	-/-	-/-

Figure 23 : Seuils et performances des marqueurs de l'activité métabolique dans la discrimination étiologique des infections bactériennes versus non-bactériennes, virales ou fongiques. ^aNonB : non-bactériennes, ^bV : virales, ^cF : fongiques. Tiré de ¹⁴⁷.

Autres biomarqueurs inorganiques, antimicrobiens, du complément, de l'homéostasie ou neuronales (figure 24).

Biomarker (sample type)	No. Studies	Study Size Range	B vs. NonB ^a	B vs. V ^b	B vs. F ^c	Cut-off Range	% Sensitivity Range (No. studies)	% Specificity Range (No. studies)
Inorganic								
Chloride (CSF)	2	83–135	0	2/2	0	114 mmol/l; 119 mEq/l	52.4–90.9 CSF (2)	80.6–88.5 CSF (2)
Serum iron (blood)	1	22	0	1/1	0	-/-	-/-	-/-
Antimicrobial response								
MxA (blood)	1	60	0	1/1	0	36.7 ng/ml	87.1 blood (1)	90.9 blood (1)
LBP (blood)	2	56–163	1/1	1/1	0	14.6 µg/ml	82 blood (1)	67 blood (1)
LCN-2 (CSF)	1	134	0	1/1	0	-/-	81 CSF (1)	93 CSF (1)
Complement System								
Factor D (blood)	1	160	0	1/1 (V vs. B)	0	>1248.1 ng/ml	69 blood (1)	93.6 blood (1)
C5a (blood)	1	160	0	0/1	0	-/-	-/-	-/-
Homeostasis								
Lactoferrin (fecal)	1	108	0	1/1	0	97 µg/g	64 fecal (1)	81 fecal (1)
HBP (blood, CSF)	2 (1 blood, 1 CSF)	77–81	0	2/2	0	>20 ng/ml (CSF)	100 CSF (1)	99.2 CSF (1)
Ferritin (blood)	1	22	0	0/1	0	-/-	-/-	-/-
Hepcidin (blood)	1	22	0	0/1	0	-/-	-/-	-/-
Neuronal								
GFAP (CSF)	1	80	0	1/1	0	-/-	-/-	-/-
PGH2 D-isomerase (CSF)	1	80	0	1/1	0	-/-	-/-	-/-
sAPPa (CSF)	1	80	0	1/1	0	-/-	-/-	-/-
sAPPb (CSF)	1	80	0	1/1	0	-/-	-/-	-/-

Figure 24 : Seuils et performances des biomarqueurs inorganiques, antimicrobiens, du complément, de l'homéostasie ou neuronales dans la discrimination étiologique des infections bactériennes versus non-bactériennes, virales ou fongiques. ^aNonB : non-bactériennes, ^bV : virales, ^cF : fongiques. Tiré de ¹⁴⁷.

Cette méta-analyse a permis d'identifier le **CD64** comme l'un des marqueurs présentant les meilleures performances (sensibilité 71-96%, spécificité 87-95%) pour détecter les patients

atteints d'infection bactérienne. Le CD64 est une glycoprotéine membranaire connue sous le nom de récepteur-I de haute affinité au fragment cristallisable-gamma des immunoglobulines (Fc γ RI) ¹⁴⁸. Le CD64 lie les anticorps monomériques de type IgG avec une grande affinité puis interagit avec la chaîne γ qui possède un motif « Immunoreceptor tyrosine-based activation » (ITAM) aboutissant à l'activation cellulaire et au déclenchement de la phagocytose, de la lyse du pathogène et du métabolisme oxydatif ¹⁴⁹. Le CD64 est présent de manière constitutive uniquement sur les macrophages et les monocytes, mais le traitement des leucocytes *in vitro* avec des cytokines comme l'IFN- γ peut induire en quelques heures l'expression du CD64 sur les neutrophiles ¹⁵⁰. *In vivo*, en cas d'infection bactérienne, l'activation du système immunitaire induit le relargage de cytokines pro-inflammatoires, dont l'IFN- γ , qui induit fortement l'expression du CD64 sur les neutrophiles ^{151,152}.

D'autres analyses ont permis d'identifier le **HLA-DR** comme un marqueur de choix pour le suivi du sepsis et le **CD169** comme un nouveau marqueur prometteur pour l'identification des infections virales ^{151,153-169}.

Le HLA-DR est un récepteur de surface cellulaire appartenant au système du complexe d'histocompatibilité majeur (CMH) de classe II. C'est un ligand pour le récepteur des cellules T (TCR) et sa fonction principale est de présenter des antigènes peptidiques d'origine étrangère au système immunitaire dans le but d'activer les cellules T. Les cellules présentatrices d'antigènes (macrophages, cellules B et cellules dendritiques) sont les cellules dans lesquelles on trouve généralement les DR. L'augmentation de l'abondance du HLA-DR à la surface des cellules est souvent une réponse à une stimulation et, par conséquent, un marqueur de stimulation immunitaire. A l'inverse, la réduction de l'expression du HLA-DR illustre un phénomène d'immunotolérance qui se caractérise par une fonctionnalité altérée incluant une diminution de la capacité de présentation des antigènes ^{170,171}. En clinique, l'ampleur et la persistance dans le temps de la perte du HLA-DR à la surface des monocytes sont considérées comme un marqueur de l'immunosuppression induite par diverses conditions cliniques : sepsis, traumatisme, brûlures, chirurgie, cancers et transplantations ^{172,173}. Dans ces contextes, le HLA-DR permet d'identifier les patients à risque d'aggravation : mortalité, infections secondaires ou rechute ^{172,172-176}.

Le **CD169** (ou Siglec-1 ou Sn) est une sialoadhésine, membre de la famille des Siglecs (sialic acid binding Immunoglobulin-like Lectins) exprimée à la surface de certains **macrophages**, **monocytes**, cellules dendritiques et rares lymphocytes T ^{177,178}. On la trouve en quantité particulièrement élevée sur les macrophages de la rate, du foie, des ganglions lymphatiques, de la moelle osseuse, du côlon et des poumons ^{179,180}. Les Siglecs sont les lectines de type I, une famille de lectines reconnaissant spécifiquement **l'acide sialique** ¹⁸¹. Le CD169 est le seul Siglec suffisamment long pour pouvoir se lier à des **trans-ligands** ¹⁸². Il se lie aux neutrophiles, aux monocytes, aux cellules NK, aux cellules B et T en interagissant avec les molécules d'acide sialique ou autres ligands tels que le CD43 exprimés à leur surface ¹⁸³. Cette interaction du récepteur avec le glucide (l'acide sialique) va activer d'importantes fonctions d'adhésion et de signalisation cellulaires ¹⁸⁴. Par exemple, les macrophages CD169 positifs forment, avec les cellules souches mésenchymateuses et les neurones bêta-adrénergiques, la niche des cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse. Dans cette dernière, les macrophages CD169 assurent la médiation de la **signalisation** entre les différentes cellules et semblent favoriser la **rétection** des cellules souches hématopoïétiques dans la niche. Aussi, les macrophages CD169+ de la zone marginale de la rate **reconnaissent** la phosphatidylsérine à la surface des cellules apoptotiques, **présentent** des antigènes de cellules apoptotiques et **recrutent** des cellules T régulatrices (Tregs) pour qu'elles jouent leur rôle dans la **tolérance** immunitaire ¹⁸⁴.

Le CD169 exprimé sur les macrophages permet également l'adhésion des acides sialiques exposés sur les glycolipides des **membranes virales** pour permettre leur **capture** et leur **internalisation** par endocytose, et participe soit à leur **destruction** soit à leur **transmission** et donc leur pathogénicité¹⁸⁵⁻¹⁸⁷. Des études *in-vitro* ont montré que l'expression du CD169 était doublée sur les monocytes après quelques heures de stimulation par l'IFN α . *In-vivo*, l'augmentation de l'expression du CD169 sur les monocytes a été observée lors d'infections par la plupart des virus : rhinovirus, virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin, virus Epstein-Barr, virus de l'immunodéficience humaine, virus de la dengue, zika, lassa, marburg, cytomégalovirus, et le virus respiratoire syncytial^{154-166,186,188-190}. Il a également été montré que l'expression du CD169 corrélait avec la charge virale du VIH^{186,188-190} et qu'il était le récepteur majeur aux glucides de ces virus, favorisant leur endocytose puis leur dissémination^{191,192}.

A ce jour, aucun marqueur protéique permettant, à lui seul, de distinguer les infections bactériennes des infections virales n'a encore été identifié. Cependant, des résultats intéressants sont obtenus en **combinant** différents marqueurs. Par exemple, l'évaluation combinée de l'expression de CD34/CD64 a donné une sensibilité de 67 % et une spécificité de 80 % pour la détection d'une infection bactérienne¹⁹³. Ensemble, CD35 et CD55 étaient sensibles à 81 % et spécifiques à 77 %, tandis que la combinaison des quatre marqueurs de surface cellulaire, CD35 + CD32 + CD88 + CMH I, a donné une sensibilité de 90,9 % et une spécificité de 91,8 %¹⁹⁴.

De nombreux biomarqueurs ont donc été identifiés ou sont à l'étude pour leur potentiel de discrimination entre les infections bactériennes et virales. Cependant, du point de vue du développement de produits, il s'agit d'un domaine relativement naissant, et peu de recherches visant à découvrir de nouveaux biomarqueurs ont atteint les derniers stades du développement de produits. En 2013, plus de 90 % des biomarqueurs signalés (plus de 100 biomarqueurs uniques de l'hôte) n'ont été évalués que dans le cadre de recherches en laboratoire et n'ont pas été utilisés en clinique. Nombre d'entre eux n'ont été évalués que sur des échantillons de petite taille et dans des groupes d'âge restreints¹⁴⁷. Bien que des tests commerciaux combinant certains de ces biomarqueurs soient disponibles, **aucun ne réponds pleinement aux caractéristiques établies** par le consensus des experts et **aucun n'est actuellement utilisé en routine clinique**⁴⁶. Peu d'entre eux sont adaptés à une utilisation à **grande échelle et dans des environnements à faibles ressources**.

2.3. Conclusion 1.2

Selon la nature du micro-organisme causal, sa localisation et son mode de transmission la réponse de l'hôte est différente et semble s'accompagner de **biomarqueurs spécifiques**. Les biomarqueurs de l'hôte les plus fréquemment évalués sont la CRP, le nombre de leucocytes, la PCT, le nombre de neutrophiles et l'IL6. Cependant, aucun marqueur ne permet, à lui seul, de distinguer les infections bactériennes des infections virales, ni à prédire la sévérité de la maladie. Aussi, aucun test commercial combinant plusieurs biomarqueurs ne répond pleinement aux critères ASSURED et ceux établies par le consensus d'experts et peu d'entre eux sont adaptés à une utilisation à grande échelle et dans des environnements à faibles ressources. Différentes études ont permis d'identifier trois biomarqueurs de surfaces cellulaires, le **CD64** sur les neutrophiles ainsi que le **CD169** et le **HLA-DR** sur les monocytes, comme étant des marqueurs intéressants pour la **détection respective des infections bactériennes, des infections virales, et du sepsis**. D'autres biomarqueurs pourraient également être pertinents pour la stratification des patients et la **prédiction de la sévérité de la maladie**. Une méthode de choix pour l'étude multiplexée de ces biomarqueurs présents à la

surface des leucocytes est la **cytométrie en flux**. Cela représente un certain défi car c'est une technologie plutôt complexe et coûteuse, difficile à mettre en œuvre, donc à généraliser, et encore moins au lit du patient. L'objectif de la thèse est donc d'évaluer la cytométrie en flux dans l'étude des marqueurs d'intérêt pour le **triage des patients présentant des signes d'infection** et idéalement pour la **prédiction de la sévérité de la maladie**.

3. La cytométrie en flux : technique de choix pour l'analyse des globules blancs

L'analyse cellulaire par cytométrie en flux est devenue, au fil de ces dernières années, un outil diagnostique essentiel pour les **laboratoires d'analyses médicales** avec de nombreuses applications dont l'utilité clinique est reconnue aujourd'hui. L'instrument de base a été développé en 1960, mais son application s'est étendue au diagnostic clinique seulement durant ces trente dernières années ¹⁹⁵.

L'avantage majeur de cette technique est sa capacité **d'analyse multiplexée rapide et précise des cellules individuelles** (analyse de 500 à 10 000 cellules par seconde). Ainsi, l'intérêt de l'immunophénotypage par cytométrie en flux en biologie clinique touche à de nombreux domaines :

- Description des populations cellulaires dans le sang ou d'autres échantillons (taille et granularité),
- Analyse des antigènes de différenciation leucocytaire,
- Etude de la naissance, de la vie, de la mort cellulaire,
- Description des mécanismes de signalisation cellulaire et de différentes fonctions cellulaires,
- Diagnostic et surveillance des déficits immunitaires, diagnostic et suivi des maladies autoimmunes, immunologie des greffes et des transplantations, maladies lymphoprolifératives, hypersensibilités,
- Participation au diagnostic dans de nombreuses maladies hématologiques,
- En cancérologie, évaluation des réactions de l'hôte contre la tumeur, et suivi de l'immunothérapie.

La cytométrie en flux est définie par l'analyse qualitative et quantitative des cellules dans un flux. En général le cytomètre en flux intègre trois composants : un système fluide de distribution de l'échantillon, un système de détection optique, et un système informatique de traitement électronique des données ¹⁹⁵.

Le système de distribution de l'échantillon est un système de fluide sous pression qui dirige l'échantillon (cellules ou particules en suspension marquées par un ou plusieurs fluorochromes) en orientant et alignant les cellules dans un capillaire. Les cellules passent à très grande vitesse, où elles sont excitées par le ou les lasers de l'appareil ¹⁹⁵.

Le système optique comporte une source de lumière (laser) et des lentilles pour focaliser la lumière. Les lasers les plus courants sont des lasers à argon (bleus ; 488 nm), lasers à hélium-néon (rouges, 633nm) et lasers ultra-violet (355nm). Plus récentes, des diodes permettent des excitations violettes (405nm) ou vertes (532nm). Les cytomètres peuvent utiliser plusieurs sources d'excitation en même temps, en parallèle. Les instruments les plus récents utilisés dans les laboratoires de diagnostics utilisent un à trois lasers. En recherche, certains appareils ont 4 ou 5 lasers. De plus en plus les lasers sont remplacés par des systèmes à base de LEDs, plus

efficaces et moins coûteuses. D'une part, le passage des cellules ou particules devant le faisceau laser entraîne une diffusion de la lumière en fonction de leurs caractéristiques physiques. Le signal est capturé par deux photodiodes. La première est disposée dans le prolongement du laser (« Forward Scatter », FSC) à faible angle. Le signal capté reflète approximativement la taille de la cellule. La seconde est placée latéralement, autour de 90° (« Side Scatter », SS). Le signal capté reflète l'hétérogénéité des cellules (granularité du cytoplasme). D'autre part, les cellules marquées avec des fluorochromes émettent des signaux de différentes longueurs d'onde, triés par des jeux de miroirs sélectifs (dichroïques) et filtres (en ligne ou en étoile) et capturés par des photomultiplicateurs (PMT) ou plus récemment Avalanche Photo Diode (APD) ¹⁹⁶.

La partie électronique et informatique convertit les signaux analogiques en signaux numériques et un ordinateur recueille les données et les conserve sous forme de fichiers. L'ordinateur présente les données et les représente sous des formes graphiques. Ceci va permettre à l'utilisateur d'analyser les résultats ¹⁹⁵.

3.1. Les méthodes de préparation des échantillons sanguins pour la cytométrie en flux

Tout échantillon biologique peut être analysé par cytométrie en flux mais l'étude du sang total est la plus répandue car c'est la plus adaptée à l'utilisation en routine dans les laboratoires d'analyses biologiques. L'analyse des Cellules Sanguines Périphériques Mononuclées (PBMC) est également généralisée mais la préparation de l'échantillon est plus longue.

La première étape de préparation d'un échantillon sanguin pour son analyse par cytométrie en flux est le **prélèvement**. Le **prélèvement veineux** est universellement pratiqué car il est considéré comme modérément invasif. En revanche, il requiert un **personnel qualifié**, du matériel spécifique et implique le prélèvement de **plusieurs millilitres** de sang (tubes anticoagulants souvent prévus pour 4 à 10 ml). Ce type de prélèvement n'est pas tout à fait idéal pour les **zones reculées à faibles ressources**. Ainsi, une alternative au prélèvement veineux serait la **prise de sang capillaire** (au bout du doigt après piqûre à l'aide d'une lancette). Cet acte **ne nécessite pas de personnel qualifié** et requiert un **matériel très basique**. Il est de plus considéré comme **très peu invasif** avec de **petits volumes** de sang prélevés, mesurés en microlitres. Dans de premiers essais, il a été montré que les proportions leucocytaires communes (obtenues avec les marqueurs CD3, CD4, CD8, CD14 et CD15) ainsi que les intensités de fluorescence des certains marqueurs d'intérêt ne varient pas pour un même donneur, que son échantillon de sang total soit prélevé classiquement (sang veineux) ou au bout du doigt (sang capillaire) ¹⁹⁷. Aussi, ces premières expériences sur sang capillaire ont confirmé l'absence de problème de coagulation dans le tube test lorsque la goutte se trouve diluée dans le réactif de lyse.

Selon la méthode utilisée, un prélèvement sanguin est donc très peu à modérément invasif ce qui explique sa très large utilisation en laboratoire biomédical. Néanmoins, les cellules sanguines une fois sorties de l'organisme se **dégradent très vite** et peuvent rapidement devenir inanalysables. L'**analyse** doit donc se faire **immédiatement** après le prélèvement. Encore une fois, cet aspect ne convient pas aux zones isolées ne possédant pas de laboratoire d'analyse biologique à proximité et où l'échantillon doit être **conservé** et transporté. Différentes techniques de préservation du sang total existent et nous les détaillerons plus tard.

Après prélèvement et éventuelle préservation/ transport du prélèvement sanguin, le protocole standard de préparation des échantillons pour un marquage extracellulaire est constitué de **trois étapes, la lyse des globules rouges, le marquage des globules blancs, et le lavage**. La

réduction ou l'élimination des globules rouges facilite l'analyse des globules blancs, mille fois moins nombreux. Bien que le cytomètre puisse être réglé pour ignorer les événements de petites tailles afin d'éliminer une partie des érythrocytes, il est difficile de définir un réglage qui n'affecte pas les lymphocytes¹⁹⁸. La lyse, rapide et peu coûteuse est donc la méthode de choix pour la plupart des analyses cliniques.

Quatre variantes méthodologiques de marquage de surface et de lyse des globules rouges sont actuellement utilisées :

- Les méthodes de **marquage-lyse-lavage** donnent la meilleure discrimination du signal mais doivent être évitées lorsque la perte de cellules due au lavage est un problème. Lors du marquage des immunoglobulines membranaires, les échantillons doivent être soigneusement pré-lavés avant l'incubation avec les anticorps monoclonaux afin d'éviter de marquer les immunoglobulines non membranaires cytophiles s'attachant à une surface cellulaire par l'intermédiaire de leur région de Fc.
- Les méthodes de **marquage-lyse-sans-lavage** sont recommandées lorsqu'une énumération pure et simple des populations cellulaires est nécessaire, mais elles peuvent donner un bruit de fond plus important et doivent être évitées lorsque des antigènes faiblement exprimés sont étudiés.
- Les méthodes de **lyse-marquage-lavage** sont utilisées lorsque la concentration cellulaire doit être ajustée avant le marquage ou lorsque les globules rouges doivent être éliminés. Certains auteurs favorisent la macrolyse, c'est-à-dire la lyse dans un grand volume de réactif avant le lavage et la concentration de l'échantillon.
- Des méthodes de sang total **sans lyse ni lavage** ont été développées lorsque l'énumération des sous-ensembles de leucocytes est nécessaire. La charge importante en globules rouges peut nécessiter l'utilisation d'un colorant nucléaire pour effectuer une sélection positive lors des tests sur les leucocytes ou pour exclure les cellules nucléées lors des tests sur les globules rouges¹⁹⁹.

Il n'y a **pas de consensus sur la méthode optimale** de lyse des érythrocytes. Différents protocoles peuvent être plus appropriés dans différentes situations. Actuellement, chaque laboratoire choisit sa propre méthode, son propre protocole et ses réactifs en fonction d'un certain nombre de facteurs.

La lyse cellulaire avec de **l'ammonium chloride** (NH₄Cl) est souvent utilisée pour éliminer les globules rouges. Dans la littérature, il est décrit que son fonctionnement dépend du passage libre de l'ammoniac (NH₃), issu de la décomposition du NH₄Cl ($\text{NH}_4\text{Cl} \rightarrow \text{NH}_3 + \text{HCl}$), dans la cellule. Une fois à l'intérieur de la cellule, le NH₃ se convertit en NH₄⁺ produisant de l'hydroxyde ($\text{H}_2\text{O} + \text{NH}_3 \rightarrow \text{NH}_4 + \text{OH}$). Le OH⁻ réagit avec le dioxyde de carbone (CO₂) pour former du bicarbonate ($\text{CO}_2 + \text{OH} \rightarrow \text{HCO}_3$) grâce à l'anhydrase carbonique naturellement présente sur les globules rouges. Le HCO₃⁻ intracellulaire est échangé avec le chlorure (Cl⁻) extracellulaire via l'échangeur (Cl⁻/HCO₃⁻) liée à l'anhydrase carbonique. Il en résulte la reformation de NH₄Cl à l'intérieur des globules rouges, ce qui entraîne une augmentation de la pression osmotique provoquant un gonflement cellulaire et finalement la rupture de la membrane cellulaire²⁰⁰.

Cependant, toutes les observations ne soutiennent pas ce mécanisme. Il a été montré que l'anhydrase carbonique pouvait également catalyser la conversion du carbonate d'ammonium (NH₄)₂CO₃ en carbamate d'ammonium NH₄(H₂NCO₂) ayant une capacité de lyse extrêmement puissante. Un modèle est donc proposé dans lequel la production de carbamate (H₂NCO₂) dans la membrane cellulaire est dirigée par l'absorption de CO₂. Le carbamate

produit provoque une augmentation intracellulaire du pH aboutissant à la lyse du globule rouge²⁰¹.

Quel que soit le mécanisme d'action mis en jeu lors de la lyse par NH₄CL, la libération de NH₃ et/ ou l'augmentation de pH intracellulaire rend les conditions d'expérimentation non physiologiques voir **toxiques** entraînant parfois une **perte de certains épitopes**, et impliquant une **lecture rapide**, habituellement 1 à 2 heures après la réalisation de la préparation²⁰²⁻²⁰⁴. De plus, l'utilisation de chlorure d'ammonium est **incompatible avec le formaldéhyde** qui est utilisé comme post-fixateur des préparations, ce qui oblige à réaliser un lavage avant de fixer.

Ainsi, une méthode de **lyse plus douce** a été développée afin de moins affecter les leucocytes. Cette lyse remplace l'ammonium par de la **pyrrolidine** ayant la même capacité à former des carbamates. De la même manière que le carbamate d'ammonium, la formation de carbamate de pyrrolidine est catalysée par l'anhydrase carbonique. Cette lyse présente également l'avantage d'être **compatible avec le formaldéhyde et d'être stable à température ambiante**²⁰¹. Par ailleurs, des travaux antérieurs ont montré que l'utilisation de la lyse à la pyrrolidine au lieu de la lyse classique à l'ammonium n'entraîne aucune différence significative au niveau de la qualité des résultats, voire même un meilleur marquage de certaines sous-populations leucocytaires fragiles^{197,205}.

Quelle que soit la méthode et le type de lyse utilisés, les protocoles actuels se réalisent en plus de **35 minutes** et requièrent une manipulation dans un **laboratoire spécialisé**, avec du **matériel spécifique** et par un **personnel qualifié** (figure 25). Ainsi, bien que la cytométrie en flux représente un puissant outil d'analyse cellulaire, les méthodes de préparation des échantillons actuelles ne répondent pas aux critères établis par le consensus du produit de triage type⁴⁶.

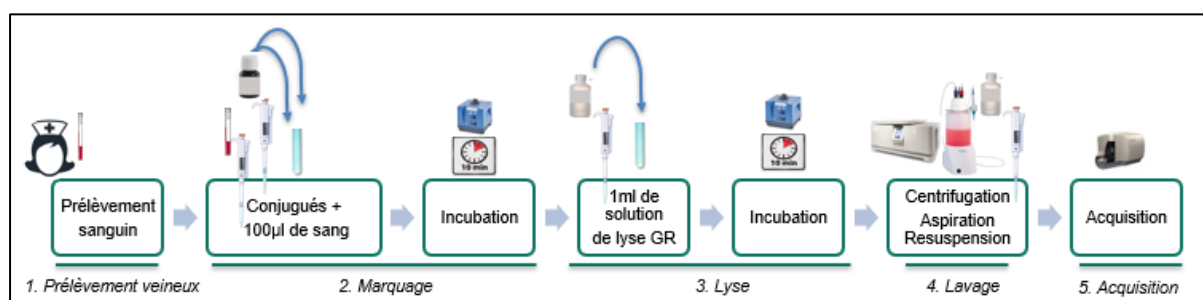


Figure 25 : Procédure actuelle de préparation des échantillons pour la cytométrie en flux. *GR : globules rouges.*

De récents travaux de notre équipe de recherche ont mis au point une nouvelle méthode **rapide de préparation des échantillons en une seule étape** où le prélèvement **sanguin est réalisé au bout du doigt**, et où la **lyse** des globules rouges et le **marquage** des globules blancs sont réalisés en **simultané** et **sans lavage** (figure 26). Cela a été possible grâce à l'utilisation de la lyse douce à la pyrrolidine qui n'affecte pas le marquage des globules blancs. La comparaison de cette nouvelle méthode en une étape avec la méthode classique marquage-lyse-lavage a montré que les proportions leucocytaires communes (obtenues avec des marqueurs CD3, CD4, CD8, CD14 et CD15) et les intensités de fluorescence des marqueurs d'intérêt ne varient pas entre les deux méthodes. Enfin elle est aussi compatible avec l'utilisation des **anticorps séchés**, prêts à l'emploi, et stables à température ambiante. Les premières évaluations ont montré la faisabilité de la mesure des biomarqueurs CD169 et CD64 par la méthode en une étape et ont démontré des performances prometteuses dans le triage des patients présentant des signes d'infections^{197,206-209}.

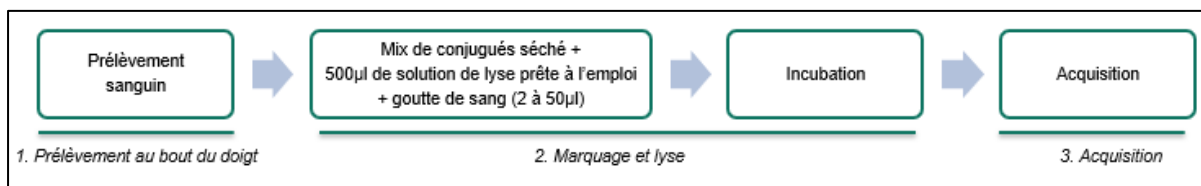


Figure 26 : Nouvelle procédure rapide de préparation des échantillons pour la cytométrie en flux.

3.2. Les méthodes de préservation des échantillons sanguins

L'analyse des leucocytes est généralement effectuée dans des **laboratoires centraux spécialisés**, dotés d'équipements et de réactifs particuliers, et par des opérateurs expérimentés. Ce type de laboratoires est aujourd'hui assez répandu mais n'est **pas encore accessible à tous**. Par exemple, les patients pour lesquels des analyses sanguines sont nécessaires afin d'établir un diagnostic ou d'effectuer un suivi de traitement lié à une maladie n'habitent pas toujours à proximité des laboratoires d'analyses biomédicales. Il existe également des pays où de tels laboratoires n'existent pas en raison du faible développement économique. Il est donc impératif de **transférer le sang** des patients de ces régions, parfois très isolées, vers des laboratoires centralisés. Cependant, les cellules sont des unités biologiques très **fragiles qui se dégradent** rapidement après prélèvement, à température ambiante ou en l'absence de toutes manipulations dans le but de les conserver. Par exemple, la structure de certaines cellules, telles que les granulocytes, est endommagée au bout d'un jour.²¹⁰

Il est donc nécessaire de trouver des méthodes efficaces de **conservation du sang** dans le but de réaliser par la suite des analyses cellulaires. Une des techniques de conservation du sang la plus connues est la **cryoconservation**. Elle permet de conserver des tissus entiers ou des cellules à très basse température (-130°C ou -196°C). Cette très basse température induit un arrêt des activités intracellulaires, y compris des activités métaboliques mitochondriales, responsables de la mort cellulaire²¹¹. La conservation des cellules par la congélation dans ces conditions nécessite l'ajout d'agents **cryoprotectants** au milieu de culture tels que le diméthylsulfoxyde (**DMSO**) et le glycérol²¹². Ceci limite la formation de cristaux de glace intracellulaires et extracellulaires responsables de l'éclatement des cellules et donc de la mort cellulaire lors de la congélation. Une congélation à une vitesse contrôlée et une température inférieure à -50°C est également requise pour inhiber la formation de ces cristaux^{213,214}. Cette méthode n'est pas utilisée classiquement pour la conservation du sang entier. Elle est plutôt utilisée de manière routinière pour la conservation des lignées cellulaires ou des **cellules mononuclées du sang périphérique** après extraction par Ficoll et permet un stockage à long terme. La cryopréservation des cellules présente un avantage pour la conservation à long terme des lignées cellulaires en raison d'un coût de stockage relativement faible lié à la maintenance des congélateurs ou des cuves d'azote liquide. Les cellules congelées permettent d'avoir une réserve des lignées en cas de mort cellulaire ou de contamination des cultures de laboratoires. De plus, comme le démontre certaines études, aucun dommage de l'ADN n'est détecté après conservation à de telles températures²¹⁵. Cela fait de ce mode de conservation une méthode idéale pour stocker des échantillons à long terme dans le but notamment d'effectuer des études rétrospectives.

Même si la cryopréservation et l'analyse des PBMC sont actuellement très utilisées, il s'agit de **cellules isolées** et ne représente pas fidèlement la situation *in vivo*. En effet, l'étape d'**isolement** des cellules mononuclées par Ficoll peut induire une **activation** cellulaire basale et la libération de médiateurs stimulant ainsi les échantillons cellulaires^{216,217}. Cette étape requiert de **l'expérience**, de **grands volumes** de matériel biologique et l'utilisation de milieux de culture artificiels, ce qui augmente la variabilité^{218,219}. Cette méthode ne peut donc pas s'affranchir de gros volumes de sang prélevés, plus lourd pour les patients. Aussi, les **granulocytes**, qui jouent un rôle important dans les réactions antimicrobiennes, auto-immunes et allergiques, sont **perdus** du fait de leur taille lors de l'isolement cellulaire, peu importe la quantité de sang utilisé. De ce fait, les tests basés sur l'étude des neutrophiles et des éosinophiles ne sont pas réalisables. De plus, en raison de l'élimination du sérum et des composants du plasma, les **interactions** intercellulaires sont rendues **difficiles** voire impossibles, et l'environnement physiologique des cellules est complètement modifié (nutriments, médiateurs, microvésicules, plaquettes...) ²²⁰.

Par conséquent, la mise en place de méthodes de **conservation du sang total** permettrait de surmonter ces limites, même si beaucoup de choses restent encore inconnues à ce sujet ^{221,222}. Il a été démontré qu'en utilisant une approche de cryopréservation du sang total spécifique, la transformation des cellules B par l'Epstein-Barr virus (EBV), la viabilité des lymphocytes et la prolifération des cellules T en réponse aux anti-CD3, anti-CD28 et IL-2 sont maintenues ²²³. Cette approche de conservation est très intéressante car elle permet de préserver les granulocytes dans les échantillons étudiés. Cependant, comme l'isolement cellulaire par Ficoll, l'addition de **DMSO** et les étapes de **lavage** sont toujours une source **d'activation** et de **perte cellulaires** indésirables.

Par ailleurs, la cryopréservation n'est pas la méthode la plus adaptée pour le **transport**. En effet, cela nécessite l'utilisation de **carboglace** et d'emballage adapté pour éviter la décongélation des échantillons ; ce qui rend ce type de transport assez **coûteux**. C'est pourquoi certains travaux ont tenté de développer des techniques de conservation du sang à température ambiante. Le sang total peut être conservé à **température ambiante ou à 4°C** lorsqu'il est prélevé dans des tubes contenant des **stabilisateurs** tels que le stabilisateur TransFix® de l'entreprise Cytomark® et les tubes Cyto-Chex® BCT développés par l'entreprise Streck® ²²⁴. Ainsi, en présence d'inhibiteurs de protéases, de DNases, de RNases et de fixateurs, le sang peut être préservé pendant quelques jours. Cette méthode ne nécessite pas de lavage et n'entraîne pas de perte de cellules à ce niveau-là. De plus, le transport à température ambiante ou 4°C est tout à fait possible, ce qui fait de cette méthode un des meilleurs modes de conservation. Cependant, l'utilisation de **fixateurs** et autres stabilisateurs peut **affecter les marqueurs**, comme les récepteurs de chimiokines, et donc interférer avec l'analyse cellulaire²²⁵. Le temps de **stockage** relativement **réduit** avec cette méthode (1 à 2 semaines) représente aussi une limite importante. Enfin le **coût** unitaire des tubes est **important** et la méthode oblige à prélever un volume de **plusieurs millilitres** pour remplir le tube et atteindre la bonne concentration de stabilisant.

Il existe une autre méthode de préservation du sang total à température ambiante n'utilisant **aucun additif et adaptée à de très petits volumes** : Il s'agit de la préservation par **séchage** où une goutte de sang capillaire est déposée et séchée sur un papier buvard (**Dried Blood Spots DBS**) ²²⁶. Cette méthode est largement utilisée pour des analyses métaboliques (telles que le test de Guthrie chez les nouveaux nés) et plus récemment pour des analyses protéomiques et génomiques ²²⁷⁻²³⁰. Cependant, la méthode n'a **jamais été utilisée pour l'étude de la cellule entière**.

3.3. Conclusion 1.3

L'avantage majeur de la cytométrie en flux est sa capacité d'analyse **rapide et précise** des cellules individuelles d'un mélange complexe tel que le sang, et ce sur de **nombreux paramètres** simultanément. Cependant, les méthodes actuelles de prélèvement, de **préparation** et de **préservation** des échantillons sanguins ne sont **pas adaptées** aux contraintes rencontrées lors de la prise en charge des patients présentant des signes d'infection à l'hôpital et encore moins dans les zones reculées. De ce fait, l'utilisation de la méthode est restreinte à la **recherche clinique** et n'est pas encore en mesure d'être adoptée de **manière routinière**. Néanmoins, deux nouvelles méthodes qui ont récemment vu le jour, la procédure rapide de préparation des échantillons et la méthode de préservation du sang total par **congélation directe** semblent correspondre aux besoins identifiés, mais ces méthodes doivent encore être optimisées et évaluées dans des environnements infectieux divers.

B. OBJECTIFS DE LA THESE

Trois objectifs ont été fixés :

- a. Poursuivre la recherche et l'optimisation d'une **procédure rapide** de préparation des échantillons sanguins pour une analyse par **cytométrie en flux auprès du patient**.
- b. Rechercher et optimiser des techniques de **préservation du sang** total pour permettre la **généralisation de la cytométrie en flux dans les zones à faibles ressources**.
- c. Evaluer les **performances cliniques** des procédures mises au point associées aux biomarqueurs **CD64 et CD169** pour le triage des patients.

C. ETUDES ADDITIONNELLES

Avec l'apparition de l'épidémie de la COVID-19, les évaluations cliniques ont été complétées par l'intégration de cohortes de patients infectés par le SARS-CoV-2. Également, pour aller plus loin, la procédure rapide a été utilisée pour étudier pourquoi la COVID-19 est plus agressive envers les adultes qu'envers les enfants.

D. RESULTATS

1. La procédure de marquage rapide

Le premier objectif de la thèse a été de répondre au besoin de mieux distinguer les infections bactériennes et virales grâce au développement de nouveaux POCT. Nous avons donc poursuivi la mise au point d'une méthode rapide de préparation des échantillons sanguins pour une analyse par cytométrie en flux, répondant aux critères établis par l'OMS.

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans « *Bioprotocol* » intitulée : « **Méthode de marquage extracellulaire des globules blancs en une étape pour la cytométrie en flux** ». ²³¹

One-step White Blood Cell Extracellular Staining Method for Flow Cytometry

Ines Ait Belkacem^{1, 2, #}, Pénélope Bourgoin^{2, #}, Jean Marc Busnel²,
Franck Galland¹ and Fabrice Malergue^{2, *}

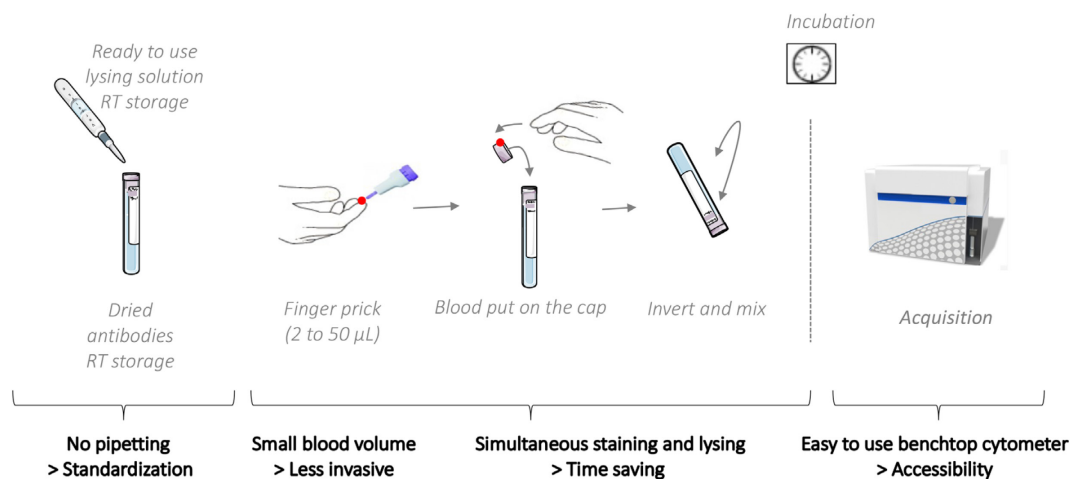
¹Aix Marseille University, Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, Marseille, France; ²Department of Research and Development, Beckman Coulter Life Sciences-ImmunoTech, Marseille, France

*For correspondence: fmalergue@beckman.com

#Contributed equally to this work

[Abstract] Flow cytometry is a powerful analytical technique that is increasingly used in scientific investigations and healthcare; however, it requires time-consuming, multi-step sample procedures, which limits its use to specialized laboratories. In this study, we propose a new universal one-step method in which white blood cell staining and red blood cell lysis are carried out in a single step, using a gentle lysis solution mixed with fluorescent antibody conjugates or probes in a dry or liquid format. The blood sample may be obtained from a routine venipuncture or directly from a fingerprick, allowing for near-patient analysis. This procedure enables the analysis of common white blood cell markers as well as markers related to infections or sepsis. This simpler and faster protocol may help to democratize the use of flow cytometry in the research and medical fields.

Graphic abstract:



One-step White Blood Cell Extracellular Staining Method for Flow Cytometry.

Keywords: Blood, Leukocytes, Flow cytometry, One-step method, Point-of-care

[Background] Flow cytometry is increasingly used in scientific investigations and healthcare; however, it requires a time-consuming, multi-step sample preparation procedure, which limits its use to specialized laboratories. Most whole blood sample preparation protocols for extracellular staining consist of at least

Copyright © 2021 The Authors; exclusive licensee Bio-protocol LLC.

three steps: using a venous blood sample collected in an anticoagulated sampling tube, 50-100 μ l is pipetted into a reaction tube; as a second step, fluorescent antibodies are mixed and incubated with the blood to allow white blood cell staining; as a third step, the lysis solution is added to the reaction tube to allow for red blood cell removal; finally, an optional washing step is performed to reduce non-specific fluorescence.

Due to these multiple timed steps that need to be carried out in specialized laboratories, the use of flow cytometry is limited. It is, for example, not yet routinely used in the clinical field, even though the assessment of patient immune cells has proven helpful in the indication of potential disease activity (Brown and Wittwer, 2000). Some authors have tried to establish protocols with only one step, proposing to remove the lysis step; however, this method necessitates a dedicated flow cytometer, restricting its use (Petritz *et al.*, 2018).

In this study, we propose a new universal method in which white blood cell staining and red blood cell lysis are carried out in a single step. The lysis solution is stable at room temperature (RT) and does not interfere with the staining owing to its composition, which comprises a substrate that is specifically cleaved by an enzyme uniquely present in RBC membranes (van Agthoven, 2007). White cells are maintained at neutral pH under isotonic conditions and are therefore not affected. The lysis solution can include low-dose formaldehyde (0.05%) to stabilize markers of interest (Bourgoin *et al.*, 2020c).

The fine titration of the conjugates and their direct dilution in the lysis solution enable the final washing step to be eliminated while maintaining low background levels. Using the new Dried Unitized Reagent Assays (DURA) Innovations technology, the conjugates can be dried, which enables RT storage and removes the need for pipetting, thereby supporting better standardization. The blood sample may be of venous origin or from a fingerprick, allowing for less invasive sampling suitable for a point-of-care setting. This approach is possible thanks to an excess volume of lysis solution, which permits efficient RBC lysis in up to 50 μ l of blood. The conjugate quantities have also been adjusted to stain white blood cells contained in 2-50 μ l blood, with a small quantity of blood no longer being a limitation because 2 μ l blood contains an average of 10,000 leukocytes. As a 100-cell subpopulation is usually considered statistically representative, using 2 μ l of blood allows for analysis of subpopulations as low as 1%, which is sufficient for most routine applications.

Since management of patients with infections in the Emergency Department (ED) is challenging for practitioners, we developed a panel that enables rapid patient triage in the ED using flow cytometry. It has been shown that monitoring the expression of CD169 on monocytes (mCD169), CD64 on neutrophils (nCD64), and HLA-DR on monocytes (mHLA-DR) by flow cytometry can be indicative of viral or bacterial infection, or sepsis, respectively. We therefore established a panel consisting of antibodies targeting these three markers and evaluated the one-step method in subjects with infection and septic conditions by measuring the expression of the three infection-related markers (Bourgoin *et al.*, 2019a, 2019b, 2020a, 2020b, 2020c, and 2021; Bedin *et al.*, 2020; Michel *et al.*, 2020).

Many other applications can be envisioned in fields where flow cytometry is routinely performed, such as measuring T, B, and NK cell proportions, detecting leukemias and lymphomas, and enumerating CD34⁺ stem cells for transplantation.

Materials and Reagents

1. Regular flow cytometry 5-ml test tubes, polypropylene or polystyrene (12 × 75 mm), or 1.4-ml microtubes (e.g., from Micronic), or deep-well plates (any vendor).
2. Lysis solution (Beckman Coulter, VersaLyse™, catalog number: IM3648, store at 18-24°C, 2-year shelf-life)
3. Fixative solution (IOtest®3 10×; Beckman Coulter, catalog number: A07800, store at 2-8°C, 1-year shelf-life)
4. Antibody cocktail (IOtest Myeloid Activation CD169-PE (Phycoerythrin)/HLA-DR-APC (Allophycocyanin)/CD64-PB (Pacific-Blue) Antibody Cocktail from Beckman Coulter, catalog number: C63854, store at 2-8°C, 1-year shelf-life)
5. Easy batch preparation of the lysis buffer (see Recipes)
6. Batch preparation of the staining and lysis buffer for n tests (see Recipes)

Equipment

1. Pipettes (Gilson, PIPETMAN®, catalog numbers: FA10003M [2-20 µl] and FA10006M [100-1000 µl])
2. 3-laser, 10-color cytometer (Beckman Coulter, Navios, catalog number: B47904) or 3-laser 13-color cytometer (Beckman Coulter, CytoFLEX, catalog number: B53000). Any other 3-laser cytometer can be used (e.g., Becton Dickinson FACSCanto, Cytex Aurora)

Software

1. Kaluza Software version 2.1 (Beckman Coulter, <https://www.beckman.fr/flow-cytometry/software/kaluza>)

Note: Any other flow cytometry software can be used (e.g., Becton Dickinson Flowjo and Cytex SpectroFlo).

Procedure

1. Prepare the lysis buffer (wear common Personal Protective Equipment).
Dilute 1:200 the fixative solution in the lysis solution under chemical hood protection and mix.
2. Perform the lysis–staining step.
3. In a tube containing 500 µl lysis buffer and 10 µl conjugate panel, add 2-50 µl blood sample (venous or capillary), mix, and incubate for 15 min in the dark at RT (18-25°C).
4. Acquire the data on a 3-laser cytometer (then dispose of the waste in containers dedicated to biohazard waste).

Data analysis

A. Acquiring data on the flow cytometer

Unstained cells are used to set the parameters of the flow cytometer.

1. Turn on the flow cytometer.
2. Open the acquisition software and create four dot plots:
 - a. Side Scatter (SSC) on the x-axis and Forward Scatter (FSC) on the y-axis.
 - b. Channel dedicated to PE (FL2 on Navios) detection on the x-axis and SSC on the y-axis.
 - c. Channel dedicated to APC (FL6 on Navios) detection on the x-axis and SSC on the y-axis.
 - d. Channel dedicated to PB (FL9 on Navios) detection on the x-axis and SSC on the y-axis.
3. Set the voltages/gains for the SSC-FSC plot such that most of the cell population is in the middle of the graph (Figure 1a). The discriminant/threshold should be set up in such a way that minimum debris is acquired.
4. Set all the compensations to 0.
5. Set the voltages for FL9, FL2, and FL6 such that the lymphocyte mean or median fluorescence intensity is around 0.3 (Figure 1b).

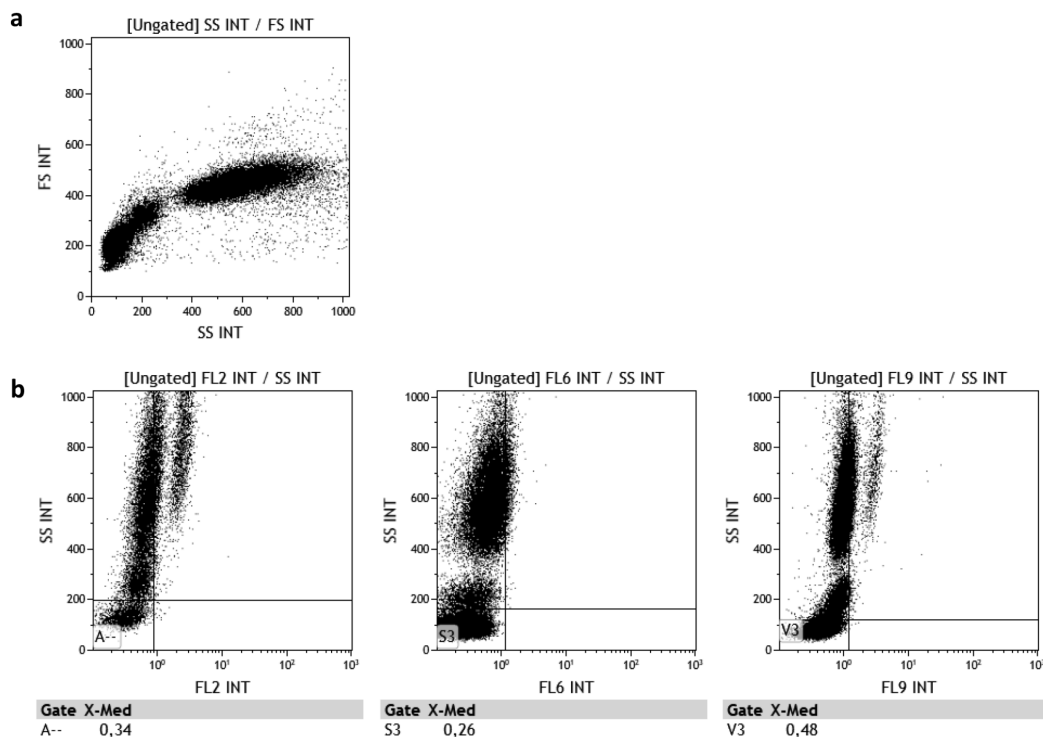


Figure 1. Flow cytometry parameters on (a) SSC-FSC plot and (b) FL2-, FL6-, and FL9-SSC plots

6. Save the protocol.
7. Acquire the first stained sample using a high flow rate (~1 μ l/s) without any compensation. Make sure to acquire at least 500 monocytes for a robust analysis (usually 30 to 90 s).

8. On the SSC-FSC plot, draw a leukocyte gate, avoiding debris (Figure 2a).
9. On the SSC-FL9 (CD64-PB) plot, draw the lymphocyte, monocyte, and neutrophil gates (Figure 2b).
10. CD169 and HLA-DR expression levels should be assessed on monocytes. CD64 expression levels should be assessed on neutrophils (Figure 2b and 2c).

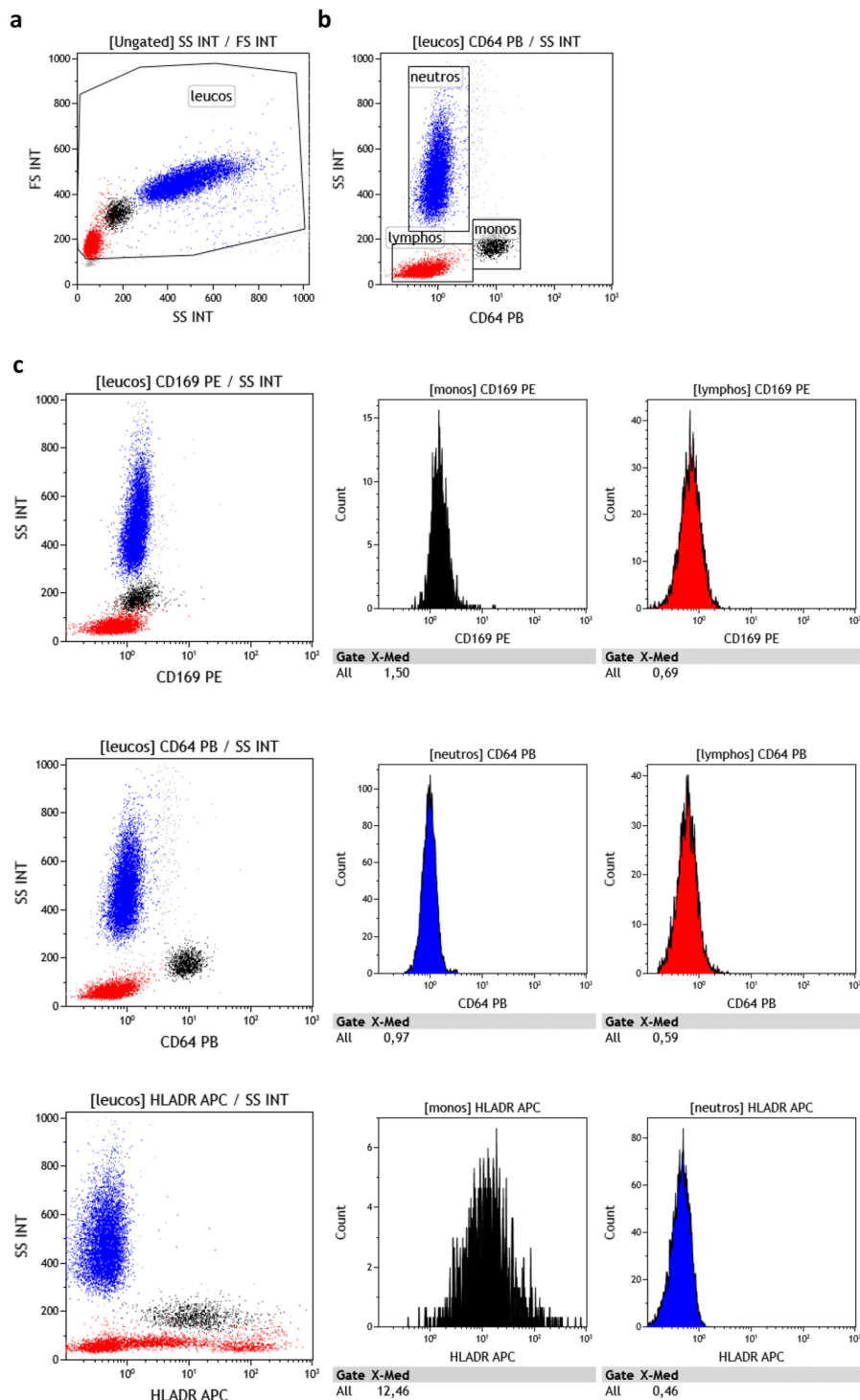


Figure 2. Data analysis procedure. (a and b) Gating strategy of lymphocytes, monocytes, and

neutrophils. (c) CD169, CD64, and HLA-DR expression level assessment strategy.

11. Marker levels should be expressed as the Mean of Fluorescence Intensity, Median of Fluorescence Intensity, or Signal-to-noise. Signal-to-noise is calculated as follows: CD169 expression levels on monocytes should be divided by CD169 expression levels on lymphocytes; CD64 expression levels on neutrophils should be divided by CD64 expression levels on lymphocytes; and HLA-DR expression levels on monocytes should be divided by HLA-DR expression levels on neutrophils (Figure 3).
12. Results are considered as follows: High mCD169 expression is indicative of viral stimuli, high nCD64 expression is indicative of bacterial stimuli, high mHLA-DR expression is indicative of infectious stimuli, and low mHLA-DR expression is indicative of immune exhaustion (Figure 3).

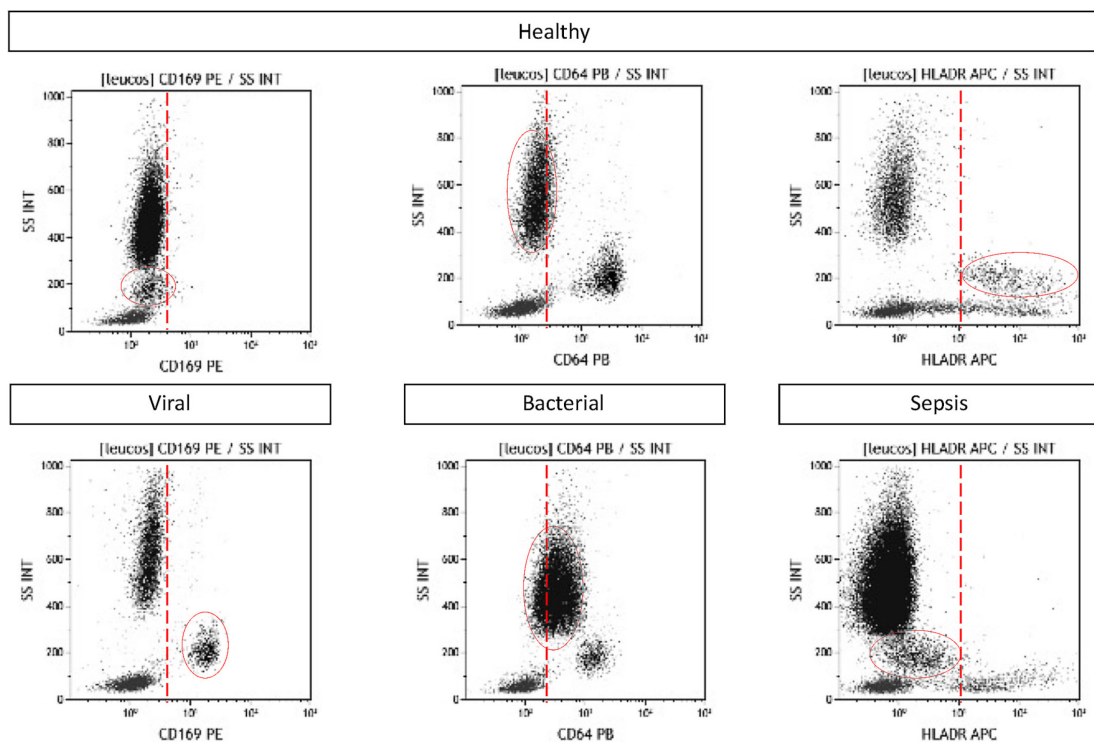


Figure 3. mCD169, nCD64, and mHLA-DR expression assessment in whole blood using the one-step method. Examples are given for one healthy volunteer, one virus-infected patient, one bacteria-infected patient, and one patient with sepsis.

13. More research will be necessary to precisely set the thresholds in each laboratory setting, but as an indication, previous evaluations have shown that thresholds should be close to 3 for the CD169 and CD64 indexes.
14. Further analysis can be performed using software such as Kaluza (re-analysis, other gating and auto-gating, other histograms or dot plots, coloring, compensation adjustments, refined percentages and fluorescent values, overlay and merge data sets, batch analysis for higher throughput, etc.).

Notes

Depending on the target marker, application, and required stability, the method should be adapted in each laboratory setting. For example, and only for indication and not as an established performance, it has been observed in some applications that:

1. Blood sample can be venous or capillary.
2. Blood can be anticoagulated with EDTA or heparin.
3. Thanks to the gentle lysis reagent and added fixative, blood can be processed up to 3-4 days after sampling when stored at RT or 2-8°C. Moreover, samples can be analyzed on the cytometer up to 3 days after processing when stored at 2-8°C.
4. The lysis solution can include 0.05% fixative solution.
5. The lysis buffer (lysis solution containing fixative solution) can be stored for up to one month at RT.
6. The targeted marker can be any membrane marker.
7. Antibodies can be liquid or dried depending on product availability.

WARNING:

- a. *If a liquid cocktail is used, an antibody volume higher than 100 µl could impact lysis efficiency.*
 - b. *If a commercial DURAClone format is used, the lysis volume should be increased to 1 ml (for 2-50 µl blood) or 2 ml (for 50-100 µl blood as per IFU).*
8. Antibodies can be premixed with the lysis buffer up to a few days prior.

Recipes

Note: To be adapted depending on each application; performances are not established.

1. Easy batch preparation of lysis buffer
One bottle Versalyse solution (100 ml)
500 µl fixative solution (10×)
Mix and store at RT
2. Batch preparation of the staining and lysis buffer for n tests
Pipet (n+1) × 500 µl lysis buffer
Add (n+1) × 10 µl myeloid activation cocktail (or any other panel at its optimal dose)
Mix well and distribute 510 µl per reaction tube, store in the dark
Tube is now ready to receive the blood sample

Acknowledgments

IAB is the recipient of a CIFRE Ph.D. grant (N°2018/1212) from the ANRT (National Agency for Research and Technology). This work was supported by Beckman Coulter through donation of the

research reagents used in the flow cytometry experiments and participation of the four employees: IAB, PB, JMB, and FM. The method described was modified from 'VersaLyse and the mechanism of ammonium chloride lysis' (van Agthoven, 2007) and resulted in recent publications (Bourgoin *et al.*, 2019a, 2019b, 2020a, 2020b, 2020c, and 2021; Bedin *et al.*, 2020; Michel *et al.*, 2020).

Competing interests

There are no conflicts of interest or competing interests.

Ethics

All enrolled patients provided informed consent, and the procedures followed were in accordance with the Helsinki Declaration. Routine care of the subjects was not modified; analyses were performed on anonymized left-over blood, and all data collected in the study were part of routine clinical practice and retrieved from subject records. Results of this study had no influence on subject management.

References

1. Bedin, A.S., Makinson, A., Picot, M.C., Mennechet, F., Malergue, F., Pisoni, A., Nyiramigisha, E., Montagnier, L., Bollore, K. and Debieesse, S. J. (2020). [Monocyte CD169 expression as a biomarker in the early diagnosis of COVID-19](#). *J Infect Dis* 223(4): 562-567.
2. Bourgoin, P., Biechele, G., Ait Belkacem, I., Morange, P. E. and Malergue, F. (2020a). [Role of the interferons in CD64 and CD169 expressions in whole blood: Relevance in the balance between viral- or bacterial-oriented immune responses](#). *Immun Inflamm Dis* 8(1): 106-123.
3. Bourgoin, P., Hayman, J., Rimmele, T., Venet, F., Malergue, F. and Monneret, G. (2019a). [A novel one-step extracellular staining for flow cytometry: Proof-of-concept on sepsis-related biomarkers](#). *J Immunol Methods* 470: 59-63.
4. Bourgoin, P., Lediagon, G., Arnoux, I., Bernot, D., Morange, P. E., Michelet, P., Malergue, F. and Markarian, T. (2020b). [Flow cytometry evaluation of infection-related biomarkers in febrile subjects in the emergency department](#). *Future Microbiol* 15: 189-201.
5. Bourgoin, P., Soliveres, T., Ahriz, D., Arnoux, I., Meisel, C., Unterwalder, N., Morange, P. E., Michelet, P., Malergue, F. and Markarian, T. (2019b). [Clinical research assessment by flow cytometry of biomarkers for infectious stratification in an Emergency Department](#). *Biomark Med* 13(16): 1373-1386.
6. Bourgoin, P., Soliveres, T., Barbaresi, A., Loundou, A., Belkacem, I. A., Arnoux, I., Bernot, D., Loosveld, M., Morange, P. E., Michelet, P., Malergue, F. and Markarian, T. (2021). [CD169 and CD64 could help differentiate bacterial from CoVID-19 or other viral infections in the Emergency Department](#). *Cytometry A* 99(5): 435-445.

7. Bourgoïn, P., Taspınar, R., Gossez, M., Venet, F., Delwarde, B., Rimmelé, T., Morange, P. E., Malergue, F. and Monneret, G. (2020c). [Toward Monocyte HLA-DR Bedside Monitoring: A Proof of Concept Study](#). *Shock* 55(6): 782-789.
8. Brown, M. and Wittwer, C. (2000). [Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology](#). *Clin Chem* 46(8 Pt 2): 1221-1229.
9. Michel, M., Malergue, F., Belkacem, I. A., Bourgoïn, P., Morange, P.-E., Arnoux, I., Miloud, T., Million, M., Tissot-Dupont, H., Mege, J. L., Busnel, J. M. and Vitte, J. (2020). [An ultra-sensitive, ultra-fast whole blood monocyte CD169 assay for COVID-19 screening](#). *medRxiv*.
10. van Agthoven, A. (2007). [VersaLyse and the mechanism of ammonium chloride lysis](#). *Int J Lab Hematol* 29: 65-66.

La méthode décrite dans l'étude précédente montre que l'échantillon de sang analysé peut être d'origine veineuse ou provenir d'une **piqûre de doigt**, ce qui permet un échantillonnage moins invasif et adapté à un contexte POCT. Une quantité de sang aussi petite que 2 µl est suffisante car elle permet d'analyser en moyenne 10 000 leucocytes. Comme une sous-population de 100 cellules est généralement considérée comme statistiquement représentative en cytométrie, l'utilisation de 2 µl de sang permet d'analyser des sous-populations dont la fréquence est de moins de 1 %, ce qui est suffisant pour la plupart des applications de routine. Un volume de 500 µl de lyse à la pyrrolidine permet de lyser une goutte de sang dont le volume peut aller jusqu'à 50 µl. Dans cette méthode rapide, le marquage des globules blancs et la lyse des globules rouges sont réalisées en **une seule étape** et le résultat du test est obtenu en **10 à 15 minutes**. Tout le matériel et les réactifs nécessaires pour un test complet peuvent être mis dans un **kit prêt à l'emploi**, ne nécessitant **aucun pipetage ou préparation préalable**, conservable à **température ambiante** et **délivrable** à toute structure procédant un cytomètre en flux (hôpitaux, laboratoires spécialisés, ou même en cabinet médical).

Nous nous sommes également intéressés à la méthode d'analyse des résultats obtenus. Pour les paramètres nécessitant une mesure de l'intensité de fluorescence, nous avons évalué l'utilité de mesurer le ratio signal/bruit au lieu d'une simple mesure du signal. Nous avons trouvé que la mesure du signal/ bruit permettait de minimiser la variabilité inter-opérateurs et inter-cytomètres. L'utilisation du rapport signal/ bruit permet donc la **standardisation** facile de la méthode et la comparaison des résultats obtenus sur des cytomètres distincts et avec des réglages différents.

La méthode a également été optimisée afin de la rendre compatible avec différents panels de conjugués prêts à l'emploi existants. En particulier, deux panels ont été étudiés, le panel IM Basic et le panel IM Granulocytes de Beckman Coulter. Ces panels comprennent une dizaine de conjugués chacun sous format sec. Ils sont stables à température ambiante et prêts à l'emploi. Ils sont développés pour un marquage puis une lyse séquentielle de 100µl de sang à l'aide de 2 ml de solution de lyse à la pyrrolidine. Nous avons optimisé la méthode afin de pouvoir lyser et marquer le sang en une seule étape à l'aide de ces panels. Pour cela différents volumes de sang et de lyse ont été évalués. Le protocole final pour une analyse rapide du sang total par ces deux panels secs prêts à l'emploi comprend l'utilisation d'un volume de sang allant jusqu'à 100 µl ainsi qu'un volume de lyse fixé de 2ml. Le volume de lyse précédemment fixé (de 500 µl) ne permettant pas une lyse efficace car ces panels contiennent des composés interférant avec la lyse.

Nous avons ensuite abordé la question de la **généralisation** de ce type de tests hors des structures procédant un cytomètre en flux, en particulier dans les **régions reculées**, où les **ressources dans les centres de soins sont limitées**. Nous avons optimisé la procédure rapide afin de permettre la préservation de l'échantillon de sang préparé pour qu'il puisse être transporté du site de prélèvement vers un laboratoire central. Nous avons évalué l'effet de plusieurs doses de fixateur (formaldéhyde) sur la préservation du marquage dans le temps. Nous avons conclu qu'une dose de formaldéhyde allant de 0,025 à 0,05% mise directement dans la solution de lyse, lors de l'étape de marquage et lyse simultanés, permettait de conserver l'échantillon de sang préparé (lysé et marqué) à température ambiante, jusqu'à 72h après préparation, sans interférer avec la qualité du marquage. Ainsi, le test pourrait être étendu à des sites qui ne sont pas équipés d'un cytomètre, qui réaliseraient seulement le prélèvement et la

préparation de l'échantillon avant de l'envoyer vers le laboratoire central. Néanmoins, la durée de transport dans ces conditions ne peut pas dépasser les 72h.

Nous avons donc recherché une méthode permettant la préservation des prélèvements de sang à plus long terme afin qu'ils puissent être envoyés à des laboratoires centraux plus éloignés. Les petites quantités de sang n'étant plus une limitation, nous avons tenté de mettre au point une méthode de préservation du sang **prélevé au bout du doigt** afin de s'affranchir du matériel (aiguille et tube avec anticoagulant) et du personnel requis lors d'un prélèvement veineux. Afin de rendre le transport accessible, nous avons soulevé l'hypothèse selon laquelle l'échantillon sanguin pourrait être préservé à **température ambiante**, ne nécessitant aucune précaution spécifique et complexe tel que le requiert le transport du sang congelé par exemple.

2. La méthode des « Dried Blood Spots » pour la préservation du sang total

Ces recherches ont fait l'objet d'une publication dans « *Advanced Science* » intitulée : « **Analyse cellulaire à partir de taches de sang séché : Nouvelles opportunités en immunologie, hématologie et dans les maladies infectieuses** ». ²³²

Cell Analysis from Dried Blood Spots: New Opportunities in Immunology, Hematology, and Infectious Diseases

*Ines Ait Belkacem, Noushine Mossadegh-keller, Penelope Bourgoïn, Isabelle Arnoux, Marie Loosveld, Pierre-emmanuel Morange, Thibaut Markarian, Pierre Michelet, Jean Marc Busnel, Sandrine Roulland, Franck Galland, and Fabrice Malergue**

Blood cell analysis is a major pillar of biomedical research and healthcare. These analyses are performed in central laboratories. Rapid shipment from collection site to the central laboratories is currently needed because cells and biomarkers degrade rapidly. The dried blood spot from a fingerstick allows the preservation of cellular molecules for months but entire cells are never recovered. Here leucocyte elution is optimized from dried blood spots. Flow cytometry and mRNA expression profiling are used to analyze the recovered cells. 50–70% of the leucocytes that are dried on a polyester solid support via elution after shaking the support with buffer are recovered. While red blood cells lyse upon drying, it is found that the majority of leucocytes are preserved. Leucocytes have an altered structure that is improved by adding fixative in the elution buffer. Leucocytes are permeabilized, allowing an easy staining of all cellular compartments. Common immunophenotyping and mRNAs are preserved. The ability of a new biomarker (CD169) to discriminate between patients with and without Severe Acute Respiratory Syndrome induced by Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infections is also preserved. Leucocytes from blood can be dried, shipped, and/or stored for at least 1 month, then recovered for a wide variety of analyses, potentially facilitating biomedical applications worldwide.

1. Introduction

The analysis of blood-derived cells plays a central role in biomedical research and healthcare. Cells of interest are mostly blood leucocytes, bone marrow aspirates, cord blood stem cells, tissue extracts, or cultured cells. The analysis is generally performed by specialized operators in dedicated central laboratories with high-technology equipment and reagents. However, the sources of cells—patients, participants in multicentric studies, or animals—are not always near those laboratories. This means that cell samples must be shipped or that patients need to travel. Especially during periods of quarantine, it would be convenient to enable self-collection and shipment of blood samples to the laboratory by courier.

Cells are fragile and degrade rapidly in sampling tubes when stored for hours or days. This major challenge has led to the development of multiple methods to preserve

I. Ait Belkacem, Dr. P. Bourgoïn, Dr. J. M. Busnel, Dr. F. Malergue
Department of Research and Development
Beckman Coulter Life Sciences-Immunotech
130 Avenue de Lattre de Tassigny, Marseille 13009, France
E-mail: fmalergue@beckman.com

I. Ait Belkacem, Dr. N. Mossadegh-keller, Prof. S. Roulland,
Prof. F. Galland
Aix Marseille Université
CNRS
INSERM
CIML
Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy
Marseille 13009, France

Dr. I. Arnoux, Dr. M. Loosveld, Prof. P.-emmanuel Morange,
Dr. T. Markarian
Department of Hematology Laboratory
Timone University Hospital
APHM
264 Rue Saint-Pierre, Marseille 13005, France

Prof. P.-emmanuel Morange, Dr. T. Markarian, Prof. P. Michelet
Aix Marseille Université
INSERM
INRAE
C2VN, 27 Boulevard Jean Moulin, Marseille 13385, France
Prof. P. Michelet
Department of Emergency Medicine and Intensive Care
Timone University Hospital
APHM
264 Rue Saint Pierre, Marseille 13005, France

 The ORCID identification number(s) for the author(s) of this article can be found under <https://doi.org/10.1002/advs.202100323>

© 2021 The Authors. Advanced Science published by Wiley-VCH GmbH. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

DOI: 10.1002/advs.202100323

cells for a few days or even up to many years. Preservation of viable mammalian cells, however, requires high concentrations of cryoprotectants such as dimethyl sulfoxide or glycerol, and extremely low temperatures ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ freezers or $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ liquid nitrogen for storage and dry ice for shipping).^[1] Although cryogenic temperatures are now widely used for long-term storage of a wide range of cell lines, tissues, and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), it is costly and time consuming to prepare, store, transport and recover these frozen samples. Preparing PBMCs further induces a significant loss of white blood cells, including loss of neutrophils and eosinophils (granulocytes), and, moreover, requires large volumes of blood.

Other methods of whole blood preservation at room temperature (RT), or at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, have been developed, based on the addition of stabilizers such as protease inhibitors, DNase, RNase, and fixatives. Blood can be preserved in those conditions for several days. This method does not require washing and therefore does not lead to significant cell loss, but some markers are affected, and cell viability is lost.^[2] In addition, the dedicated tubes, prefilled with reagents, are costly, and shipping, although simpler, still requires dedicated solutions. Also, these tubes need to be filled with blood even for a single analysis as they contain a fixed amount of preservative intended for a full tube of blood.

Bang introduced the dried blood spot (DBS) sampling method in 1913 for glycemia.^[3] Guthrie generalized the method in 1963 for neonatal screening for phenylketonuria.^[4] DBS is now the reference sampling method for the analysis of biochemical markers and nucleic acids. It allows screening of various diseases, using a heel-prick.^[5–7] Beyond newborns, DBS have also been proposed in therapeutic drug monitoring, infectious disease diagnosis, metabolomics and proteomics.^[8–10] DBS provides a number of advantages: Storage requires little space and does not need low temperatures, even for prolonged storage. Shipping is much easier, cheaper, and safer than frozen and stabilized samples. DBS cannot leak or be broken in transit. Furthermore, there is no requirement for carriage on dry ice.^[11] Also, DBS represents a low infection hazard as some viruses are inactivated due to disruption of their envelopes upon drying.^[12,13]

To our knowledge, there is no publication describing preservation and analysis of entire leucocytes recovered from DBS. Inspired by the simplicity of the fingerstick and DBS method, we aimed to develop a new method for drying whole blood on a solid support, as well as a simple and gentle recovery procedure compatible with cell analysis. As a proof of concept, we studied the preservation of leucocyte subpopulations, their variety of surface and intracellular proteins, and their nucleic acid contents after cell sorting. Considering the difficulties to implement large scale diagnosis, illustrated by the current Coronavirus disease of 2019 (COVID-19) pandemic, we further evaluated the preservation of the CD169 marker on a cohort of COVID-19 patients, since CD169 was recently described by our team and others as a relevant biomarker of acute viral infections such as Severe Acute Respiratory Syndrome induced by Coronavirus 2 (SARS-CoV-2).^[14–16]

2. Results

2.1. Recovering Leucocytes from a Dried Blood Spot: Preliminary Testing

Flow cytometry experiments showed that DBS cellulose solid support did not allow recovery of more than 1% of cells (Methods 2, 4, 6, and 8). The polyester solid support yielded a recovery of 33% with heparinized blood (Method 3) or 52% with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) blood (Method 1). Furthermore, manual shaking (Methods 1–4) allowed a higher recovery than vortexing (Methods 5–8) (Figure 1a). Principal leucocyte subpopulation (lymphocytes, monocytes, and granulocytes) were preserved, but granularity (SSC) was impaired in granulocytes (Figure 1b).

Weighing the solid support every 30 min after blood spotting showed no further weight change after 60 min at RT ($18\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$) and local levels of humidity (30–60%) (Figure 1c). Cell size and granularity were strongly decreased, showing that leucocyte structural properties were impaired during the drying and not completely restored upon elution (Figure 1d,e). Leucocyte staining with a nonpermeant DNA probe and a pan-leucocyte marker showed that all eluted cells were permeabilized (Figure 1f).

We determined that $20\text{ }\mu\text{L}$ of blood could be spotted onto a 1 cm^2 solid support and estimated that it is possible to recover 50 000 to 100 000 cells from that $20\text{ }\mu\text{L}$ sample, assuming 50% recovery and normal leucocyte count ($5000\text{ to }10\text{ }000\text{ }\mu\text{L}^{-1}$) (Figure 1g).

2.2. Recovering Leucocytes from a Dried Blood Spot: Method Optimization

Recovery was not impaired when we replaced red blood cells (RBC) lysing solution with phosphate-buffered saline 1X (PBS 1X). This suggests that RBCs are already lysed by the drying (Figure S1, Supporting Information). Adding a fixative (formaldehyde, FA) to the elution buffer at low concentration (0.025 and 0.05%) improved structure integrity without impairing leucocyte CD45 staining. Formaldehyde 0.05% also improved the recovery of neutrophils (the most fragile leucocytes) and thereby restored subpopulation frequencies to pre-DBS levels. When the concentration of formaldehyde was 0.1% or higher, staining was impaired.

We compared different elution methods (vortex, rotating mixer, automated orbital shaker and manual shaking). The polyester solid support layers appeared to disintegrate when tubes were manually shaken up by 15 up-and-down movements. This corresponded to the best leucocyte recovery (Figure S2, Supporting Information).

Since EDTA-anticoagulated blood allowed better leucocyte recovery than heparin-anticoagulated blood (52% and 33% respectively) (Figure 1a), we evaluated the role of these compounds on the system. The solid support was therefore pretreated with heparin or EDTA. Heparin induced a decrease in leucocyte

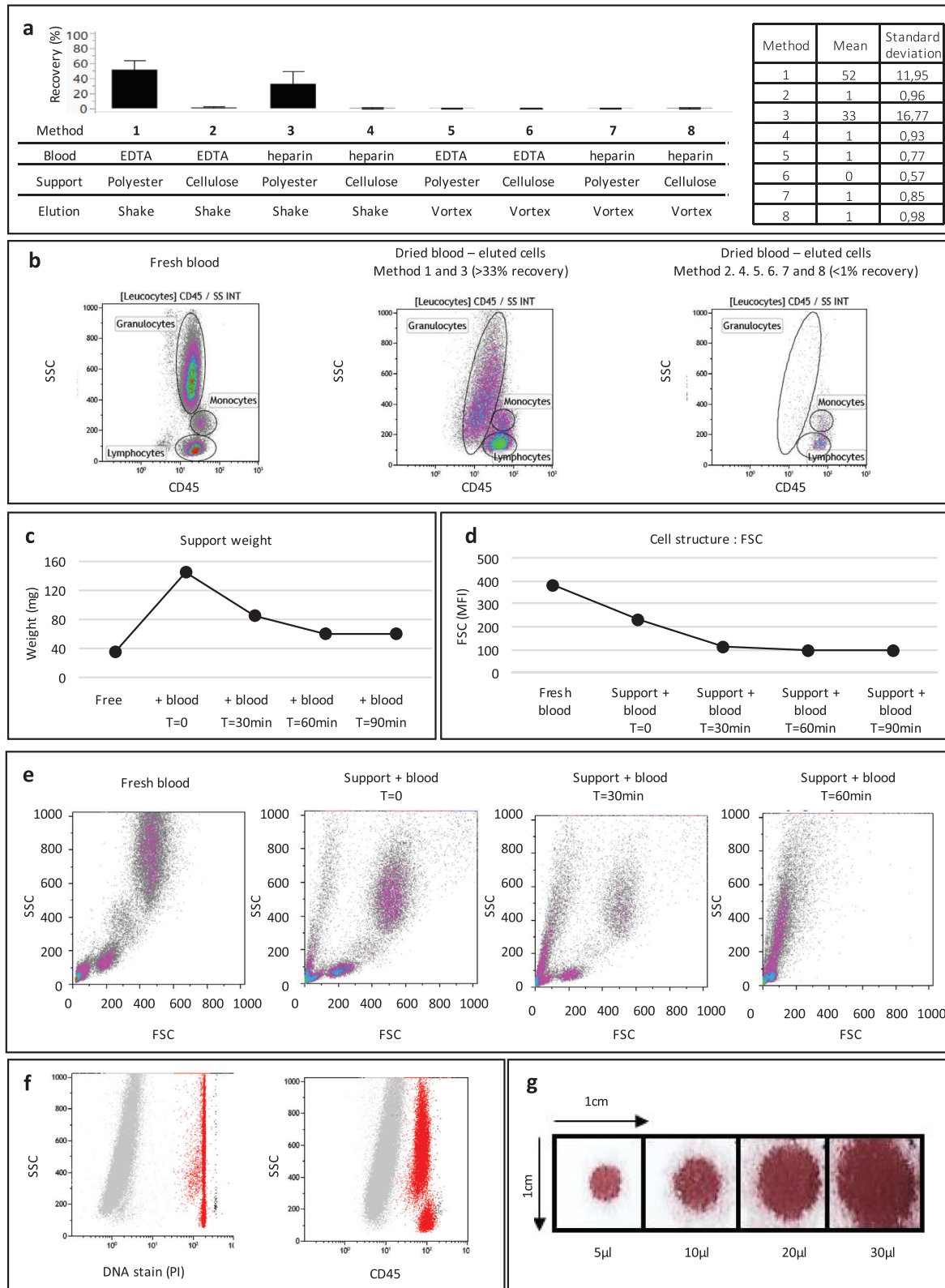


Figure 1. Recovering leucocytes from a DBS stored 24 h at RT. a) Leucocyte recovery quantification on six donors in each method, data are presented as mean \pm standard deviation. b) Representative flow cytometry dot plots and leucocyte subpopulation frequencies. c) Solid support weight before and after blood spotting at $t = 0, 30, 60, 90$ min. d) Quantification of leucocyte FSC from fresh blood and dried blood at: $t = 0, 30, 60$ min and e) representative flow cytometry plots. f) PI and CD45 staining of recovered leucocytes. g) DBS size with increasing blood volumes.

recovery of EDTA-anticoagulated blood (from 55% to 8%) whereas EDTA pretreatments improved leucocyte recovery of both EDTA- (from 55% to 77%) and heparin-anticoagulated blood (from 36% to 54%) (Figure S3a, Supporting Information). This adverse effect could be linked to the large polyanionic structure of the heparin. In line with this hypothesis, pretreating the solid support with a large polycationic molecule (poly-L-lysine) improved leucocyte recovery on heparinized blood (from 13% to 40%) and had no effect on EDTA-anticoagulated blood (Figure S3b, Supporting Information). Since proteases could be released from permeabilized leucocytes and impact their structure and markers and thereby the recovery, we pretreated the solid support with protease inhibitors. This treatment improved the recovery of both EDTA-anticoagulated blood (from 47% to 76%) and heparin-anticoagulated blood (from 36% to 68%) (Figure S3c, Supporting Information).

When testing different storage conditions (from 4 to 37 °C), similar leucocyte recoveries and subpopulation frequencies were obtained. The only change observed was a decrease in the granularity (SSC) (Figure S4, Supporting Information).

We concluded that the simplest method allowed a satisfactory recovery (about 50%): EDTA-anticoagulated blood is dried and stored at RT, using an untreated polyester solid support, and later eluted with PBS 1 × 0.05% FA and manual shaking. We therefore selected this method for the following experiments. If necessary, better recovery may be achieved by pretreating the solid support.

2.3. Cell Marker Preservation Analysis

We performed multicolor flow cytometry analysis to evaluate the preservation of multiple leucocyte subpopulations based on their relevant surface markers. CD3, CD4, CD8, CD14, CD16, CD19, CD45, and CD56 and the corresponding subset proportions were all preserved after 1 month of storage (Figure 2a and Table S1, Supporting Information). The background increased for all markers, reducing the signal-to-noise ratio.

Since the cells were permeabilized, we also evaluated the preservation and accessibility of common intracellular markers. The myeloid granule marker (myeloperoxidase, MPO) and the B cell cytoplasmic marker CD79a, both widely used to classify acute myeloid and lymphoid leukemia, and the regulatory T cells (Tregs) nuclear marker FoxP3, broadly studied in the context of autoimmunity, were easily detected after 1 month of storage (Figure 2b,c).

2.4. Venous versus Capillary Dried Blood Comparison

As we used venous blood samples anticoagulated with EDTA for the preliminary and optimization experiments, we compared whether blood drawn from a lancet fingerstick directly onto the solid support can yield similar cell recovery and marker preservation, and if the solid support needs to be pretreated with anticoagulant. We compared the results from three donors and showed that all common markers and the corresponding subset proportions were preserved in all the conditions. Recovery was not significantly different between anticoagulated venous and nonanticoagulated capillary dried blood. Solid support pretreatment with EDTA is not necessary (Figure S5, Supporting Information).

2.5. Preservation of mRNA Integrity after Cell Sorting

To evaluate whether DBS storage maintains the integrity of mRNA molecules in leucocytes, we analyzed the expression profiles of seven B cell related genes (*CD79B*, *TCF3*, *HLA-DR*, *CXCR5*, *HLA-DOA*, *IGLL5*, and *SELL*) and two housekeeping genes (*B2M* and *GAPDH*) on CD45⁺CD19⁺ B cells (100 cells per replicate) sorted from DBS from two healthy donors and compared to fresh-sorted B cells from the same donor (Figure 3 and Figure S6 and Table S2, Supporting Information). We found that housekeeping genes *B2M* and to a lesser extent *GAPDH* are expressed in all DBS replicates as well as in fresh blood, confirming the ability to measure mRNA expression after DBS processing. We further confirmed the expression of typical B-cell markers *CD79b* and *CXCR5* that are expressed on all circulating mature B cells. The detection of certain genes (such as *HLA-DOA* or *SELL*) is heterogeneous depending on the blood donors. This might be influenced by the proportion of circulating naive versus memory B cell subpopulations in a given individual. The overall results indicate that the B cell expression signature is preserved from our modified DBS procedure.

2.6. Preservation of CD169 from COVID-19+ Patient Samples

In order to validate the use of the DBS strategy in a clinical diagnosis, we took advantage of the ability of the CD169 marker to discriminate SARS-CoV-2 infections and compared 76 patients with positive SARS-CoV-2 real time polymerase chain reaction (RT-PCR) to 48 healthy volunteers (Figure 4). In total, 39 (51%) women and 37 (49%) men, with a mean age of 60 ± 18 years and SARS-CoV-2 mean RT-PCR level of 24.2 ± 5.8 Cycle Threshold (CT) were included. Using flow cytometry, we observed that in the control method (fresh blood) as well as in the DBS method, patients with SARS-CoV-2 infections had significantly higher CD169 levels (23.37 ± 11.99 and 30.83 ± 10.32 respectively) than healthy volunteers (2.26 ± 0.32 and 8.46 ± 1.28 respectively). Receiver operating characteristic (ROC) analysis showed area under the curve (AUC) of 0.981 and 0.976, respectively. Sensitivity (96%) and specificity (100%) were obtained in the control method. Similar sensitivity (93%) and specificity (100%) were calculated for the DBS method, using the optimal cutoff values (greater than or equal to 3.55 on fresh blood, and 11.73 on DBS). Again, we noticed an increase in the background and staining levels in the DBS.

3. Discussion

In this study, we developed a new method for preserving blood on a solid support for cell analysis. After multiple optimizations, we were able to recover and analyze leucocytes from a DBS. Recoveries ranging from 50% to 70% were achieved, which is equivalent to or even better than PBMC cryopreservation, with the added advantage of preserving granulocytes.^[17] A few microliters of blood are sufficient for analysis and can be stored for at least 1 month at room temperature. This sample size provides the recovery of thousands of cells. Such quantities are suitable for numerous applications. Recovered cells can be analyzed with various probes

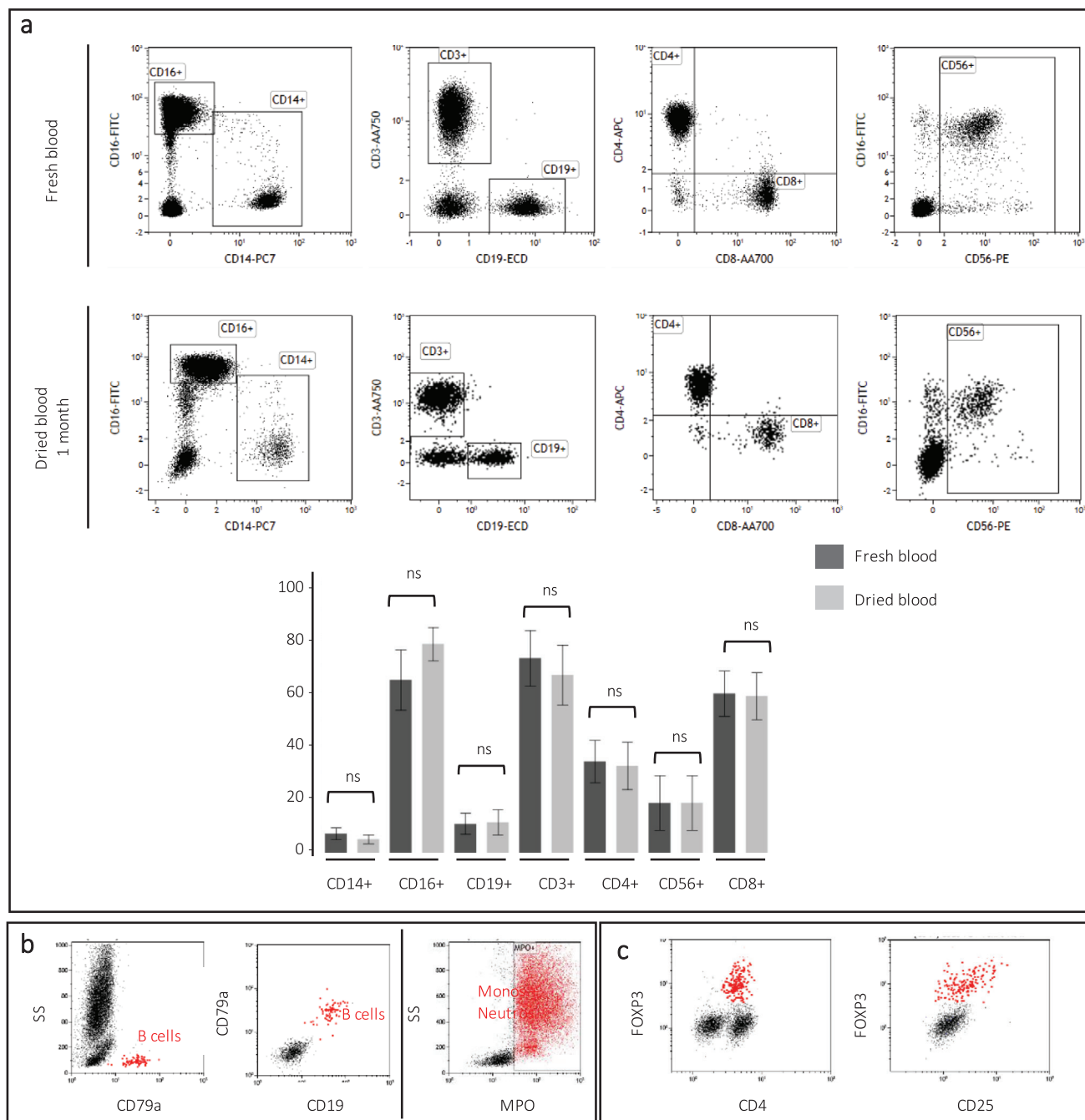


Figure 2. Marker preservation in DBS. a) General surface phenotyping markers: CD14, CD16, CD19, CD3, CD4, CD56, and CD8 after 1 month storage at RT. Comparison between fresh and dried blood on Student's *T*-test, ns: nonsignificant (p -values $> 0,05$); *: significant (p values $\leq 0,05$); $n = 10$ donors per condition, data are presented as mean \pm standard deviation. b) Intracellular leukemia orientation markers: CD79a and MPO and c) intracellular Tregs marker: FoxP3 after 1 month storage at RT.

and antibodies to easily detect not only surface but also intracellular markers. Both flow cytometry-based analysis and sorting are made possible by the proposed strategy. Subsequent mRNA quantification on DBS-collected cells was also successful.

Different types of DBS solid supports are available on the market. They are almost all made of pure cotton (cellulose) and can vary in pore size or thickness.^[18] They can be untreated or mod-

ified with various chemical solutions in order to increase stability of analytes or in any other way to improve the performance of a DBS sample.^[19,20] In this study, we found that leucocyte recovery was not possible from cellulose solid support, whereas we achieved a good recovery with a polyester solid support. This may be due to the structural properties of each solid support. Cellulose solid support is a network of thin fibers with tight mesh

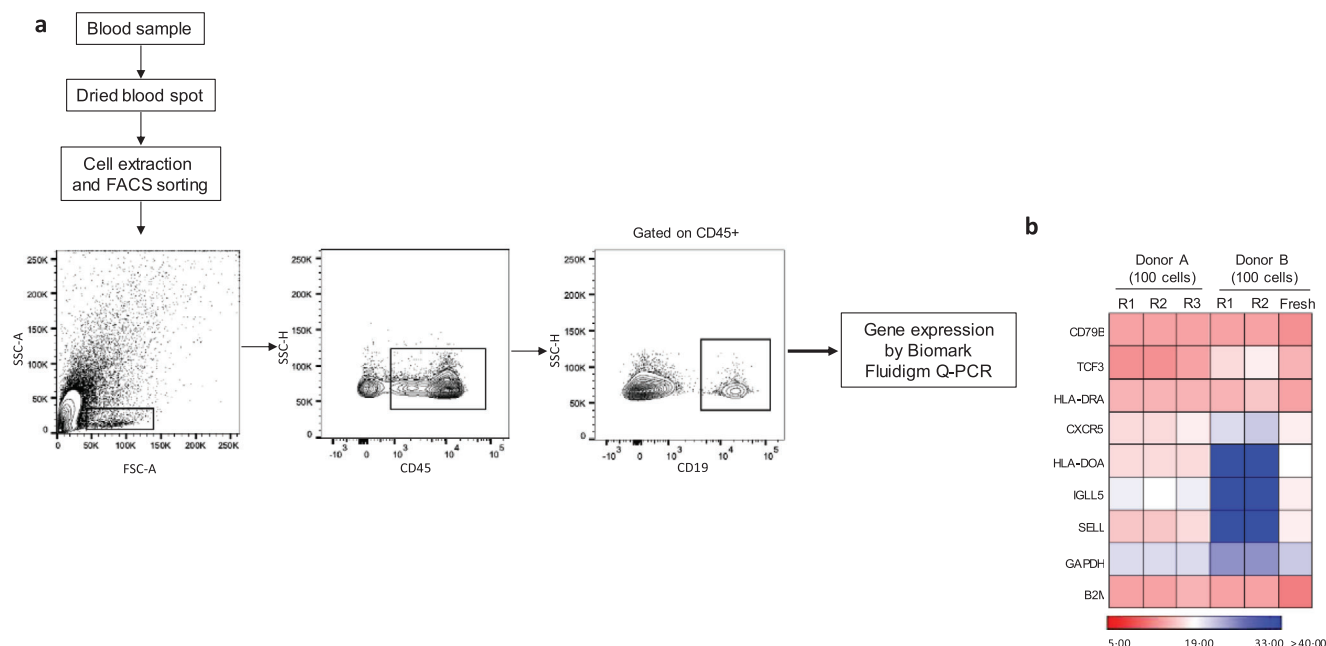


Figure 3. Gene expression profiling of B cells from DBS stored 24 h at RT. a) Representative FACS profiles of the sorting strategy from DBS CD45+CD19+ B cell populations. b) Gene expression analysis of CD19+ B cells isolated from two donors using DBS (R1, R2, R3 from donor A; R1, R2 from donor B) and fresh blood (from donor B). Expression levels (expressed as Ct values) of B cell-related genes were determined using nanofluidic Fluidigm array real-time PCR. *R* represents the number of replicates per donor.

that form pores about 0.2–1.2 μm diameter, which may not allow leucocyte (5–20 μm) holding, whereas polyester solid support is made of thicker fibers forming pores about 0.5–50 μm diameter. Also, the larger surface area of the cellulose may cause more and tighter cell adhesion. Furthermore, the plasma gas treatment of the polyester solid support by the manufacturer is described as improving the biointeraction with leucocytes.

Eluting leucocytes with a strong manual shaking provided the best recovery. This could be due to the lateral movement causes the solid support layers to break apart and to resuspend the cells. This step could be easily automated in the future.

Principal subpopulation proportions (lymphocytes, monocytes and granulocytes) were preserved. RBCs were automatically lysed and the recovered leucocytes were all permeabilized. This provided a path toward easy intracellular staining without the need for a separate permeabilization step. Recovered leucocytes had an impaired structure (reduced cell size and granularity), but adding a low fixative concentration (0.05% formaldehyde) improved their structural integrity without impairing antigen staining. In view of recent alerts on the carcinogenic risk of FA, this approach uses much less FA than current flow cytometry techniques and, therefore, may have health, ecological and sustainability impacts on top of being very straightforward.

Blood drying and storage were achieved at room temperature and humidity levels. Of course, these conditions may vary but can be easily controlled. DBS storage at a higher temperature (37°) slightly impaired the cell structure but provided similar leucocyte recovery and subpopulation frequencies. DBS are usually stored at RT and all our experiments worked at RT. Still, some analytes have been described as being sensitive to temperature (e.g., human immunodeficiency virus (HIV) RNA and

C-reactive protein). In these cases, stability may be improved by storing the sample at lower temperatures).^[21–24] Humidity is reported to affect sample quality by causing bacterial growth, degrading molecules of interest, or inducing a variation in extraction recovery.^[11] Complete drying is therefore preferable and can be easily achieved anywhere with desiccant added to an impermeable packaging.^[5]

Stable molecules are well preserved by drying, but the degradation or modification of less stable molecules can present a problem.^[18,23,25] Multiple treatments of the solid support have been described to preserve specific analytes with traditional DBS.^[26] In our hands, EDTA, poly-L-lysine, or protease inhibitor pretreatment improved the recovery slightly.

Using flow cytometry, we evaluated surface markers that monitor immune status, intracellular markers that classify hematological disorders, and an intranuclear marker that is relevant to autoimmune conditions. Although the background increased for all markers, reducing the signal-to-noise ratio, all markers tested were well detected. It is possible that the drying process and storage may increase the production of autofluorescent compounds. More efforts may be necessary to control this phenomenon.

Of course, we could not evaluate all the markers available for flow cytometry, but we have analyzed more than one hundred markers since we initiated this project and have shown that most applications could be considered. It is likely that other sample types, such as cell lines and bone marrow aspirates, may be amenable to this technique. If preferable from a workflow standpoint, one can also consider staining samples before drying (*data not shown*).

Using mRNA sequencing, a small leucocyte population such as B cells eluted from the DBS was interrogated for a series of

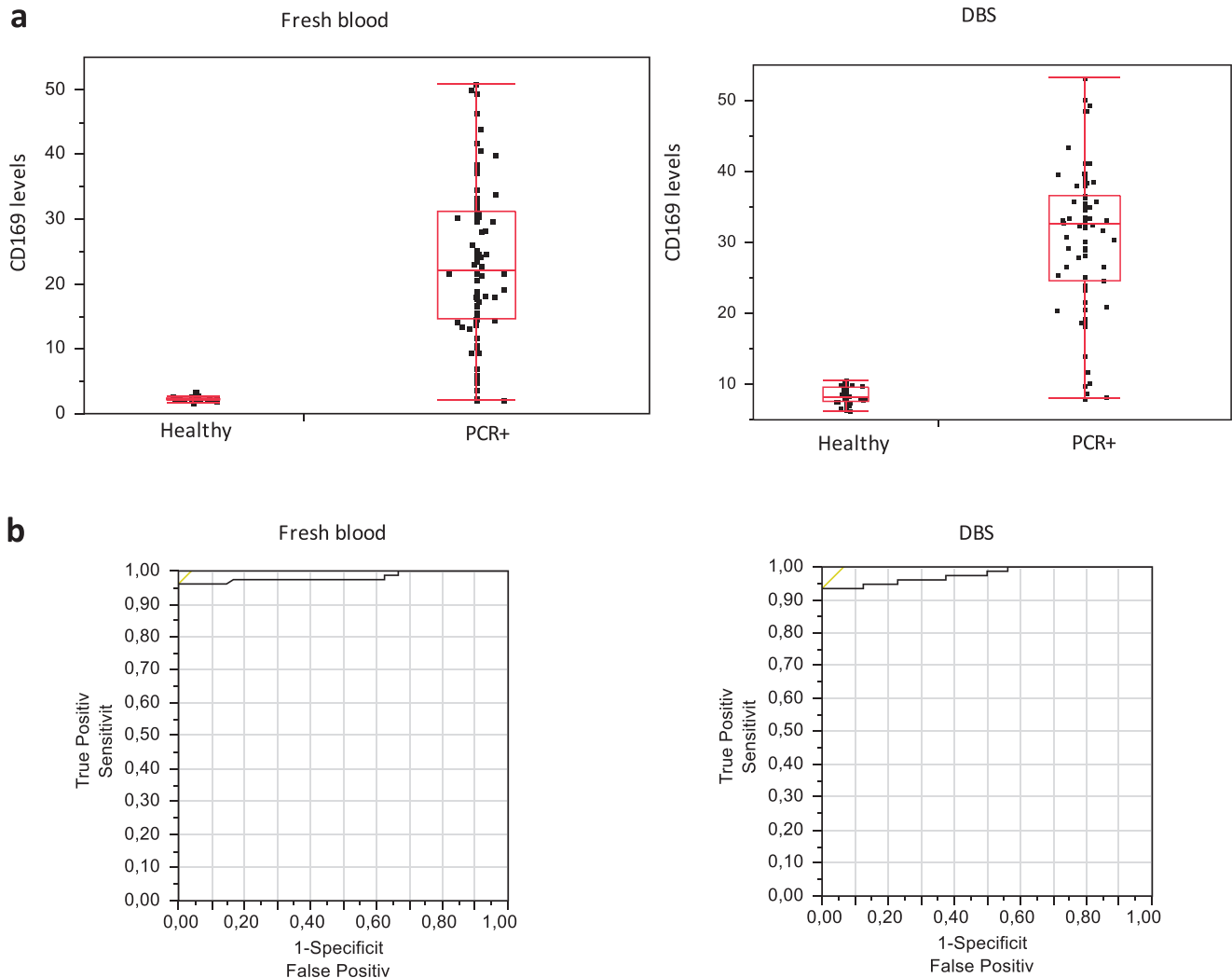


Figure 4. Preservation of CD169 from COVID-19+ patient samples on DBS stored one week at RT; $n = 76$. a) CD169 Index in fresh and dried blood and b) corresponding ROC curve.

specific gene transcripts. A slight decrease in mRNA quantities was observed in DBS compared to the fresh control, suggesting that the method could be further optimized, for example, by adding different RNase inhibitors.

Using the optimized method, we showed the preservation of the CD169 marker ability to discriminate between patients with and without SARS-COV-2. We may consider this method in a context of an active pandemic and lockdown since it would allow self-sampling/home-sampling and shipment to central laboratories. In line with this possibility, we found that blood drawn from a lancet fingerstick and directly spotted onto the solid support can yield cell recovery similar to anticoagulated blood without the need of EDTA pretreatment. Still, a formal evaluation of shipment conditions on the quality of DBS should be performed.

Overall, this study demonstrates that most leucocytes in a drop of blood can be easily stored and shipped using the DBS method. Storage of DBS requires little space, does not necessitate low temperatures, and DBS specimens are considered nonregulated, exempt materials by transportation authorities.^[27] Finger- or heel-

prick sampling is a noninvasive method that gives access to specialized testing to isolated people, patients from remote areas or even the general population requiring some type of screening. Cells recovered in the laboratory can be interrogated for their protein and nucleic acid contents, for a variety of applications encompassing immunological disorders, hematological malignancies and infectious diseases. Ultimately, DBS expands a universal sample storage method for metabolites, proteins, nucleic acids, to include cells.

4. Experimental Section

Blood Samples: For method optimization, blood samples were obtained from healthy volunteers from Saint Joseph Hospital (Marseille, France, declaration DC-2020-3857).

Control blood samples were obtained from the blood bank Etablissement Français du Sang (EFS), Marseille, France, agreement No. 7626NQ). Residual volumes of COVID-19 patient blood samples were obtained from La Timone Hospital – Emergency Department (Marseille, France). The

research was approved by the national ethic committee (Agreement ID Recherche Clinique Biomedicale (RCB) No. 2018-A02706-49). The studied population included patients older than 18 years with SARS-CoV-2-positive RT-PCR.

Fingerstick samples and their corresponding venous blood samples were obtained from volunteers at the Beckman Coulter Miami blood sampling center (Kendall, FL).

All enrolled patients provided informed consent and procedures followed were in accordance with the Helsinki Declaration. Care of the subjects was not modified and the results of the study had no influence on subjects' management. Cell analyses were performed on pseudonymized residual blood and all data collected in the study were retrieved from subject records by the practitioner.

Recovering Leucocytes from a Dried Blood Spot: Preliminary Testing: Eight different methods have been compared on 6 donors: 20 μ L of EDTA blood (Methods 1, 2, 5, and 6) or heparinized blood (Methods 3, 4, 7, and 8) were placed on two types of solid support: cellulose matrix (Whatman filter) from Whatman (Maidstone, UK) (Methods 2, 4, 6, and 8) or polyester matrix (Leukosorb B filter) from Pall (New York, USA) (Methods 1, 3, 5, and 7). Samples were left at least 2 h on the bench for the blood to dry. The solid supports were then stored in nonsterile plastic pouches at RT (18–25 °C) for at least 24 h. To recover the leucocytes, each blood spot (1 cm²) was cut out and placed in a flow cytometry tube (12 \times 75 mm, 5 mL). The dried blood was then lysed and stained according to a newly described one-step staining procedure.^[28] Briefly, a mix of 1 mL RBC lysing solution (VersaLyse, Beckman Coulter, Brea, CA, USA) with 0,05% FA (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) and 5 μ L of antibodies targeting the pan-leucocyte marker CD45- phycoerythrin (PE)-cyanin-7 (PC7), 20 μ L of CD15-fluorescein isothiocyanate (FITC) antibodies targeting neutrophils and eosinophils and 10 μ L of CD14- phycoerythrin-Texas Red (ECD) antibodies targeting monocytes, all from Beckman Coulter, were added to the tubes containing the spots. The samples were incubated for 30 min on the bench to enable red blood cells lysis, leucocyte rehydration and staining. The tubes containing the sample were vortexed 5 s \times 5 times (Methods 5–8). Alternatively, the tube was shaken manually in an up-and-down motion until the solid support disintegrated into small pieces (approximately 15 shakes) (Methods 1–4). The eluates were filtered through CellTrics 50 μ m filters from Sysmex (Kobe, Japan) before analysis in a Navios flow cytometer (Beckman Coulter). Leucocytes were gated using Forward Scatter (FSC) and Side Scatter (SSC) parameters, and CD45 expression. Recovery was calculated as the number of leucocytes eluted from the DBS, divided by the number of fresh blood leucocytes counted in the same conditions (20 μ L of blood diluted in 1 mL elution buffer).

In order to determine the minimal blood drying timeframe, a few drops of 20 μ L blood (allowing a better weighing precision) were spotted on a polyester solid support that was weighed every 30 min.

In order to evaluate cell structure during the drying process, leucocytes were stained every 30 min after spotting, in 1 mL lysing solution 0,05% FA and 5 μ L CD45- allophycocyanin (APC), and eluted by manual shaking.

Cell permeability was assessed using the nonpermeant DNA stain propidium iodide (PI, Sigma-Aldrich) at 10 μ g mL⁻¹.

All experiments were run at RT and local humidity (30–60%). Temperature and humidity levels are routinely recorded in the laboratory using data logger Ecolog TH1 from Elpro (Buchs, Switzerland).

Method Optimization—Optimal Elution Conditions: Different elution buffers were tested in triplicates: RBC lysing solution, PBS 1X, and PBS 1X supplemented with FA at different concentrations; 0,025%, 0,05%, 0,1%.

Different elution methods were tested in triplicates: vortex (from Bioblock Scientific Heidolph), rotating mixer (from Ratek), automated orbital shaker (Biomek from Beckman Coulter) and manual shaking.

Method Optimization—Optimal Drying Conditions: Different solid support pretreatments were tested in triplicates: 20 μ L PBS 1X, 20 μ L EDTA sodium salt at 1,5–12 mg mL⁻¹ from Sigma-Aldrich, 20 μ L lithium heparin at 170 IU from Becton Dickinson (New Jersey, USA), 20 μ L of poly-L-lysine at 0,1 mg mL⁻¹ (Sigma-Aldrich), and 5, 10, 20, and 40 μ L of protease inhibitors 5X (Sigma-Aldrich) were placed on the solid supports and allowed to dry for at least 2 h before blood spotting.

Method Optimization—Optimal Storage Conditions: To determine optimal storage conditions, the DBS were stored in triplicates 7 d in a plastic bag at 4 °C, RT or 37 °C. After storage, leucocytes were recovered, and frequencies and structure measured.

Cell Marker Preservation Analysis: Fresh and dried blood samples from ten donors were processed in parallel. Fresh EDTA-anticoagulated blood samples were processed according to the one-step staining procedure: 20 μ L of blood were incubated 15 min in a mix of 1 mL of lysing solution and conjugated antibodies. DBS have been prepared for each fresh EDTA- anticoagulated blood sample. The DBS were stored 1 month at RT then processed according to the optimized DBS method: each DBS was cut out and placed in a flow cytometry tube (12 \times 75 mm, 5 mL). A mix of 1 mL PBS 1X, 0,05% FA and conjugated antibodies was added to the tube. The samples were then left for 30 min on the bench to enable leucocyte rehydration and staining. The tubes were then shaken up until solid support dissociation then the eluates were filtered through CellTrics 50 μ m filters from Sysmex (Kobe, Japan) before analysis in a Navios flow cytometer.

The immune monitoring (IM) Basic Duraclone panel (Beckman Coulter) was used for labeling. The panel contains CD3-allophycocyanin-Alexa Fluor-750 (APC-A750), CD4-APC, CD8-Alexa Fluor-700 (A700), CD14-PC7, CD16-FITC, CD19-ECD, CD56-R-PE, and CD45-Krome Orange (KrO); all from Beckman Coulter.

Using the same method, intracellular staining was performed after 1 month storage. The following conjugates were used: CD79a-PE; CD19-APC, MPO; FoxP3-Alexa Fluor 647 (A647); CD4-Pacific Blue; and CD25-PE; all from Beckman Coulter. For FoxP3 staining, two final washes were added.

Venous versus Capillary Dried Blood Comparison: EDTA-anticoagulated venous blood and capillary blood samples have been obtained in parallel from three donors at Miami blood sampling center. Capillary blood samples were spotted in triplicate on three EDTA-pretreated and three regular polyester solid supports. Venous blood samples were processed fresh, then also dried in triplicate on the regular polyester solid supports. Each solid support was weighed before and right after blood deposit in order to evaluate the volume spotted. All dried samples have then been shipped to Marseille site at RT with an express delivery and analyzed within 5 d. Fresh and dried sample contents were compared with IM Basic Duraclone panel.

Gene Expression Analysis by Microfluidic Real-Time PCR: Blood was dried on a polyester solid support under RNase-free conditions and stored 24 h at RT. Leucocytes were eluted in 1 mL elution buffer (PBS 1 \times 0,05% FA) containing 5 μ L RNase inhibitors from Applied Biosystems (Foster City, USA) and antibody conjugates CD45-APC and CD19-PE all from Beckman Coulter.

Bulk B cell pools of 100 cells were fluorescence-activated cell sorting (FACS)-sorted into 96-well plates (Influx Becton Dickinson cell sorter, Franklin Lakes, USA) containing RT-preamplification mix and external gene expression primers for selected B cell genes (CD79B, TCF3, HLA-DR, CXCR5, HLA-DOA, IGLL5, SELL) and housekeeping genes (GAPDH, B2M) according to published protocols.^[29,30] After 20 cycles of cDNA preamplification, the cDNAs were diluted and processed for multiplex gene expression profiling using the BioMark Real-time PCR system (Fluidigm, San Francisco, USA) using inventoried TaqMan gene expression assay in 48.48 dynamic arrays. Primers and TaqMan assays used for real time quantitative PCR (RT-qPCR) are displayed in Table S1 in the Supporting Information. The Cycles Threshold (CT) values from each pool were calculated from the BioMark system's software and used as such without normalization.

CD169 Preservation on DBS from COVID-19 Patients: Fresh EDTA-anticoagulated blood samples were processed in parallel according to the one-step staining procedure and the DBS method.

The results of fresh samples were described,^[31] and then the DBS were analyzed after one-week of storage at RT. Both fresh and dried blood were stained with anti-CD169-PE and anti-CD45-PC7 (Beckman Coulter). CD169 levels are shown as median of fluorescence intensities on monocytes.

Flow Cytometry Data Analysis and Statistical Analysis: Data were collected on a three-laser, ten-color Navios flow cytometer and analyzed using Kaluza Analysis Software (version 2.1; Beckman Coulter).

Comparison of quantitative variables between the different groups was performed on JMP software (version 10; SAS Institute, Cary, NC, USA).

For marker preservation experiments, comparison between leucocyte frequencies on fresh and dried blood were done using Student's *T*-test; $n = 10$.

The ability of CD169 index to discriminate between COVID-19+ and COVID-19- patients was investigated using the ROC curve analyses; $n = 76$.

For the elution method optimization and storage temperature experiments, leucocyte recovery percentages were compared using Tukey-Kramer honestly significant difference (HSD) and subset frequencies were compared using Dunnett's test.; $n = 3$.

For solid support pretreatment experiments, leucocyte recovery percentages were compared on Student's *T*-test; $n = 3$.

For fingerstick experiments, comparison between subset frequencies in venous and capillary dried blood was done using Student's *T*-test; $n = 3$.

For all tests, data were presented as mean \pm standard deviation. *P*-values less than or equal to 0.05 were considered statistically significant: *; and *p*-values higher than 0.05 were considered statistically nonsignificant: ns.

Supporting Information

Supporting Information is available from the Wiley Online Library or from the author.

Acknowledgements

The authors thank the Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy (CIML) cytometry core facilities for cell sorting experiments. The authors are grateful to Norma Rivero and Sailesh Gopalakrishnapillai (Miami) for their precious assistance in fingerstick sample collection and shipping. The authors thank Jeffrey Short and Joseph Olechno for their critical review of the paper.

Conflict of Interest

I.A.B. is recipient of Conventions Industrielles de Formation par la Recherche (CIFRE) Ph.D. grant (No. 2018/1212) from the ANRT (National Agency for Research and Technology). This work was supported by Beckman Coulter through donations of the research reagents used in the flow cytometry experiments and participation of the four employees: I.A.B., P.B., J.M.B., and F.M. The sorting and RT-qPCR experiments were supported by INSERM and CNRS institutions (S.R., N.M.-K., and F.G.) and ARC Foundation (S.R.).

Author Contributions

J.M.B., F.M., I.A.B., S.R., and F.G. designed the study. I.A.B., N.M.-K., and P.B. conducted experiments and acquired data. P.-E.M. and P.M. supervised clinical procedures. I.A., M.L., and T.M. collected samples and analyzed demographic and clinical data. I.A.B., P.B., and F.M. provided antibody panels and the flow cytometry platform. N.M.-K. and S.R. provided the cell sorting and RT qPCR platform. I.A.B., N.M.-K., P.B., J.M.B., S.R., F.G., and F.M. analyzed experimental data. I.A.B., N.M.-K., S.R., F.G., and F.M. wrote the paper. Each co-author has revised the paper for important intellectual content. All authors read and approved the final paper.

Data Availability Statement

The study report, study protocol, and data that support the findings of this study are available in the Supporting Information and from the cor-

responding author upon reasonable request. The authors certify that this paper reports original research data.

Keywords

analysis, cells, dried blood spots

Received: January 26, 2021

Revised: May 3, 2021

Published online: July 18, 2021

- [1] P. Mazur, *Am. J. Physiol.: Cell Physiol.* **1984**, *247*, C125.
- [2] A. M. Diks, C. Bonroy, C. Teodosio, R. J. Groenland, B. de Mooij, E. de Maertelaere, J. Neiryndck, J. Philippé, A. Orfao, J. J. M. van Dongen, M. A. Berkowska, *J. Immunol. Methods* **2019**, *475*, 112616.
- [3] V. Schmidt, *Clin. Chem.* **1986**, *32*, 213.
- [4] R. Guthrie, A. Susi, *Pediatrics* **1963**, *32*, 338.
- [5] L. Andrlova, R. Kandari, *BLL* **2019**, *120*, 223.
- [6] B. L. Therrell, C. D. Padilla, J. G. Loeber, I. Kneisser, A. Saadallah, G. J. C. Borrajo, J. Adams, *Semin. Perinatol.* **2015**, *39*, 171.
- [7] W. H. Hannon, *Clinical and Laboratory Standards Institute, Blood Collection on Filter Paper for Newborn Screening Programs: Approved Standard*, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, **2013**.
- [8] K. A. Strnadová, M. Holub, A. Mühl, G. Heinze, R. Ratschmann, H. Mascher, S. Stöckler-Ipsiroglu, F. Waldhauser, F. Votava, J. Lebl, O. A. Bodamer, *Clin. Chem.* **2007**, *53*, 717.
- [9] N. Grüner, O. Stambouli, R. S. Ross, *J. Vis. Exp.* **2015**, *97*, 52619.
- [10] A. Phillips, A. Shroufi, L. Vojnov, J. Cohn, T. Roberts, T. Ellman, K. Bonner, C. Rousseau, G. Garnett, V. Cambiano, F. Nakagawa, D. Ford, L. Banshi-Matharu, A. Miners, J. D. Lundgren, J. W. Eaton, R. Parkes-Ratanshi, Z. Katz, D. Maman, N. Ford, M. Vitoria, M. Doherty, D. Dowdy, B. Nichols, M. Murtagh, M. Wareham, K. M. Palamountain, C. Chakanyuka Musanhu, W. Stevens, D. Katzenstein, A. Ciaranello, R. Barnabas, R. S. Braithwaite, E. Bendavid, K. J. Nathoo, D. van de Vijver, D. P. Wilson, C. Holmes, A. Bershteyn, S. Walker, E. Raizes, I. Jani, L. J. Nelson, R. Peeling, F. Terris-Prestholt, J. Murungu, T. Mutasa-Apollo, T. B. Hallett, P. Revill, *Nature* **2015**, *528*, S68.
- [11] P. van Amsterdam, C. Waldrop, *Bioanalysis* **2010**, *2*, 1783.
- [12] L. Resnick, K. Veren, S. Z. Salahuddin, S. Tondreau, P. D. Markham, *JAMA, J. Am. Med. Assoc.* **1986**, *255*, 1887.
- [13] W. Bond, M. Favero, N. Petersen, C. Gravelle, J. Ebert, J. Maynard, *Lancet* **1981**, *317*, 550.
- [14] A.-S. Bedin, A. Makinson, M.-C. Picot, F. Mennechet, F. Malergue, A. Pisoni, E. Nyiramigisha, L. Montagnier, K. Bollere, S. Debiesse, D. Morquin, P. Bourgoïn, N. Veyrenche, C. Renault, V. Foulongne, C. Bret, A. Bourdin, V. Le Moing, P. Van de Perre, E. Tuailon, *J. Infect. Dis.* **2021**, *223*, 562.
- [15] M. Michel, F. Malergue, I. A. Belkacem, P. Bourgoïn, P.-E. Morange, I. Arnoux, T. Miloud, M. Million, H. Tissot-Dupont, J.-L. Mege, J.-M. Busnel, J. Vitte, *medRxiv*, 2020.10.22.20215749.
- [16] M. Roussel, J. Ferrant, F. Reizine, S. L. Gallou, J. Dulong, S. Carl, M. Lesouhaitier, M. Gregoire, N. Bescher, C. Verdy, M. Latour, I. Bézier, M. Cornic, S. Leonard, J. Feuillard, V. K. Tiwari, J. M. Tadié, M. Cogné, K. Tarte, *bioRxiv*, 2020.09.22.307975.
- [17] C. P. Corkum, D. P. Ings, C. Burgess, S. Karwowska, W. Kroll, T. I. Michalak, *BMC Immunol.* **2015**, *16*, 48.
- [18] W. Li, F. L. S. Tse, *Biomed. Chromatogr.* **2010**, *24*, 49.
- [19] Z. Shen, P. Kang, S. V. Rahavendran, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2012**, *67–68*, 92.
- [20] E. Crawford, J. Gordon, J.-T. Wu, B. Musselman, R. Liu, S. Yu, *Bioanalysis* **2011**, *3*, 1217.

- [21] S. C. Aitken, C. L. Wallis, W. Stevens, T. R. de Wit, R. Schuurman, *PLoS One* **2015**, *10*, e0131541.
- [22] E. Brindle, M. Fujita, J. Shofer, K. A. O'Connor, *J. Immunol. Methods* **2010**, *362*, 112.
- [23] D. H. Chace, V. R. De Jesús, A. R. Spitzer, *Bioanalysis* **2014**, *6*, 2791.
- [24] A. H. Metherel, R. C. Hogg, L. M. Buzikievich, K. D. Stark, *Lipids Health Dis.* **2013**, *12*, 22.
- [25] V. R. De Jesús, D. H. Chace, *Bioanalysis* **2012**, *4*, 645.
- [26] R. Kandar, X. Stramova, P. Drabkova, M. Brandtnerova, *J. Chromatogr. Sci.* **2015**, *53*, 879.
- [27] Centers for Disease Control and Prevention (2017) Shipping Guidelines for Dried-Blood Spot Specimens. Updated October 24, 2017. https://www.cdc.gov/labstandards/pdf/nsqap/Bloodspot_Transportation_Guidelines.pdf
- [28] P. Bourgoïn, J. Hayman, T. Rimmelé, F. Venet, F. Malergue, G. Monneret, *J. Immunol. Methods* **2019**, *470*, 59.
- [29] N. Mossadegh-Keller, R. Gentek, G. Gimenez, S. Bigot, S. Mailfert, M. H. Sieweke, *J. Exp. Med.* **2017**, *214*, 2829.
- [30] L. J. McHeyzer-Williams, P. J. Milpied, S. L. Okitsu, M. G. McHeyzer-Williams, *Nat. Immunol.* **2015**, *16*, 296.
- [31] P. Bourgoïn, T. Soliveres, A. Barbaresi, A. Loundou, I. A. Belkacem, I. Arnoux, D. Bernot, M. Loosveld, P.-E. Morange, P. Michelet, F. Malergue, T. Markarian, *Cytometry, Part A* **2021**, *99*, 435.

La méthode de préservation du sang décrite s'effectue entièrement à **température ambiante** et est compatible avec un **prélèvement de sang au bout du doigt** (figure 27). Le stockage et le transport des échantillons dans ce format sont simples et peu coûteux. 50 à 70% des leucocytes séchés sur un support solide spécifique en polyester, et élués par une agitation manuelle, ont été récupérés. Alors que les globules rouges étaient lysés par le séchage, la majorité des leucocytes étaient préservés mais présentaient une structure altérée qui a pu être améliorée par l'ajout de fixateur dans le tampon d'éluion (même procédure que la conservation des échantillons marqués pendant 72h, décrite dans le paragraphe précédent). Les leucocytes étaient perméabilisés, ce qui a permis un marquage facile de tous les compartiments cellulaires. Les **marqueurs membranaires et les ARN communs étaient préservés**. Avec cette méthode, le sang peut être séché, expédié et/ou stocké pendant au moins un mois, puis les leucocytes peuvent être récupérés pour une grande variété d'analyses, facilitant potentiellement les applications biomédicales dans le monde entier.

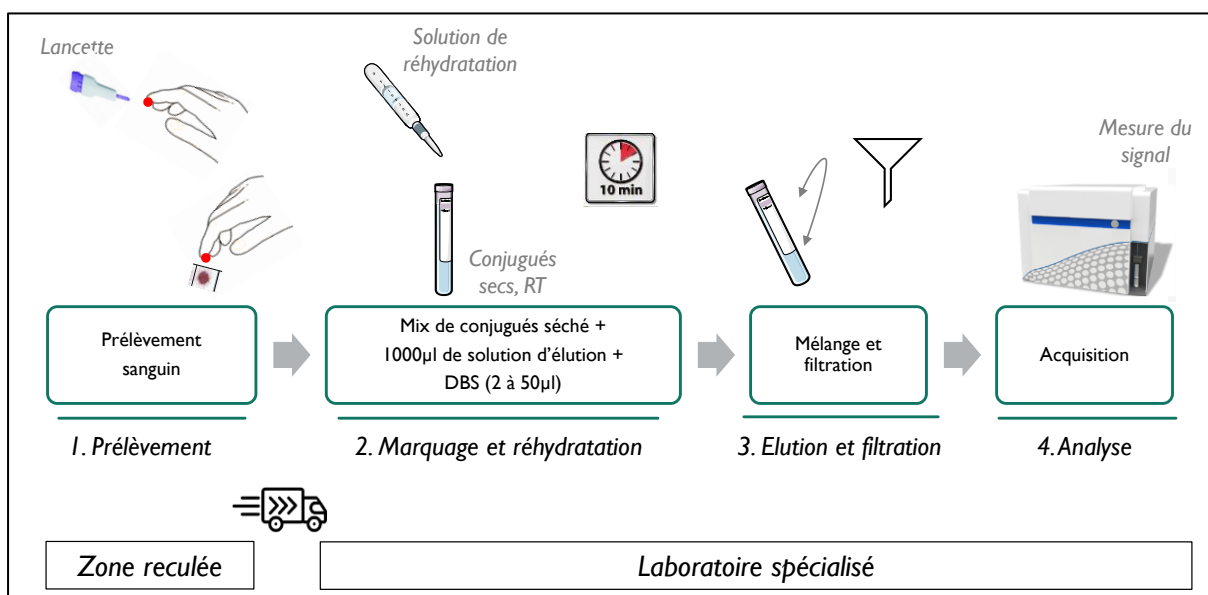


Figure 27 : Caractéristiques globales de la méthode d'analyse des « Dried Blood Spots » par cytométrie en flux. RT : « Room Temperature », température ambiante. DBS : « Dried blood spots », gouttes de sang séchés.

Des investigations complémentaires ont été réalisées pour évaluer une autre méthode de préservation du sang total par congélation directe. La technique consistait à congeler les échantillons de sang entier directement et sans adjuvants ou étapes de préparation supplémentaires. Cette méthode offre la possibilité de congeler des échantillons à -20°C sans isolement du sérum ni réactifs à pipeter, donc sans matériel de laboratoire. En comparant différentes méthodes, nous avons observé que le **DMSO n'améliorait que partiellement la viabilité** des cellules. Lors de la décongélation des échantillons congelés sans DMSO, les cellules sanguines étaient **majoritairement perméabilisées/ mortes** en raison de l'absence d'adjuvants protecteurs. Cependant, cela n'a **pas eu d'impact sur les analyses d'immunophénotypage** car les proportions cellulaires et les niveaux d'expression des biomarqueurs dans les échantillons congelés étaient proches de ceux des échantillons frais. Par conséquent, nous avons considéré que le **DMSO était inutile** pour les applications simples d'immunophénotypage contrairement à des applications d'activation ou de prolifération cellulaire nécessitant que la cellule soit vivante. En perspective cet outil pourrait être utile pour faciliter les **études multicentriques ou prospectives** (établissement de **bio-banques**) mais permettrait aussi d'explorer des bio-banques déjà constituées dans d'autres contextes.

Ces recherches ont fait l'objet d'une publication dans « *Future Microbiology* » intitulée : « **La congélation directe du sang total permet l'analyse des marqueurs leucocytaires par cytométrie de flux : une preuve de concept** », présentée en annexe 1 ²³³.

3. Evaluation clinique des procédures mises au point

3.1. La détection des infections bactériennes et virales en service d'urgences adultes

Le service des urgences est l'un des endroits où l'identification d'une cause bactérienne, virale ou non-infectieuse est essentielle dans la prise en charge du syndrome fébrile. L'objectif du travail ci-après a été d'évaluer la méthode en une étape associée aux biomarqueurs CD64 sur les neutrophiles (nCD64) et CD169 sur les monocytes (mCD169) afin de déterminer leurs performances diagnostiques dans le triage des patients fébriles lors de deux périodes sensibles en **service d'urgences adultes : la période hivernale de 2019 et la vague épidémique de la COVID-19 de 2020.**

Dans une première cohorte, 85 patients adultes se présentant aux services d'urgences lors de la période hivernale pour une potentielle infection ont été inclus. Ils ont été répartis en quatre groupes en fonction de leur dossier clinique : 38 (45%) patients ont été diagnostiqués avec des infections bactériennes, 11 (13%) avec des infections virales et 29 (34%) avec des co-infections. La majorité des infections virales étaient dues au virus de la grippe A ou au virus respiratoire syncytial, tandis que la majorité des d'infections bactériennes étaient dues à *Streptococcus pneumoniae* et *Escherichia coli*. Dans une deuxième cohorte, 76 patients présentant une infection confirmée par le SARS-CoV-2 ont été inclus. Sur les échantillons de sang total de tous ces patients, nous avons mesuré les deux biomarqueurs nCD64 et mCD169 en procédant selon la méthode en une étape.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans « *Cytometry part A* » intitulée : « **CD169 et CD64 pourraient aider à différencier les infections bactériennes de la COVID-19 ou d'autres infections virales dans les services d'urgence** », présentée en annexe 2. ²³⁴

Sur la première cohorte de patients fébriles se présentant aux urgences lors de la période hivernale 2019, le nCD64 et le mCD169 ont montré une **sensibilité de 90 % et 80 %, et une spécificité de 78 % et 91 %**, pour identifier les patients atteints d'infections bactériennes ou virales respectivement (figure 28).

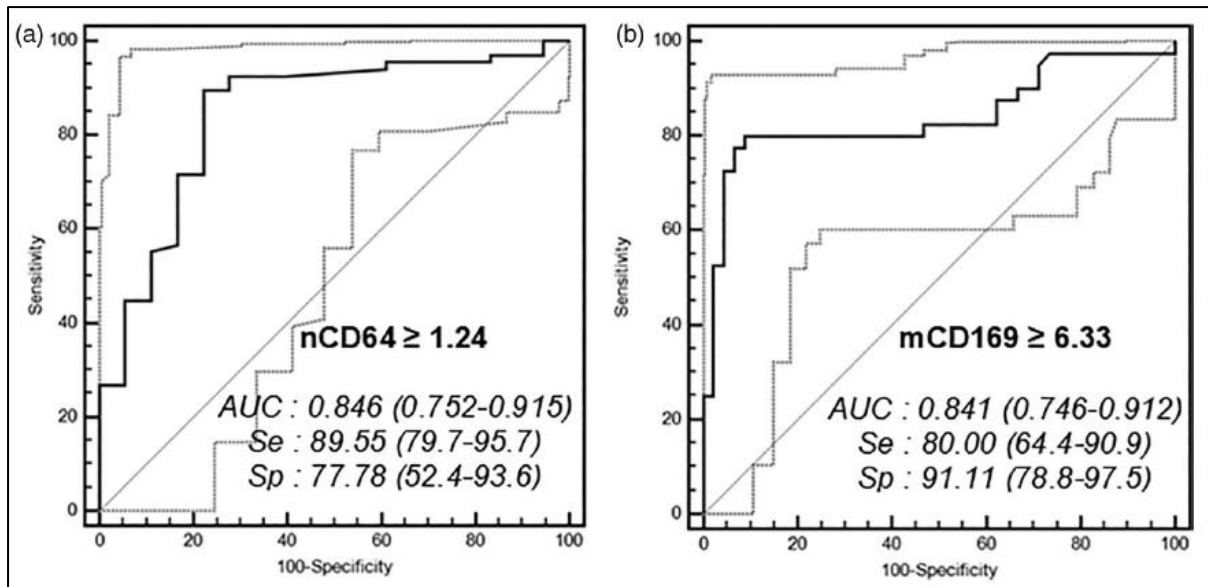


Figure 28 : Analyse en courbe ROC (« Receiver operating characteristic ») pour la discrimination des infections bactériennes avec (a) nCD64 et des infections virales avec (b) mCD169. Les seuils optimaux pour chaque biomarqueur sont indiqués avec les valeurs calculées de la spécificité (Sp) et de la sensibilité (Se). L'aire sous la courbe (AUC) et l'intervalle de confiance à 95 % sont également indiqués pour chaque analyse ROC. Les courbes d'intervalle de confiance sont représentées par des lignes pointillées gris clair.

Sur la seconde cohorte de patients présentant une RT-PCR positive au SARS-CoV-2, le mCD169 a montré une **sensibilité de 95% et une spécificité de 100%** (figure 29). Parmi les quatre patients faux négatifs (négatifs en CD169 mais positifs à la RT-PCR), deux étaient symptomatiques depuis plus de 10 jours et présentaient un résultat RT-PCR très faible (seuils de cycle à 30 et 32), compatible avec la disparition de la maladie. Les deux autres patients se sont présentés aux urgences pour des raisons autres que des symptômes infectieux, ils étaient asymptomatiques pour la COVID-19 et avaient un résultat RT-PCR très faible (seuils de cycle à 32 et 34).

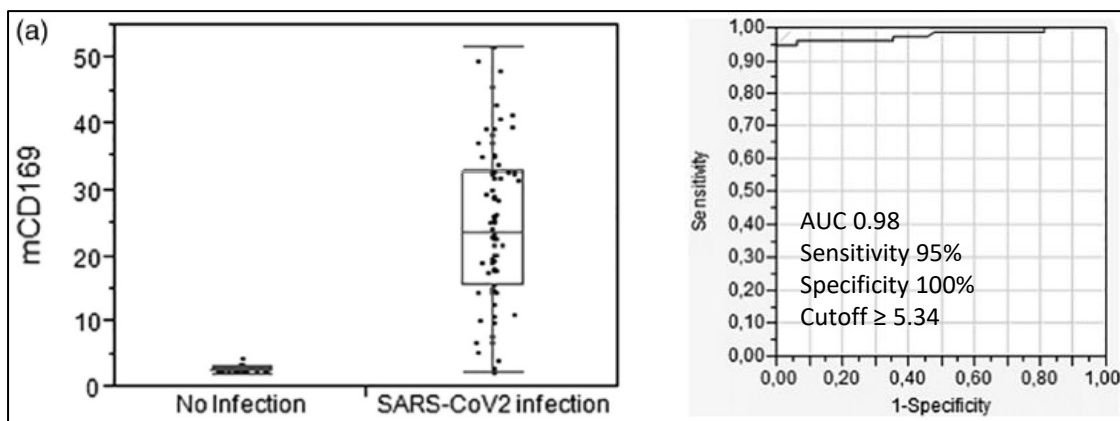


Figure 29 : Niveau de mCD169 (a) et analyse ROC (b) des patients atteints d'une infection par le SRAS-CoV-2 par rapport aux volontaires sains. L'aire sous la courbe (AUC), le seuil optimal (« Cutoff »), la spécificité (« specificity ») et de la sensibilité (« sensitivity ») sont indiqués.

Rappelons également que le mCD169 avait été évalué et était préservé dans les échantillons de sang séché (résultats publiés dans « *Advanced science* ») ou congelé (résultats publiés dans « *Future Microbiology* »). La technique des « Dried Blood Spots » avait notamment montré d'aussi bonnes performances que le sang frais dans la détection du SARS-CoV-2 par la mesure du mCD169.

Ces études dans leur ensemble montrent que la mesure des biomarqueurs mCD169 et nCD64 est prometteuse pour le triage des patients en service d'**urgences** dans la **routine, ainsi que dans les zones à faibles ressources**, pendant les **épidémies saisonnières**, mais pourrait aussi probablement être appliquée à toute **nouvelle maladie infectieuse émergente**, ce qui serait d'autant plus utile pendant les premiers mois où les tests spécifiques ne sont pas encore disponibles.

Les résultats montrent également que certains patients infectés par le SARS-CoV-2 présentent un niveau curieusement accru de nCD64, pouvant indiquer une co-infection bactérienne, un effet secondaire de la maladie, ou pourquoi pas une **forme sévère**. Dans ce travail, une **bonne représentation des infections les plus communes** a été obtenue, cependant elle n'est pas suffisante pour permettre une validation complète des biomarqueurs. D'autres **cohortes de patients ont donc été analysées** dans différents services/ hôpitaux pour valider la spécificité et la sensibilité calculées. Aussi, les différents types de symptomatologie de la COVID-19 n'ont pas été abordés. Nous avons donc analysé si les **performances du mCD169 lors du dépistage de la COVID-19 étaient affectées par le niveau de gravité des symptômes** (symptomatique/ asymptomatique).

3.2. Le screening des patients atteints de la COVID-19

Dans une étude suivante, nos collaborateurs ont inclus 177 **patients ambulatoires** ayant présenté à un temps T une PCR positive au SARS-CoV-2. 80 étaient à un stade précoce de la maladie (≤ 14 jours après l'apparition des symptômes), 71 à un stade avancé (≥ 15 jours) et 26 étaient asymptomatiques. En utilisant la méthode en une étape, le rapport du CD169 monocytes/ lymphocytes (R-CD169) a été mesuré chez tous les patients inclus en parallèle d'une RT-PCR ciblant le SARS-CoV-2.

Ces travaux ont fait l'objet d'une soumission, en cours de revue, dans « *SAGE Open Medicine* » intitulée : « **Un test rapide, facile et évolutif pour le dépistage ambulatoire des monocytes CD169 dans le sang total lors des épidémies** », présentée en annexe 3.²³⁵

Sur cette cohorte de 177 patients présentant une infection confirmée par le SARS-CoV-2, la mesure de l'index CD169 a permis de détecter les patients SARS-CoV-2 RT-PCR+ avec une **sensibilité élevée de 98 % et 100 % ainsi qu'une spécificité de 50 % et 84 % chez les patients en phase précoce** (symptomatiques depuis moins de 14 jours) **et asymptomatiques respectivement** (figure 30). La faible spécificité mesurée (50 et 84%) peut être expliquée par l'apparition fréquentes de faux-négatifs (de 10 à 30 %) à la RT-PCR. Cette étude suggère que malgré l'absence de symptômes, une **réponse systémique** orchestrant le contrôle de l'infection a lieu, plutôt qu'un contrôle purement local de l'infection (immunité tissulaire). Ainsi, **un triage de la population** par ce marqueur pourrait sans doute être mis en place.

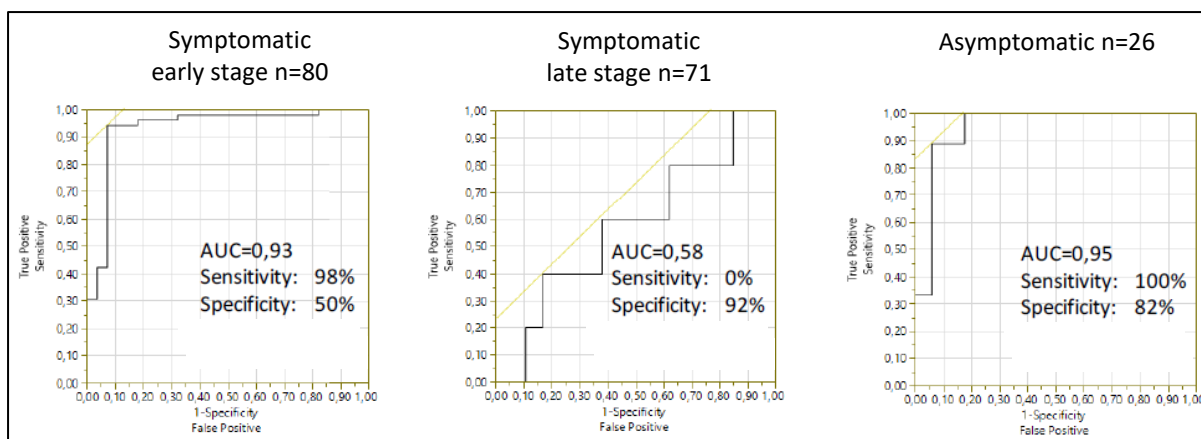


Figure 30 : Analyse en courbe ROC de l'indice CD169 (rapport entre les signaux des monocytes et des lymphocytes) chez des donneurs COVID-19 symptomatiques et asymptomatiques en fonction des résultats de la RT-PCR concomitante. L'aire sous la courbe (AUC) ainsi que la sensibilité (« sensitivity ») et la spécificité (« specificity ») sont donnés à la valeur seuil de 3,5.

Par ailleurs, l'index **CD64** était légèrement régulé à la hausse dans 25 % des cas (45/177). Chez les patients présentant une **maladie légère**, **HLA-DR** était exprimée à des niveaux **normaux ou légèrement accrus**, un résultat attendu par opposition à la **diminution** habituellement observée dans les **cas graves**. Ainsi, la mesure des niveaux de biomarqueurs tels que le CD64 et HLA-DR permettrait de stratifier les patients, et peut-être d'**identifier ceux à risque** de développer une maladie plus **sévère**. Toutes ces observations nous ont poussé à étudier le potentiel de plusieurs biomarqueurs, dont le CD169, le CD64 et HLA-DR, à **discriminer les formes modérées à sévères**. Par ailleurs, les biomarqueurs d'intérêt ayant été analysés jusqu'alors uniquement à un temps T, leur **cinétique** devrait être étudiée afin de **comprendre leur délai de survenue** après l'infection ainsi que **leur évolution** dans la circulation sanguine.

3.3. Le suivi et la stratification des patients atteints de la COVID-19

Nos collaborateurs ont analysé **68 patients hospitalisés**, atteints de la COVID-19 en utilisant la méthode en une étape, puis les niveaux d'expression du marqueur ont été corrélés avec les résultats cliniques des patients et les paramètres biologiques.

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans « *pathogens* » intitulée : « **Un rapport élevé de CD169 entre les monocytes et les lymphocytes reflète le besoin en oxygène chez les patients atteints de la COVID-19** », présentée en annexe 4.²³⁶

Cette étude montre que le rapport du CD169 entre les monocytes et les lymphocytes (R-CD169) était **corrélé avec les marqueurs de sénescence et d'épuisement des cellules T CD8**, ainsi qu'avec la **maturation et la différenciation des cellules B** chez les patients atteints de la COVID-19. Le R-CD169 était corrélé aux niveaux d'ARNm des **cytokines** dans le sang, aux **marqueurs inflammatoires et à la gravité de la pneumonie** chez les patients non traités lors du prélèvement, et était associé au résultat respiratoire avec une aire sous la courbe (AUC) de 0,879 (figure 31).

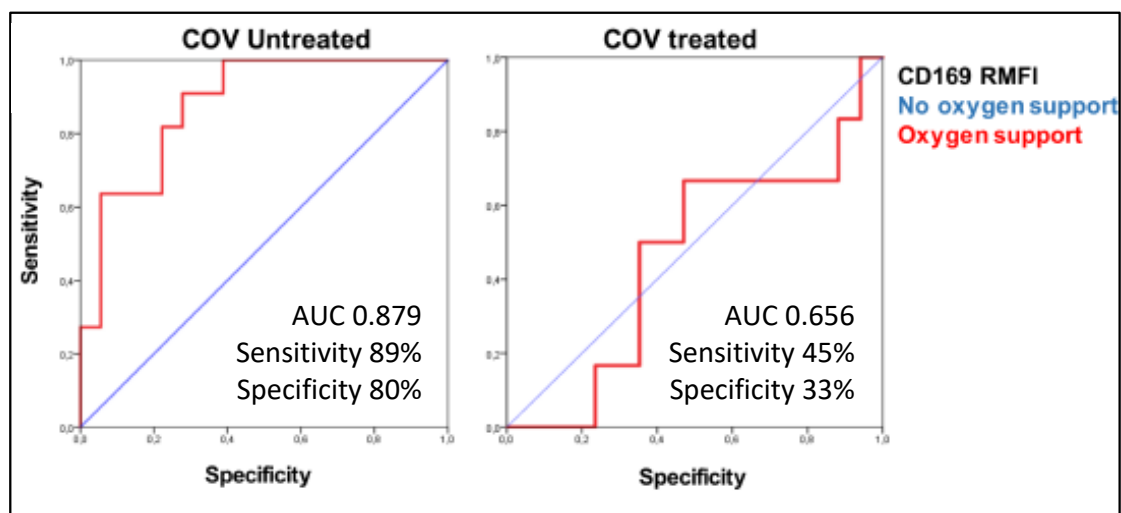


Figure 31 : Courbe ROC du R-CD169 chez les patients COVID-19 non traités ou traités en fonction de l'apport en oxygène. La sensibilité (« sensitivity ») et la spécificité (« specificity ») à la valeur seuil de 48 sont donnés. AUC: Area Under the Curve.

Cette étude rapporte également la première preuve de la capacité spécifique de la protéine spike du SARS-CoV-2 à déclencher *in vitro* l'expression du CD169 de manière dose-dépendante en parallèle avec la transcription des gènes IL-6 et IL-10, dans des PBMC de donneurs sains.

Les résultats précédents suggèrent que la **caractérisation du statut des cellules immunitaires dans le sang** total pourrait améliorer la **stratification des patients**. Dans la littérature, différents paramètres immunologiques ont été décrits comme étant associés à la sévérité de la maladie. Dans le travail qui suit, nous avons donc étudié les **cinétiques d'une sélection de biomarqueurs** au cours de la COVID-19 puis nous avons comparé leur capacité à **stratifier les patients afin de prédire la sévérité de la maladie**. En particulier, nous avons évalué ces biomarqueurs pour la prédiction du besoin en **ventilation mécanique (VM)**. En utilisant la méthode en une étape, nous avons immunophénotypé les leucocytes du sang total de 30 patients **hospitalisés** pour une pneumonie COVID-19 pendant 4 semaines à T= 0, 7, 14, 21, et 28.

Ce travail a fait l'objet d'une publication en cours de soumission dans « *Critical care medicine* », intitulée : « **Les faibles niveaux de CD4 monocytaire et le nombre réduit de T CD8+ prédisent la gravité de la pneumonie COVID-19** ».

The association of low CD4 expression on monocytes and low CD8+ T-cell count at hospital admission predicts the need of mechanical ventilation in patients with COVID-19 pneumonia: a prospective monocentric cohort study

Jérôme Allardet-Servent^{1 +}, Ines Ait Belkacem^{2 3 +}, Tewfik Miloud³, Lucas Benarous¹, Franck Galland², Philippe Halfon⁴, Jean-Louis Mège⁵, Guillaume Penaranda⁶, Jean-Marc Busnel³, and Fabrice Malergue^{3 *}

¹ Service de Réanimation, Hôpital Européen, Marseille, France

² Aix Marseille Université, Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, Marseille, France

³ Department of Research and Development, Beckman Coulter Life Sciences-Immunotech, Marseille, France

⁴ Service des Maladies Infectieuses et Médecine Interne, Hôpital Européen, Marseille, France

⁵ Laboratoire d'Immunologie, Institut Hospitalo-Universitaire de Maladies Infectieuses, APHM, Marseille, France

⁶ Department of Biostatistics, Alphabio Laboratory, Biogroup, Marseille, France

+ These authors contributed equally to this work

This work was performed at the European Hospital of Marseille

Address for reprints:

Beckman Coulter Life Sciences-Immunotech

Department of Research and Development

130 Av. du Maréchal de Lattre de Tassigny

13276 Marseille, France

No reprints will be ordered

Financial support: Beckman Coulter - Immunotech provides flow cytometry panels

Abstract (325 words)

Objective: To identify COVID-19-associated immunophenotyping patterns and to determine if immune profiling of circulating leukocytes at hospital admission could predict mechanical ventilation (MV) requirement.

Design: Prospective observational monocentric cohort study

Setting: A university-affiliated Hospital in Marseille, France

Patients: 30 patients presenting with laboratory confirmed COVID-19 pneumonia and bilateral ground glass opacities/consolidations on chest CT scan were enrolled within the first 48 hours upon hospital admission and compared to 18 healthy controls.

Interventions: None

Measurements and Main results: Whole-blood leukocytes were immunophenotyped with a rapid and simplified one-step flow cytometry method. Thirty-eight flow cytometry parameters and six laboratory indices were compared with univariate analysis first between COVID-19 patients and controls and then between COVID-19 patients requiring or not MV. The variables which discriminated MV from non-MV patients with a false discovery rate $p\text{-value} \leq 0.05$ were entered into a multiple stepwise logistic regression analysis. The area under the curve (AUC) was determined from receiving operating characteristic curve.

COVID-19 patients were predominantly male (87 %), aged 61 [50-71] and most (93%) have received corticosteroid therapy prior inclusion. Compared to controls, COVID-19 patients were characterized by an immune signature featuring: 1) decreased HLA-DR expression on monocytes; 2) reduced basophils, eosinophils, T-cells, NK cells, and non-classical monocyte count; and 3) upregulation of CD169 on monocytes, CD64 on neutrophils, the adhesion/migration markers (CD62L and CD11b) and the checkpoint inhibitor CD274 on myeloid cells.

Among the COVID-19 patients, 14 (47 %) required MV during the stay. Four parameters were

discriminant in univariate analysis: CD4 and HLA-DR on monocytes, CD8+ T-cell count, and lactate dehydrogenase. In multivariate analysis, a low level of CD4 on monocytes ($p=0.032$) and a low CD8+ T-cell count ($p=0.026$) were independently associated with MV requirement. The AUC of the model was 0.97 (95% CI: 0.83,0.99).

Conclusions: The association of low CD4 expression on circulating monocytes and low CD8+ T-cell count at hospital admission was highly predictive of the need of MV in hospitalized patients with COVID-19 pneumonia. This exploratory finding needs to be validated in an independent cohort.

Keywords: COVID-19, viral pneumonia, SARS-CoV-2, flow cytometry, immunophenotyping

The infection with severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) can manifest through a broad range of clinical symptoms, but the most severe form of the disease is characterized by hypoxia and may require intensive care support with the risk of rapid progression to acute respiratory distress syndrome, organ failure and death [1]. Predisposing factors of severe forms include older age, sex male, obesity, and comorbidities [2–4]. Among patients admitted to intensive care units (ICU), the case fatality rate range from 11% to 36% depending on the need of mechanical ventilation (MV) during the stay [5]. Predicting early the course of the disease would be therefore highly relevant for prognostication and appropriate resource allocation.

Following SARS-CoV-2 viral invasion of airway epithelial and alveolar cells [6], the host triggers a complex immune cascade involving the rapid production of type I and type III interferon (IFN) with subsequent stimulation of interferon-stimulated genes (ISGs) that facilitate effective innate and adaptive immune responses [7]. However, dysregulated immune patterns have been observed in patients with the most severe form including prolonged and uncontrolled local inflammatory process that results in both alveolar and endothelial damages and thrombosis [8–15]. Using flow cytometry, several studies have reported peripheral myeloid and lymphoid dysfunctions, and the extent of these alterations correlated with the severity of the disease [16–21].

Although flow cytometry is a powerful technique providing extensive cells characterization and phenotyping [22], flow cytometry-based monitoring has not yet entered routine practice. Among potential drawbacks are the prolonged sample preparation, the lack of standardization, and the need of specialized equipment and operators. Furthermore, complex sample preparation steps may introduce biases in the observed results. These limitations have been recently overcome with the development of a rapid one-step method which, by directly incorporating

whole blood into a no-wash assay, provides standardized sample process and paves the way for point of care application [23,24]. However, it remains uncertain whether early immune profiling would help clinicians to predict the severity of the coronavirus disease 2019 (COVID-19).

The aim of this study was first to identify immune profile which could discriminate COVID-19 patients from controls, and second to determine if some patterns could even predict the need of MV.

METHODS

1097

This prospective observational cohort study was conducted at the European Hospital of Marseille from January to June 2021 in accordance with the Helsinki Declaration and the French law on research involving humans. The study protocol was approved by an independent national review board (Comité de Protection des Personnes, Ile de France XI, IDRCB 2020-A00756-33) and registered at ClinicalTrials.gov (NCT04816760). Care of the subjects was not modified, and the results of the study had no influence on subjects' treatment. All enrolled patients provided written informed consent prior to inclusion. Control blood samples were obtained from the French blood bank (Etablissement Français du Sang, Marseille, France).

Patient selection and management

Adult patients were eligible for enrollment in the study if they fulfilled the following criteria: i) hospital admission for less than 48 h, ii) a positive SARS-CoV-2 reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), iii) typical features of COVID-19 pneumonia on chest CT scan (bilateral ground glass opacities and/or consolidations), and iv) an acute onset of respiratory symptoms (\leq 1 week). Exclusion criteria were pregnancy, immunosuppressive therapies within the previous 3 months, chronic respiratory failure with home oxygen or non-invasive ventilation, patients with a do not resuscitate order or an expected lifespan less than 1

month, patients referred from another center with a length of stay >48 h, and patients unable to give informed consent.

Patients with COVID-19 pneumonia were managed according to international guidelines [25], including standard anticoagulation in the absence of thrombosis, corticosteroid therapy (dexamethasone, 6 mg daily for 10 days) if requiring supplemental oxygen, and interleukin-6 receptor blocker (tocilizumab, 8 mg/kg up to a maximum of 800 mg) in case of severe or critical pneumonia. MV patients received low tidal volume protective ventilation, prone position if $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ was ≤ 150 mmHg, and venovenous extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) depending on standard criteria. In patients with clinical features of lung fibrosis, rescue corticosteroid therapy (methylprednisolone, 2 mg/kg, daily) might be used.

Blood samples and data collection

Blood samples were collected weekly in the morning from inclusion (Day 0) to Day 28 providing five time points per patient (Day 0, 7, 14, 21, and 28). Flow-cytometry analysis was performed on ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) tubes. Other laboratory indices of interest were C-reactive protein (CRP), procalcitonin, ferritin, lactate dehydrogenase (LDH), high-sensitivity troponin I and D-dimer.

The following clinical data were recorded: Demographic characteristics, major comorbidities, date of first symptom onset, date of hospital and ICU admission, length of hospital and ICU stays, hospital survival, medications, type, and duration of organ support. The Simplified Acute Physiology Score II (SAPS II, ranging from 0 to 163 with higher values indicating higher risk of death) was computed at hospital admission [26]. The Sequential Organ Failure Assessment score (SOFA, ranging from 0 to 20 with higher values indicating higher risk of death) was calculated on days of measurements [27]. We used the World Health Organization clinical progression scale (WHO-CPS) [28] to characterize the type of respiratory support at each time

point of the study, and recorded the maximum value during the stay. The population of COVID-19 patients was separated in MV and non-MV patients according to the need of MV during the hospital stay.

Flow cytometry analysis

For multiparametric flow cytometry three antibody panels were used (**Supplemental Table 1**), all obtained from Beckman Coulter (Brea, USA), to assess leucocytes (DURAClone IM Phenotyping Basic dry panel), granulocytes (DURAClone IM Granulocytes dry panel), and myeloid activation markers (IOTest Myeloid Activation Antibody Cocktail). These three panels were provided in a pre-mix liquid or dry antibody cocktail. Leucocyte staining and lysis were performed following the one-step method [23]. For myeloid activation markers, 10 μ L of whole blood were added to 10 μ L of the liquid format IOTest Myeloid Activation Antibody Cocktail, and 500 μ L of the lysing 0.05%-fixing solution to allow simultaneous lysis and staining. Acquisition was initiated after 15 min of incubation at room temperature. For leucocyte and granulocyte phenotyping, 100 μ L of blood were added to the dried DURAClone IM Phenotyping Basic tube or DURAClone IM Granulocytes tube with 2 mL of the lysing 0.05%-fixing solution to allow simultaneous lysis and staining, and tubes were incubated 30 min. Processed samples were analyzed on a 3-laser, 10-color Navios EX flow cytometer. The cytometer was standardized using Flow Set Pro calibration beads (Beckman Coulter, Brea, USA). The median fluorescence intensities (X-Med) and absolute cell subset numbers were obtained using the Kaluza Analysis Software (version 2.1; Beckman Coulter, Brea, USA). For the markers of the myeloid activation panel, as recommended by the manufacturer, we further calculated the signal-to-noise ratios.

Sample size calculation

To determine the sample size, we assumed an MV incidence rate of 50% with a margin of error of 15 % and a confidence level of 90 % according to previous estimation from local registry. The minimum sample size needed to estimate the true population proportion was 30.

Statistical analysis

Categorical data are presented as number and percentage (%) and were compared with the Chi-square test. Continuous data are presented as median and interquartile range [IQR] and were compared with the Mann-Whitney U-test.

To discriminate COVID-19 patients from controls, we performed univariate analysis of variance (ANOVA) of flow cytometry parameters at hospital admission using the response screening platform. This procedure classified the parameters according to their significance level based on either the regular p-value (ANOVA) or the False Discovery Rate (FDR) p-value; a method which applied the Benjamini-Hochberg procedure adjustment for multiple comparisons. The parameters with FDR p-values ≤ 0.05 were selected for Principal Component Analysis (PCA) and Hierarchical Clustering analysis. The response screening procedure was repeated within COVID-19 patients to discriminate those requiring or not MV. The parameters with FDR p-values ≤ 0.05 were introduced into a multivariate stepwise logistic regression analysis. The stopping rule was based on p-value thresholds and the criteria to enter and to leave variables were fixed at <0.05 and >0.1 , respectively. We used the receiver operating characteristic (ROC) curve to determine the area under the curve (AUC) of parameters with FDR p-value ≤ 0.05 and the final multivariate model. The optimal cut-off value of parameters was determined according to the Youden index method.

To describe the kinetics of flow cytometry parameters in COVID-19 patients, we first normalized the timing of blood samples to symptoms onset. We next allocated each time points

into one of the following time intervals: 0-10, 11-20, 21-30, 31-50 days after symptoms onset. The flow cytometry parameters of COVID-19 patients were compared at each time intervals with the control group using the Steel test. Correlations were established with the Pearson correlation coefficient (r) and the determination coefficient (r^2) was computed. All tests were two-tailed and the significance level was fixed at 5%. Statistical analyses were performed with JMP v16 (SAS Institute, Cary, USA).

RESULTS

884

Baseline characteristics of the study population

30 patients with confirmed COVID-19 pneumonia were included and compared with 18 healthy controls (**Table 1**). The flow chart of the study is displayed in **Supplemental Fig. 1**. Among the COVID-19 patients, 9 (30%) received standard oxygen therapy and 21 (70%) required ICU admission of whom 14 (47%) received MV and 3 (10%) were assisted with ECMO. Four patients did not survive the ICU stay. Most COVID-19 patients (93%) received early dexamethasone therapy (6 mg daily) for a median duration of 9 days while 8 (27%) also received, at a later stage, methylprednisolone therapy to mitigate pulmonary fibrosis. Seven patients (23%), all admitted to the ICU, were treated with a unique dose of the IL-6 receptor blocker tocilizumab. In five patients (17%) a treatment by azithromycin has been initiated prior to the hospital admission but this latter was discontinued within 3 [1-5] days after introduction. None of the patients had received antiviral agents or hydroxychloroquine.

Acute immune COVID-19 signature

Of the 38 flow cytometry parameters evaluated at hospital admission, 24 significantly (FDR p-values ≤ 0.05) discriminated COVID-19 patients from controls (**Supplemental Fig. 2A**). The patients with the COVID-19 had lower membrane expression of HLA-DR on monocytes but

also decreased count of basophils, eosinophils, total lymphocytes, CD56+ NK cells, NKT-cells, total T-cells, CD8+ T-cells, CD4+ T-cells, total monocytes, and non-classical (patrolling) monocytes. Simultaneously, the expression of several membrane proteins was upregulated: CD169 on monocytes, CD64 on monocytes and neutrophils, CD274 on monocytes, neutrophils and eosinophils, CD62L on neutrophils, eosinophils, basophils and monocytes, CD11b on basophils, monocytes and neutrophils. The PCA of these 24 parameters not only discriminated COVID-19 patients from controls but also exhibited heterogeneity within the COVID-19 patients (**Fig. 1A**). Hierarchical clustering separated the COVID-19 patients into two sub-groups. In sub-cluster A, 59 % of patients had received MV during the stay whereas in sub-cluster B 86 % hadn't received MV (**Fig. 1B**).

Flow cytometry parameters at hospital admission and the need for mechanical ventilation

The hierarchical clustering analysis suggested that some flow cytometry parameters evaluated at hospital admission could discriminate the patients who received or not MV. Thus, we first compared the demographic variables and laboratory indices between MV and non-MV COVID-19 patients) (**Table 2**). We then investigated the discriminating level of 45 parameters with the response screening platform, entering all 45 flow cytometry markers, six laboratory indices and two relevant demographic variables (age, BMI) (**Supplemental Fig. 1B**). Of these 45 parameters, four significantly (FDR p-values ≤ 0.05) discriminate MV from non-MV patients: the CD4 expression on monocytes (mCD4), CD8+ T-cell count, LDH, and HLA-DR ratio of monocytes/neutrophils expression (mHLA-DR (**Fig. 2**). The AUC of each parameter was 0.87, 0.79, 0.79, and 0.87 respectively (**Supplemental Fig. 3**). In multivariate stepwise logistic regression analysis (**Supplemental Table. 2**), mHLA-DR and LDH were excluded from the model and only mCD4 (p=0.032) and CD8+ T-cell count (p=0.026) remains independently associated with the need of MV (**Supplemental Table 1**). The AUC of the final model

combining mCD4 and CD8+ T-cell count was 0.97 (95% CI: 0.83- 0.99) (**Fig. 3**).

Kinetics of flow cytometry parameters over 28 days

The kinetics of flow cytometry parameters were investigated at four time-intervals from symptom onset, and each were compared to controls. 26 out of the 38 flow cytometry parameters evaluated had significant variation of the level of expression or the cell count when compared to controls, at least at one time interval. We described herein the kinetics of the three best discriminants immune markers.

The membrane expression of mCD4 clearly diverged within the acute phase (0-10 days) of the infection. In non-MV patients, the level of mCD4 level was significantly higher than controls whereas the level of mCD4 level in MV patients tended to be lower than controls, even though the comparison was marginally significant ($p=0.062$). Over the study period, the high level of mCD4 observed in non-MV patients was maintained or even strengthened. Conversely, in MV patients, the level of mCD4 remained low or even further decreased in the most severe cases (notably in all non-survivors), whereas it recovered in few patients (**Fig. 4A**). The membrane expression of mHLA-DR followed a different pattern than that of mCD4. During the acute phase, the level of mHLA-DR was reduced in all COVID-19 patients but MV patients presented the largest reduction. Over the study period, the level of mHLA-DR recovered in non-MV patients whereas it remained low in the most severe cases including all non-survivors (**Fig. 4B**). The kinetics of CD8+ T-cell count followed a similar pattern than that of the mHLA-DR with a greater reduction during the acute phase and a delayed recovery in MV patients. The time course of the others flow cytometry parameters is displayed in the **Supplemental Fig. 4**.

Flow cytometry parameters and the severity of organ-failure

We finally explored the relationship between the severity of organ failure and the four parameters which best discriminated MV from non-MV patients (mCD4, CD8+ T-cell count, LDH, and mHLA-DR). We first established correlation with the type of respiratory support as assessed by the WHO-CPS (i.e., a surrogate of the severity of the respiratory failure), and then with the severity of organ failure as assessed by the SOFA score. These analyses were performed on the whole dataset of measurements over the study period. Among these biomarkers, mHLA-DR and mCD4 were those who exhibited the most robust associations. The correlation with the WHO-CS was greater for mHLA-DR ($r^2=0.53$) than for mCD4 ($r^2=0.38$). The correlation with the SOFA score was also greater for mHLA-DR ($r^2=0.34$) than for mCD4 ($r^2=0.28$) **(Supplemental Fig. 5 A and B).**

In this prospective cohort of hospitalized patients with COVID-19 pneumonia we identified, using a one-step standardized flow cytometry method, an immune COVID-19 signature featuring a marked reduction of the expression of mHLA-DR and a decreased of the basophils, eosinophils, T-cells, NK cells and non-classical monocyte count upon hospital admission. Simultaneously, the membrane expression of CD169 on monocytes, CD64 on neutrophils, the adhesion/ migration markers CD62L and CD11b and the checkpoint inhibitor CD274 on myeloid cells was upregulated.

The most important finding of this study is probably the ability of few immune markers to predict at hospital admission the subsequent need of MV during the hospital stay. From univariate analysis, we identified four parameters which discriminated MV from non-MV COVID-19 patients after adjustment for multiple comparisons. Three out of these four parameters were obtained by flow cytometry analysis and the other one, the LDH, was a laboratory biomarker of end-organ damage already known to be associated with the severity of the disease [29]. The multivariate logistic regression analysis identified collinearities between variables and finally outputted a two-factor model in which the level of membrane expression of mCD4 and the CD8+ T-cell count were independently associated with the need of MV. The combination of these two immune parameters yields an unexpectedly high level of AUC (0.97).

Predicting the course of the COVID-19 disease is particularly challenging as patients with severe forms presented most frequently a rapid deterioration of their respiratory function around the tenth days after the symptom onset and some of them will require MV. Most of clinical studies have tried to identify risk factors of death among hospitalized patients but very few have specifically addressed the risk factors of MV requirement. In a retrospective cohort study of

329 hospitalized patients, the risk factors associated with the progression to a severe form defined by a WHO-CPS between 6 and 9 (ranging from high flow oxygen therapy to MV) were the LDH, the quick SOFA score and the neutrophil to lymphocyte ratio; and the AUC of the model was 0.84 [30]. In another retrospective cohort study of 201 hospitalized patients, the risk factors associated with the development of ARDS and progression from ARDS to death were older age, neutrophilia, LDH and D-Dimer[4]. To the best of our knowledge, the present study is the first to have investigated the potential interest of immune biomarkers as predictors of MV requirement. By using the response screening platform, our analysis plan had permitted the direct comparison of the most relevant laboratory and demographic parameters with flow cytometry parameters. Although the LDH level was identified as a robust discriminating factor between MV and non-MV patients, this parameter was outperformed by the immune markers in multivariate analysis. Finally, the level of correlation between the LDH and the score of organ failure was also outperformed by the level of mHLA-DR and mCD4.

In adaptive immunity, CD8⁺ and CD4⁺ T-cells play an essential role in controlling viral infection through a cytotoxic activity on virus-infected cells and the release of effector cytokines. A SARS CoV-2-specific T-cell response has been detected both in the acute and the convalescent phases of COVID-19. These cells undergo quantitative and qualitative changes including decreased cell number and activation/ exhaustion phenotypes, particularly in the severe form of the disease [31–34]. In this study we confirmed the decrease of both CD4⁺ and CD8⁺ T-cells which was much more pronounced in MV patients. Furthermore, we identified the CD8⁺ T-cell count (but not the CD4⁺ T-cell count) as an independent risk factor of MV. This parameter had been previously identified as an independent risk factor of death in a prospective cohort of hospitalized COVID-19 patients [32]. Taken together these findings suggest that the number of circulating CD8⁺ T-cells is a critical determinant of the outcome of

COVID-patients. However, the present study was not designed to elucidate the mechanism by which the CD8⁺ T-cells blood count is reduced. Thus, it remains to be determined if the SARS-CoV-2 has cytotoxic effect on these cells or rather if most of the circulating CD8⁺ T-cells are recruited at the site of infection.

Interestingly, we and others had previously noticed low CD4 staining on the circulating monocytes of severe COVID-19 patients [35,36]. In this study, we reported two opposite patterns of mCD4 expression: upregulation in non-MV patients and downregulation in MV patients. CD4 is expressed at the membrane surface of all human peripheral monocytes, yet its function on these cells is not fully understood and poorly studied [37]. The CD4 molecule is a membrane-bound glycoprotein, member of the immunoglobulin receptor family known to be expressed on T-cells and to interact with major histocompatibility complex class II (MHC-II), interleukine-16, and human immunodeficiency virus (HIV) gp120 [38]. Recently, it has been proposed that the binding of mCD4 with the MHC-II of activated endothelial cells triggers monocyte activation and differentiation into macrophages, resulting in two key innate immune functions: cytokine secretion and phagocytosis [39]. In the present study most of the COVID-19 patients who experienced a favorable outcome (i.e., alive and free from MV) had higher expression of mCD4 suggesting that upregulation of mCD4 contributes to the host response against SARS CoV-2 infection and that the failure of an appropriate upregulation could determine the course of the disease. However, the effect *in vivo* of CD4 stimulation during SARS-CoV-2 and others viral infections needs to be clarify in future investigations

The membrane expression of HLA-DR on monocytes mediates key functions of innate immunity including antigen presentation. Also, decreased mHLA-DR expression correlates with cell exhaustion. Therefore, mHLA-DR can be used as a biomarker to monitor the acquired

immunosuppression in critically ill patients [40]. It is proposed that during acute critical illness, the immune profile is characterized by an universal initial stress in which all components of the immune system (innate and adaptive response) are engaged together with the release of pro and anti-inflammatory cytokines [40]. Hence, in a large cohort of critically ill patients with various injuries, the expression of mHLA-DR was already reduced on the first day following the ICU admission. While this initial immune response did not compromise the host, the persistence in some patients of a low mHLA-DR expression at the end of the first week after admission (so called the maladaptive injury-acquired immunodeficiency syndrome) is associated with increased risk of secondary infections [40]. In this study, most of the COVID-19 patients had decreased mHLA-DR expression at hospital admission and this reduction was greater in MV patients. This result confirms previous observation in COVID-19 patients [41], and corroborates the hypothesis of the universal initial stress. While most of the non-MV patients normalized the mHLA-DR level within the 21-30 days following the symptoms onset, MV patients in contrast failed to normalize the mHLA-DR level over the study period. Therefore, the prolonged periods of acquired immunosuppression experienced by MV patients may have contribute both to hamper the SARSCoV-2 viral clearance [42], but also to increase the rate of nosocomial infections as previously reported [43,44].

From a more global perspective, it was the level of expression of two membrane bound proteins (CD4 and HLA-DR) at the surface of circulating monocytes which best correlated with the severity of the disease as assessed by the WHO-CPS and the SOFA score. This finding underlines the central role of monocytes into the host immune response against SARS-CoV-2 infection and encourages to consider the routine use of flow cytometry-based evaluation of monocyte functions for the evaluation of clinically relevant end-points [45,46].

The present study also brings new insights into the sequential implications of 38 immune markers which were monitored up to 40 days after symptoms onset (**Supplemental Figure 4**). Some parameters were either upregulated or downregulated within the acute phase (i.e., the first tenth days following the symptoms onset) before returning immediately to baseline levels whereas others remained altered longer, lasting at least 40 days. Conversely, some parameters remained unaltered during the acute phase but presented variations within the second part of the course of the disease. Nevertheless, the occurrence of secondary infections could have modified the pattern of expression of these “second phase” parameters and introduced a risk of misinterpretation. Among the markers of the acute phase, we paid attention to the kinetic of CD169 expression on monocytes which showed an intense upregulation in most of the COVID-19 patients, confirming thereby the upregulation of this ISG during SARS-CoV-2 infection [47]. Whether the monitoring of mCD169 could increase the likelihood of diagnosis of a viral disease warrants further investigations.

Albeit we focused on the three most significantly discriminant immune parameters according to FDR p-values, we acknowledged that the 23 other markers identified in this study are also essential for the host to implement an adapted immune response against SARS-CoV-2 infection. Nevertheless, it was one of the aims of this study to try to identify few immune parameters that yield high predictive ability.

From a translational standpoint, we propose an easy and rapid method to directly stain and lyse whole blood in a single step, avoiding the washing step, using only a few markers easy to detect on non-rare cell subpopulations. This method can be performed either from a sampling tube or from a fingerpick droplet at the bedside of the patients. This method is further relevant in this

context since low dose fixation reagent provides the stabilization of HLA-DR expression that otherwise is known to increase constantly in the sampling tube [48].

This study has some limitations. First, most of our patients have received treatments that may have altered the immune system and thus modified the expression of flow cytometry or laboratory biomarkers. Corticosteroids are known to decrease the level of inflammatory markers [49,50], still most of our patients (93%) had already received a first dose of corticosteroid therapy prior to inclusion. Therefore, it is plausible that the absolute values of the whole biomarkers have been shifted downward compared with controls, but it is unlikely that the differences observed between VM and non-VM patients at hospital admission were generated by the corticosteroid therapy itself. Similarly, IL-6 receptor blocker (tocilizumab) may interfere with immune marker expression [51], however only two ICU patients of our cohort had received a dose of tocilizumab before the first study sample. Another limitation is the limited size of the cohort which served only as a determination cohort. Therefore, these results need first to be confirmed in a larger independent cohort of validation prior to be generalized.

CONCLUSION

86

In this prospective cohort study of patients hospitalized with COVID-19 pneumonia we described, using a one-step standardized flow cytometry method, an immune signature which discriminated the COVID-19 patients from controls. Most importantly, we identified the membrane expression of CD4 on monocytes and the CD8+ T-cell count upon hospital admission as parameters independently associated with the need of MV. The combination of these parameters in the final multivariate model yielded an unexpectedly high level of accuracy (AUC=0.97). This exploratory finding needs to be validated in an independent cohort.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

This prospective observational study was conducted in accordance with the Helsinki Declaration and the French law on research involving humans. The protocol of the study was approved by an independent national review board (Comité de Protection des Personnes, Ile de France XI, IDRCB 2020-A00756-33) and registered at clinicaltrials.gov (NCT04816760). Care of the subjects was not modified, and the results of the study had no influence on subjects' treatment. All enrolled patients provided written informed consent prior to inclusion.

Consent for publication

The authors confirm that the manuscript doesn't contain any individual person's data in any form (including any individual details, images or videos).

Availability of data and materials

The authors confirm that the data supporting the findings of this study are available within the article and its supplementary materials.

Competing interests

I.A.B., F.M., and J.M.B. are Beckman Coulter Life Sciences employees. All other authors declare no conflict of interest.

Funding

I.A.B. is recipient of Convention Industrielle de Formation par la Recherche (CIFRE) Ph.D. grant (No. 2018/1212) from the ANRT (National Agency for Research and Technology).

Authors' contributions

J.A.S., I.A.B., T.M., P.H., J.L.M., J.M.B, and F.M. designed the study. J.A.S. and L.B. provided blood samples. I.A.B. performed the experiments and data analysis. J.A.S., I.A.B., and F.M., wrote the manuscript. F.G., P.H., J.L.M., and J.M.B. made critical revision of the manuscript.

Acknowledgements

We are grateful to Sara Amrani and Adrien Estienne for their invaluable help in the management of blood samples.

References

1. Tzotzos SJ, Fischer B, Fischer H, Zeitlinger M. Incidence of ARDS and outcomes in hospitalized patients with COVID-19: a global literature survey. *Crit Care* [Internet]. 2020 [cited 2021 Jul 21];24:516. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7441837/>
2. Cummings MJ, Baldwin MR, Abrams D, Jacobson SD, Meyer BJ, Balough EM, et al. Epidemiology, clinical course, and outcomes of critically ill adults with COVID-19 in New York City: a prospective cohort study. *Lancet*. 2020;395:1763–70.
3. Gupta S, Hayek SS, Wang W, Chan L, Mathews KS, Melamed ML, et al. Factors Associated With Death in Critically Ill Patients With Coronavirus Disease 2019 in the US. *JAMA Intern Med*. 2020;180:1436–47.
4. Wu C, Chen X, Cai Y, Xia J, Zhou X, Xu S, et al. Risk Factors Associated With Acute Respiratory Distress Syndrome and Death in Patients With Coronavirus Disease 2019 Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA Internal Medicine* [Internet]. 2020 [cited 2021 Nov 25];180:934–43. Available from: <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2020.0994>
5. COVID-ICU Group on behalf of the REVA Network and the COVID-ICU Investigators. Clinical characteristics and day-90 outcomes of 4244 critically ill adults with COVID-19: a prospective cohort study. *Intensive Care Med* [Internet]. 2021 [cited 2021 Dec 23];47:60–73. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00134-020-06294-x>
6. Li W, Zhang C, Sui J, Kuhn JH, Moore MJ, Luo S, et al. Receptor and viral determinants of SARS-coronavirus adaptation to human ACE2. *EMBO J*. 2005;24:1634–43.
7. Li G, Fan Y, Lai Y, Han T, Li Z, Zhou P, et al. Coronavirus infections and immune responses. *J Med Virol* [Internet]. 2020 [cited 2021 Sep 28];92:424–32. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7166547/>
8. Abers MS, Delmonte OM, Ricotta EE, Fintzi J, Fink DL, de Jesus AAA, et al. An immune-based biomarker signature is associated with mortality in COVID-19 patients. *JCI Insight* [Internet]. 2020 [cited 2021 Sep 1];6:e144455. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7821609/>
9. Cao X. COVID-19: immunopathology and its implications for therapy. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2020 [cited 2021 Jul 21];1–2. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7143200/>
10. Chevrier S, Zurbuchen Y, Cervia C, Adamo S, Raeber ME, de Souza N, et al. A distinct innate immune signature marks progression from mild to severe COVID-19. *Cell Reports Medicine* [Internet]. 2021 [cited 2021 Sep 1];2:100166. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2666379120302135>

11. Giamarellos-Bourboulis EJ, Netea MG, Rovina N, Akinosoglou K, Antoniadou A, Antonakos N, et al. Complex Immune Dysregulation in COVID-19 Patients with Severe Respiratory Failure. *Cell Host & Microbe* [Internet]. 2020 [cited 2020 Dec 15];27:992-1000.e3. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1931312820302365>
12. Kermali M, Khalsa RK, Pillai K, Ismail Z, Harky A. The role of biomarkers in diagnosis of COVID-19 – A systematic review. *Life Sci* [Internet]. 2020 [cited 2021 Jul 21];254:117788. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7219356/>
13. Mohamed Khosroshahi L, Rezaei N. Dysregulation of the immune response in coronavirus disease 2019. *Cell Biol Int* [Internet]. 2020 [cited 2021 Sep 1];10.1002/cbin.11517. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7753769/>
14. Qin C, Zhou L, Hu Z, Zhang S, Yang S, Tao Y, et al. Dysregulation of Immune Response in Patients With Coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. *Clin Infect Dis*. 2020;71:762–8.
15. Varchetta S, Mele D, Oliviero B, Mantovani S, Ludovisi S, Cerino A, et al. Unique immunological profile in patients with COVID-19. *Cell Mol Immunol* [Internet]. 2021 [cited 2021 Aug 30];18:604–12. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41423-020-00557-9>
16. Bost P, De Sanctis F, Canè S, Ugel S, Donadello K, Castellucci M, et al. Deciphering the state of immune silence in fatal COVID-19 patients. *Nat Commun* [Internet]. 2021 [cited 2021 Dec 23];12:1428. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41467-021-21702-6>
17. Chen Z, John Wherry E. T cell responses in patients with COVID-19. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2020 [cited 2021 Dec 23];20:529–36. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41577-020-0402-6>
18. Diao B, Wang C, Tan Y, Chen X, Liu Y, Ning L, et al. Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Frontiers in Immunology* [Internet]. 2020 [cited 2021 Dec 23];11:827. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2020.00827>
19. Hadjadj J, Yatim N, Barnabei L, Corneau A, Boussier J, Smith N, et al. Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. *Science* [Internet]. American Association for the Advancement of Science; 2020 [cited 2021 Nov 10];369:718–24. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.abc6027>
20. Mann ER, Menon M, Knight SB, Konkel JE, Jagger C, Shaw TN, et al. Longitudinal immune profiling reveals key myeloid signatures associated with COVID-19. *Science Immunology* [Internet]. American Association for the Advancement of Science; 2020 [cited 2021 Dec 23];5:eabd6197. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/sciimmunol.abd6197>

21. Schulte-Schrepping J, Reusch N, Paclik D, Baßler K, Schlickeiser S, Zhang B, et al. Severe COVID-19 Is Marked by a Dysregulated Myeloid Cell Compartment. *Cell* [Internet]. 2020 [cited 2021 Dec 23];182:1419-1440.e23. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867420309922>
22. Chattopadhyay PK, Filby A, Jellison ER, Ferrari G, Green C, Cherian S, et al. A Cytometrist's Guide to Coordinating and Performing Effective COVID-19 Research. *Cytometry A*. 2021;99:11–8.
23. Ait Belkacem I, Bourgoin P, Busnel JM, Galland F, Malergue F. One-step White Blood Cell Extracellular Staining Method for Flow Cytometry. *Bio-protocol* [Internet]. 2021 [cited 2021 Sep 1];11:e4135–e4135. Available from: <https://bio-protocol.org/e4135>
24. Bourgoin P, Hayman J, Rimmelé T, Venet F, Malergue F, Monneret G. A novel one-step extracellular staining for flow cytometry: Proof-of-concept on sepsis-related biomarkers. *J Immunol Methods*. 2019;470:59–63.
25. Agarwal A, Rochweg B, Siemieniuk RA, Agoritsas T, Lamontagne F, Askie L, et al. A living WHO guideline on drugs for covid-19. *BMJ*. 2020;370:m3379.
26. Le Gall JR, Lemeshow S, Saulnier F. A new Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study. *JAMA*. 1993;270:2957–63.
27. Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonça A, Bruining H, et al. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med*. 1996;22:707–10.
28. Marshall JC, Murthy S, Diaz J, Adhikari NK, Angus DC, Arabi YM, et al. A minimal common outcome measure set for COVID-19 clinical research. *The Lancet Infectious Diseases* [Internet]. 2020 [cited 2021 Oct 13];20:e192–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309920304837>
29. Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet*. 2020;395:1054–62.
30. Davis JW, Wang B, Tomczak E, Chi-Fu C, Harmouch W, Reynoso D, et al. Prediction of the need for intensive oxygen supplementation during hospitalisation among subjects with COVID-19 admitted to an academic health system in Texas: a retrospective cohort study and multivariable regression model. *BMJ Open*. 2022;12:e058238.
31. Bange EM, Han NA, Wileyto P, Kim JY, Gouma S, Robinson J, et al. CD8+ T cells contribute to survival in patients with COVID-19 and hematologic cancer. *Nat Med* [Internet]. 2021 [cited 2021 Nov 17];27:1280–9. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41591-021-01386-7>

32. Du R-H, Liang L-R, Yang C-Q, Wang W, Cao T-Z, Li M, et al. Predictors of mortality for patients with COVID-19 pneumonia caused by SARS-CoV-2: a prospective cohort study. *Eur Respir J* [Internet]. 2020 [cited 2021 Nov 12];55:2000524. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7144257/>
33. Iannetta M, Buccisano F, Fraboni D, Malagnino V, Campogiani L, Teti E, et al. Baseline T-lymphocyte subset absolute counts can predict both outcome and severity in SARS-CoV-2 infected patients: a single center study. *Sci Rep* [Internet]. 2021 [cited 2021 Dec 22];11:12762. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-90983-0>
34. Rha M-S, Shin E-C. Activation or exhaustion of CD8⁺ T cells in patients with COVID-19. *Cell Mol Immunol* [Internet]. 2021 [cited 2021 Sep 1];1–9. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41423-021-00750-4>
35. Kazancioglu S, Yilmaz FM, Bastug A, Sakallı A, Ozbay BO, Buyuktarakci C, et al. Lymphocyte Subset Alteration and Monocyte CD4 Expression Reduction in Patients with Severe COVID-19. *Viral Immunology* [Internet]. Mary Ann Liebert, Inc., publishers; 2021 [cited 2021 Dec 22];34:342–51. Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/full/10.1089/vim.2020.0166>
36. Vitte J, Diallo AB, Boumaza A, Lopez A, Michel M, Allardet-Servent J, et al. A Granulocytic Signature Identifies COVID-19 and Its Severity. *J Infect Dis* [Internet]. Oxford Academic; 2020 [cited 2020 Nov 26];222:1985–96. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article/222/12/1985/5907982>
37. Crocker PR, Jefferies WA, Clark SJ, Chung LP, Gordon S. Species heterogeneity in macrophage expression of the CD4 antigen. *Journal of Experimental Medicine* [Internet]. 1987 [cited 2021 Nov 15];166:613–8. Available from: <https://rupress.org/jem/article/166/2/613/57253/Species-heterogeneity-in-macrophage-expression-of>
38. Lynch GW, Turville S, Carter B, Sloane AJ, Chan A, Muljadi N, et al. Marked differences in the structures and protein associations of lymphocyte and monocyte CD4: Resolution of a novel CD4 isoform. *Immunology & Cell Biology* [Internet]. 2006 [cited 2021 Nov 15];84:154–65. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1440-1711.2005.01403.x>
39. Zhen A, Krutzik SR, Levin BR, Kasparian S, Zack JA, Kitchen SG. CD4 Ligation on Human Blood Monocytes Triggers Macrophage Differentiation and Enhances HIV Infection. *J Virol* [Internet]. 2014 [cited 2021 Nov 15];88:9934–46. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4136363/>
40. Venet F, Textoris J, Blein S, Rol M-L, Bodinier M, Canard B, et al. Immune Profiling Demonstrates a Common Immune Signature of Delayed Acquired Immunodeficiency in Patients With Various Etiologies of Severe Injury*. *Critical Care Medicine* [Internet]. 2022 [cited 2022 Apr 21];50:565–75. Available from:

https://journals.lww.com/ccmjournal/Abstract/2022/04000/Immune_Profiling_Demonstrates_a_Common_Immune.4.aspx

41. Berenguer J, Ryan P, Rodríguez-Baño J, Jarrín I, Carratalà J, Pachón J, et al. Characteristics and predictors of death among 4035 consecutively hospitalized patients with COVID-19 in Spain. *Clin Microbiol Infect*. 2020;26:1525–36.
42. Buetti N, Wicky P-H, Le Hingrat Q, Ruckly S, Mazzuchelli T, Liodice A, et al. SARS-CoV-2 detection in the lower respiratory tract of invasively ventilated ARDS patients. *Crit Care*. 2020;24:610.
43. Rouzé A, Martin-Loeches I, Pova P, Makris D, Artigas A, Bouchereau M, et al. Relationship between SARS-CoV-2 infection and the incidence of ventilator-associated lower respiratory tract infections: a European multicenter cohort study. *Intensive Care Med*. 2021;47:188–98.
44. Buetti N, Ruckly S, de Montmollin E, Reigner J, Terzi N, Cohen Y, et al. COVID-19 increased the risk of ICU-acquired bloodstream infections: a case-cohort study from the multicentric OUTCOMEREA network. *Intensive Care Med*. 2021;47:180–7.
45. Knoll R, Schultze JL, Schulte-Schrepping J. Monocytes and Macrophages in COVID-19. *Frontiers in Immunology* [Internet]. 2021 [cited 2021 Sep 29];12:2952. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2021.720109>
46. Lagadinou M, Zareifopoulos N, Gkentzi D, Sampsonas F, Kostopoulou E, Marangos M, et al. Alterations in lymphocyte subsets and monocytes in patients diagnosed with SARS-CoV-2 pneumonia: a mini review of the literature. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2021;25:5057–62.
47. Comins-Boo A, Gutiérrez-Larrañaga M, Roa-Bautista A, Guiral Foz S, Renuncio García M, González López E, et al. Validation of a Quick Flow Cytometry-Based Assay for Acute Infection Based on CD64 and CD169 Expression. *New Tools for Early Diagnosis in COVID-19 Pandemic*. *Front Med (Lausanne)*. 2021;8:655785.
48. Bourgoin P, Taspinar R, Gossez M, Venet F, Delwarde B, Rimmelé T, et al. Toward Monocyte HLA-DR Bedside Monitoring: A Proof of Concept Study. *Shock*. 2020;
49. Ceccato A, Mendez R, Gabarrus A, Agusti C, Sibila O, Cilloniz C, et al. Effect of corticosteroids on inflammatory markers in patients with severe cap and high inflammatory response according to presence of lymphopenia. *European Respiratory Journal* [Internet]. European Respiratory Society; 2019 [cited 2021 Dec 23];54. Available from: https://erj.ersjournals.com/content/54/suppl_63/PA2911
50. Le Tulzo Y, Pangault C, Amiot L, Guilloux V, Tribut O, Arvieux C, et al. Monocyte human leukocyte antigen-DR transcriptional downregulation by cortisol during septic shock. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;169:1144–51.

51. Berman M, Ben-Ami R, Berliner S, Anouk M, Kaufman I, Broyde A, et al. The Effect of Tocilizumab on Inflammatory Markers in Patients Hospitalized with Serious Infections. Case Series and Review of Literature. *Life (Basel)*. 2021;11:258.

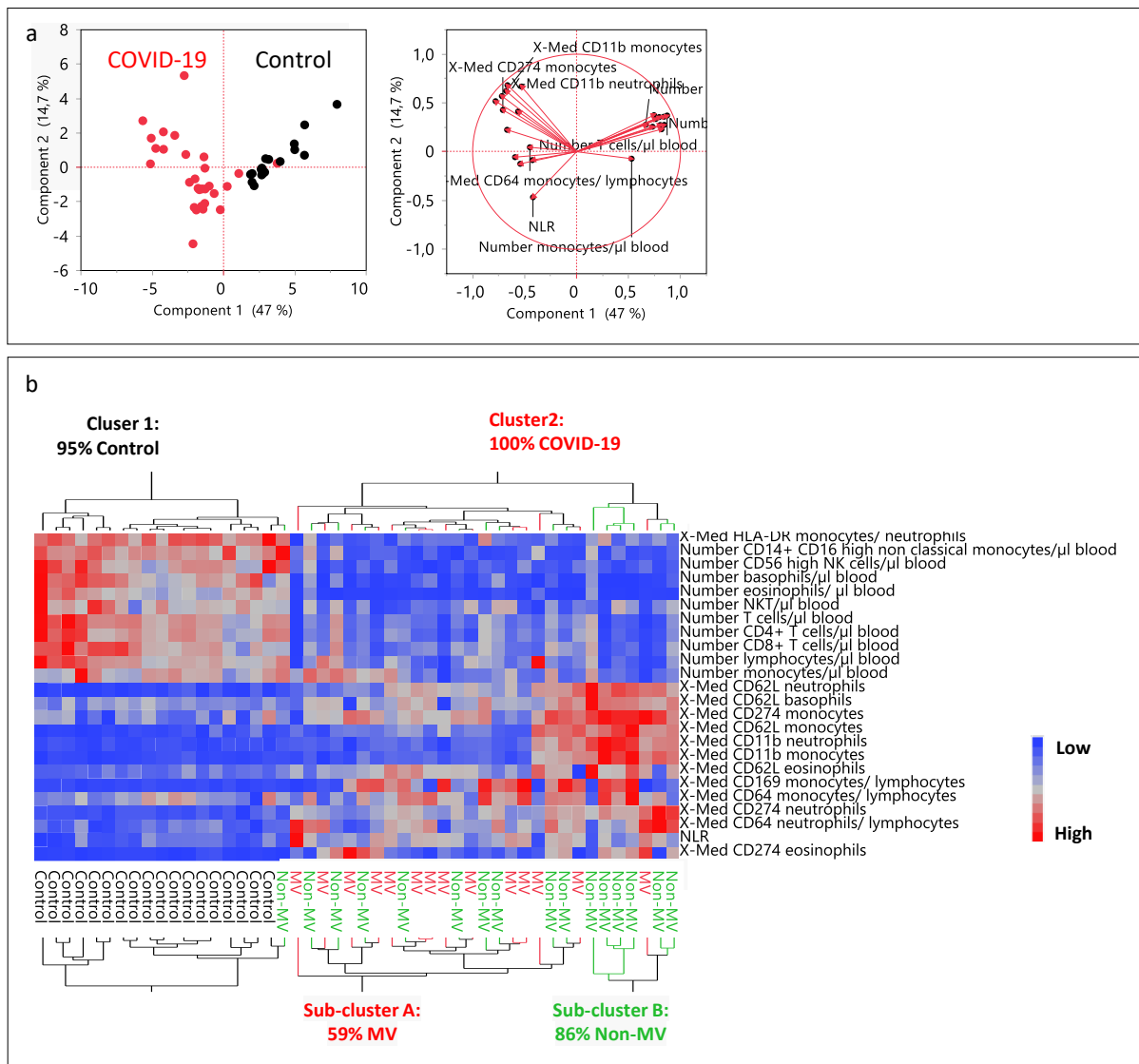


Figure 1. Graphical representation of the flow cytometry parameters which discriminated COVID-19 patients from healthy controls at hospital admission.

Only the parameters with significant false discovery rate p-value (≤ 0.05) were selected for the comparison.

A: Principal component analysis (PCA) showing the distribution of flow cytometry parameters in the COVID-19 patients and the controls on the two-dimensional axis. The COVID-19 patients exhibited some heterogeneity on the y-axis.

B: Hierarchical clustering analysis showing first the separation in two clusters (COVID-19 patients and controls) and the separation in two sub-clusters of COVID-19 patients: sub-cluster A includes 59 % of patients who received mechanical ventilation during the stay whereas sub-cluster B includes 86 % of patients who had not received MV (non-MV patients).

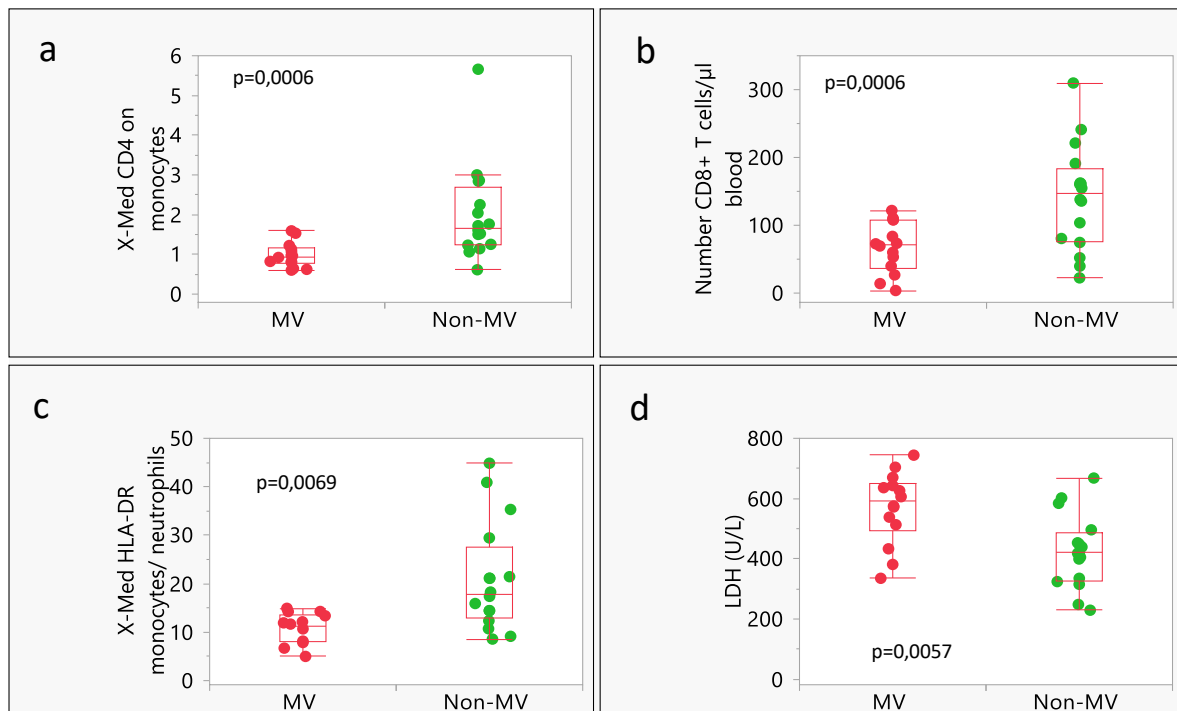


Figure 2. Box plot representation of the best discriminant parameters at hospital admission between the COVID-19 patients who received or not mechanical ventilation during the hospital stay.

Only the parameters with significant false discovery rate p-value (≤ 0.05) were selected. The two groups of patients (MV and non-MV) were compared with Mann-Whitney U test.

A: The membrane expression of CD4 on monocytes (median of the fluorescence intensity, X-Med). **B:** CD8+ T-cell count (per μL of blood). **C:** The ratio of the expression of HLA-DR on monocytes to neutrophils (signal to noise). **D:** Lactate dehydrogenase plasma level (UI/L).

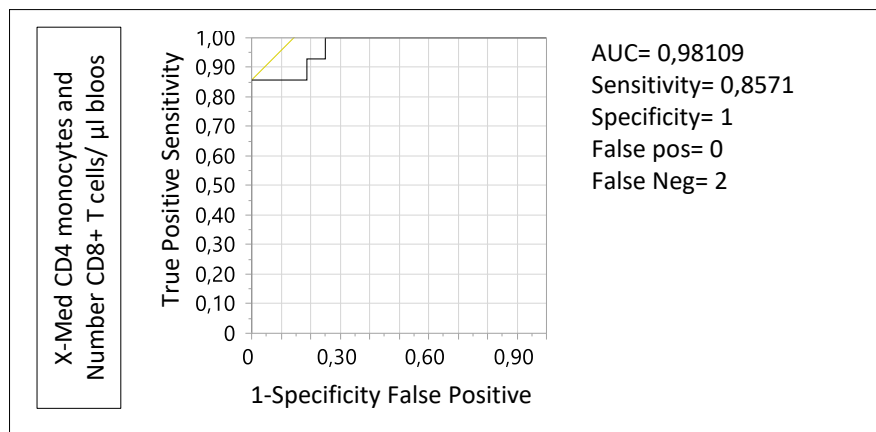


Figure 3. Receiver operating characteristic curve of the final multivariate logistic regression model combining the membrane expression of CD4 on monocytes and the CD8+ T-cell count.

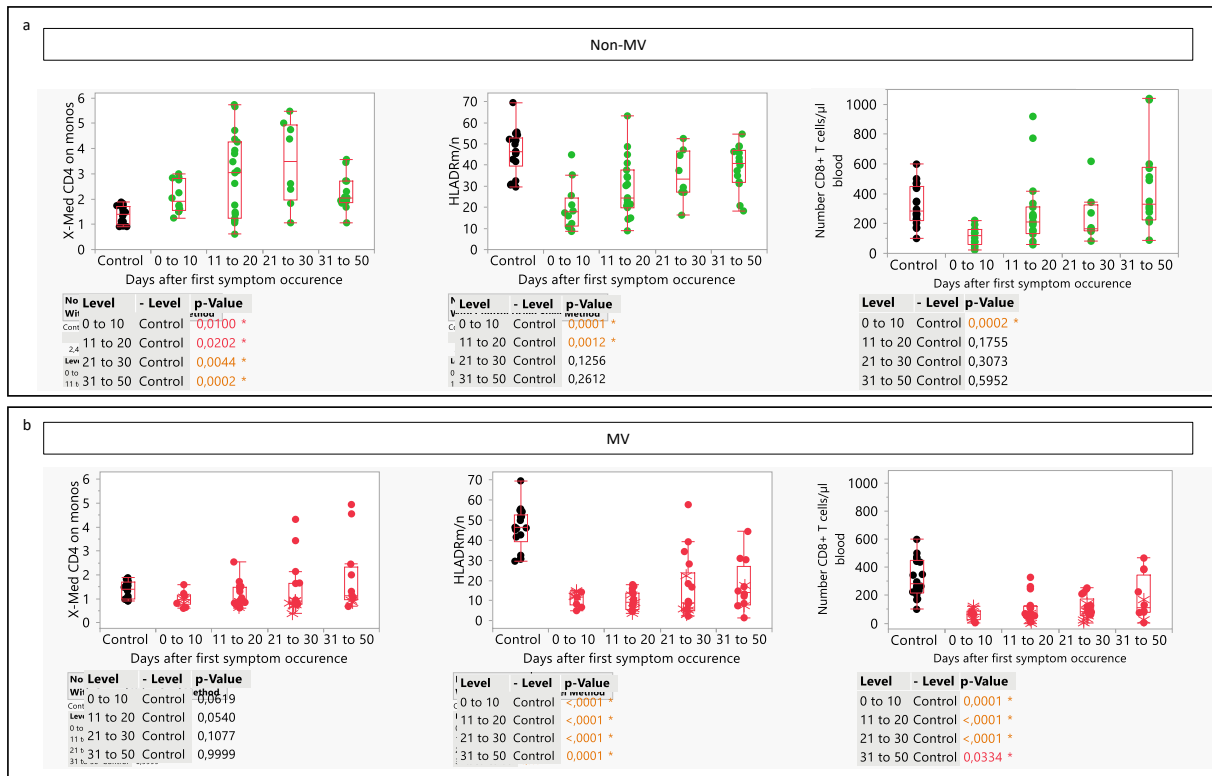
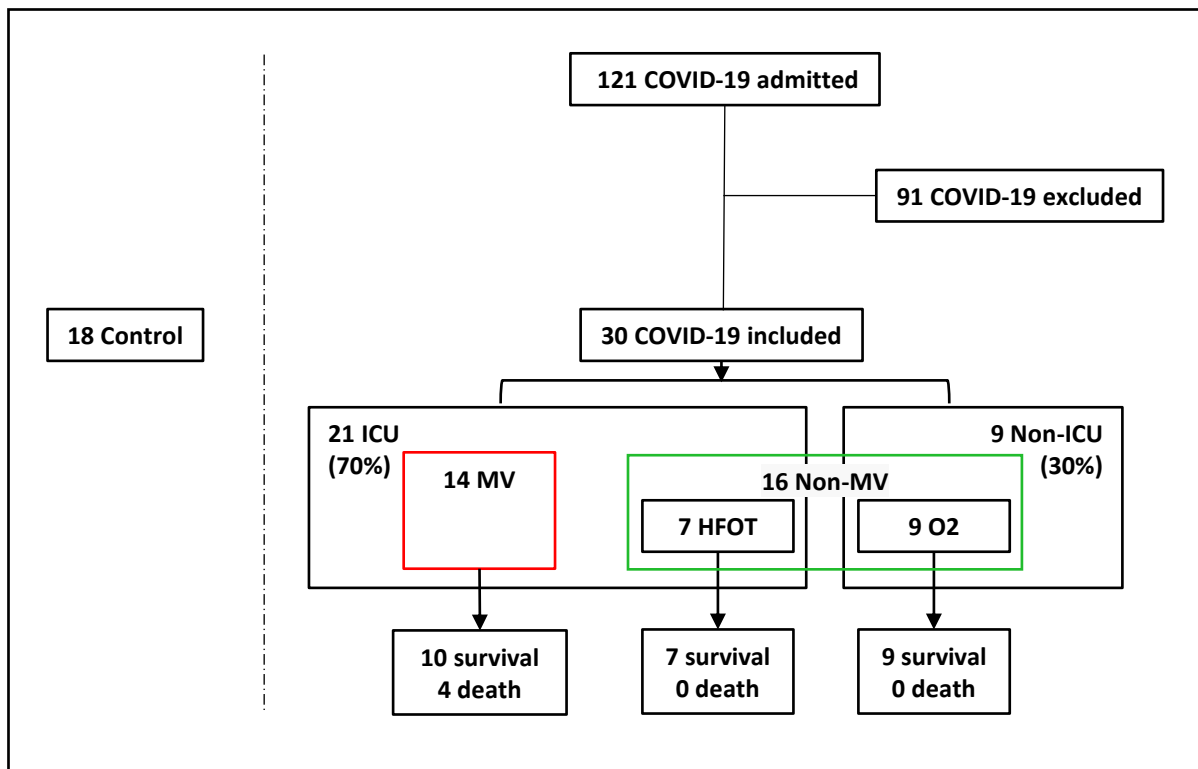


Figure 4. Kinetics of the three best flow cytometry parameters in COVID-19 patients who received or not mechanical ventilation during the hospital stay.

The three flow cytometry parameters with significant false discovery rate p-value (≤ 0.05) were the membrane expression of CD4 on monocytes (median of the fluorescence intensity, X-Med), the ratio of the expression of HLA-DR on monocytes to neutrophils and the CD8+ T-cell count. **A.** Time course of the three flow cytometry parameters at four time-intervals (i.e., the time that elapsed from symptoms onset) in the COVID-19 patients who did not receive mechanical ventilation during the stay. The parameters were compared at each time interval with data from healthy controls with Steel test. **B.** Time course of the three flow cytometry parameters at four-time intervals in the COVID-19 patients who receive mechanical ventilation during the stay. The parameters were compared at each time interval with data from healthy controls using Steel test.



Supplemental figure 1. The study flow-chart. ICU = intensive care unit; O2 = standard oxygen therapy (nasal prong or face mask); HFOT = high flow oxygen therapy; MV = mechanical ventilation.

a

Control vs COVID-19

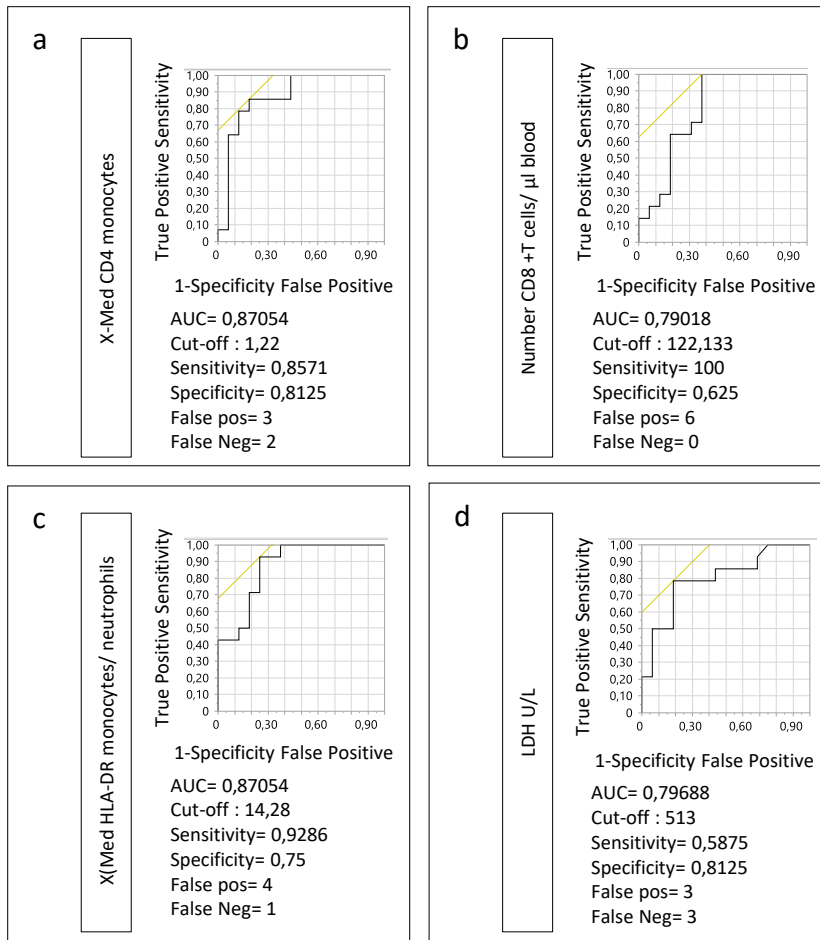
Parameter	PValue	LogWorth	FDR PValue	FDR LogWorth
X-Med HLA-DR monocytes/ neutrophils	3,60E-13	12,4	1,36E-11	10,9
Number basophils/µl blood	5,00E-11	10,3	9,56E-10	9,0
Number T cells/µl blood	9,70E-10	9,0	1,23E-08	7,9
Number CD8+ T cells/µl blood	5,02E-09	8,3	4,77E-08	7,3
Number CD14+ CD16 high non classical monocytes/µl blood	1,59E-08	7,8	1,21E-07	6,9
Number CD4+ T cells/µl blood	3,05E-08	7,5	1,65E-07	6,8
Number CD56 high NK cells/µl blood	3,00E-08	7,5	1,65E-07	6,8
Number eosinophils/ µl blood	3,07E-06	5,5	1,46E-05	4,8
X-Med CD62L neutrophils	4,49E-06	5,3	1,90E-05	4,7
Number NKT/µl blood	1,47E-05	4,8	5,58E-05	4,3
X-Med CD274 monocytes	2,59E-05	4,6	8,93E-05	4,0
Number lymphocytes/µl blood	4,26E-05	4,4	1,24E-04	3,9
X-Med CD169 monocytes/ lymphocytes	4,21E-05	4,4	1,24E-04	3,9
X-Med CD274 neutrophils	2,00E-04	3,7	5,44E-04	3,3
X-Med CD64 neutrophils/ lymphocytes	3,10E-04	3,5	7,83E-04	3,1
X-Med CD62L eosinophils	4,00E-04	3,4	9,47E-04	3,0
X-Med CD62L monocytes	7,00E-04	3,2	1,56E-03	2,8
NLR	3,21E-03	2,5	6,78E-03	2,2
X-Med CD11b neutrophils	4,05E-03	2,4	8,09E-03	2,1
X-Med CD11b monocytes	5,96E-03	2,2	1,08E-02	2,0
X-Med CD274 eosinophils	5,68E-03	2,2	1,08E-02	2,0
X-Med CD62L basophils	8,01E-03	2,1	1,38E-02	1,9
X-Med CD64 monocytes/ lymphocytes	2,27E-02	1,6	3,75E-02	1,4
Number monocytes/µl blood	2,39E-02	1,6	3,78E-02	1,4
X-Med CD11b basophils	4,39E-02	1,4	6,68E-02	1,2
X-Med CD294 basophils	5,06E-02	1,3	7,39E-02	1,1
Number CD14+ high CD16- classical monocytes/µl blood	5,39E-02	1,3	7,53E-02	1,1
Number NK cells/µl blood	5,55E-02	1,3	7,53E-02	1,1
Number CD14+ high CD16+ intermediate monocytes/µl blood	1,18E-01	0,9	1,54E-01	0,8
X-Med CD274 basophils	2,27E-01	0,6	2,81E-01	0,6
X-Med CD294 eosinophils	2,29E-01	0,6	2,81E-01	0,6
Number neutrophils/ µl blood	3,23E-01	0,5	3,83E-01	0,4
X-Med CD16 on NK cells	3,49E-01	0,5	4,02E-01	0,4
X-Med CD11b eosinophils	4,88E-01	0,3	5,30E-01	0,3
X-Med CD4 on monocytes	4,88E-01	0,3	5,30E-01	0,3
X-Med CD16 on neutrophils CD16+	7,88E-01	0,1	7,88E-01	0,1
Number leucocytes/µl blood	7,78E-01	0,1	7,88E-01	0,1
Number B cells/µl blood	7,62E-01	0,1	7,88E-01	0,1

b

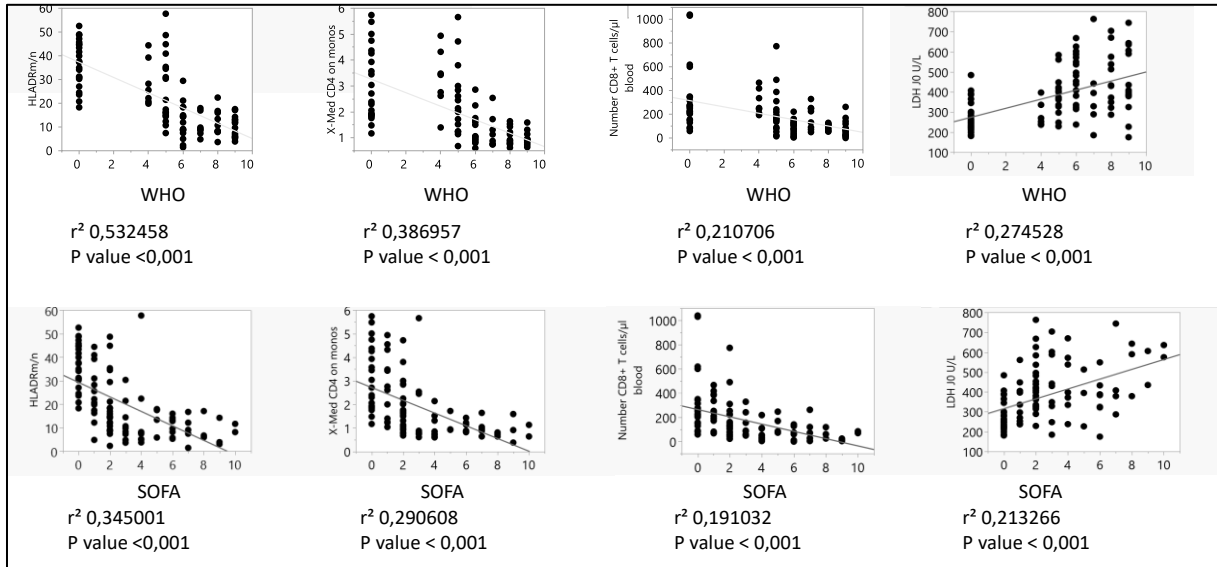
MV vs non-MV

Parameter	PValue	LogWorth	FDR PValue	FDR LogWorth
X-Med CD4 on monocytes	4,18E-03	2,4	4,70E-02	1,3
Number CD8+ T cells/µl blood	3,38E-03	2,5	4,70E-02	1,3
X-Med HLA-DR monocytes/ neutrophils	2,08E-03	2,7	4,70E-02	1,3
LDH (U/L)	2,71E-03	2,6	4,70E-02	1,3
Number T cells/µl blood	1,04E-02	2,0	9,33E-02	1,0
Number basophils/µl blood	2,27E-02	1,6	1,27E-01	0,9
X-Med CD11b neutrophils	2,71E-02	1,6	1,27E-01	0,9
X-Med CD11b monocytes	3,10E-02	1,5	1,27E-01	0,9
X-Med CD62L basophils	3,06E-02	1,5	1,27E-01	0,9
Number CD4+ T cells/µl blood	2,80E-02	1,6	1,27E-01	0,9
Creatinine (µmol/L)	2,08E-02	1,7	1,27E-01	0,9
Age (years)	3,44E-02	1,5	1,27E-01	0,9
NLR	3,67E-02	1,4	1,27E-01	0,9
Number NKT/µl blood	4,91E-02	1,3	1,58E-01	0,8
BMI	6,33E-02	1,2	1,64E-01	0,8
X-Med CD274 monocytes	6,92E-02	1,2	1,64E-01	0,8
X-Med CD16 on neutrophils CD16+	6,84E-02	1,2	1,64E-01	0,8
Number leucocytes/µl blood	6,35E-02	1,2	1,64E-01	0,8
Number NK cells/µl blood	6,83E-02	1,2	1,64E-01	0,8
X-Med CD274 neutrophils	9,32E-02	1,0	2,10E-01	0,7
Number neutrophils/ µl blood	1,00E-01	1,0	2,15E-01	0,7
X-Med CD64 monocytes/ lymphocytes	1,06E-01	1,0	2,17E-01	0,7
X-Med CD62L monocytes	1,58E-01	0,8	3,01E-01	0,5
CRP (mg/L)	1,61E-01	0,8	3,01E-01	0,5
X-Med CD294 eosinophils	1,84E-01	0,7	3,18E-01	0,5
Number CD14+ high CD16+ intermediate monocytes/µl blood	1,79E-01	0,7	3,18E-01	0,5
Number eosinophils/ µl blood	1,98E-01	0,7	3,31E-01	0,5
Number CD56 high NK cells/µl blood	2,27E-01	0,6	3,66E-01	0,4
X-Med CD16 on NK cells	2,37E-01	0,6	3,68E-01	0,4
Number CD14+ CD16 high non classical monocytes/µl blood	2,60E-01	0,6	3,90E-01	0,4
X-Med CD294 basophils	2,90E-01	0,5	4,16E-01	0,4
X-Med CD62L neutrophils	3,05E-01	0,5	4,16E-01	0,4
Ferritin (µg/L)	3,00E-01	0,5	4,16E-01	0,4
X-Med CD11b basophils	4,01E-01	0,4	5,30E-01	0,3
D-dimer (µg/mL)	4,44E-01	0,4	5,71E-01	0,2
Number B cells/µl blood	4,63E-01	0,3	5,79E-01	0,2
Number monocytes/µl blood	4,84E-01	0,3	5,89E-01	0,2
Number CD14+ high CD16- classical monocytes/µl blood	5,40E-01	0,3	6,40E-01	0,2
X-Med CD169 monocytes/ lymphocytes	6,46E-01	0,2	7,46E-01	0,1
X-Med CD274 eosinophils	7,65E-01	0,1	8,61E-01	0,1
X-Med CD11b eosinophils	8,91E-01	0,0	9,31E-01	0,0
X-Med CD274 basophils	9,31E-01	0,0	9,31E-01	0,0
X-Med CD62L eosinophils	9,30E-01	0,0	9,31E-01	0,0
Number lymphocytes/µl blood	8,87E-01	0,1	9,31E-01	0,0
X-Med CD64 neutrophils/ lymphocytes	8,78E-01	0,1	9,31E-01	0,0

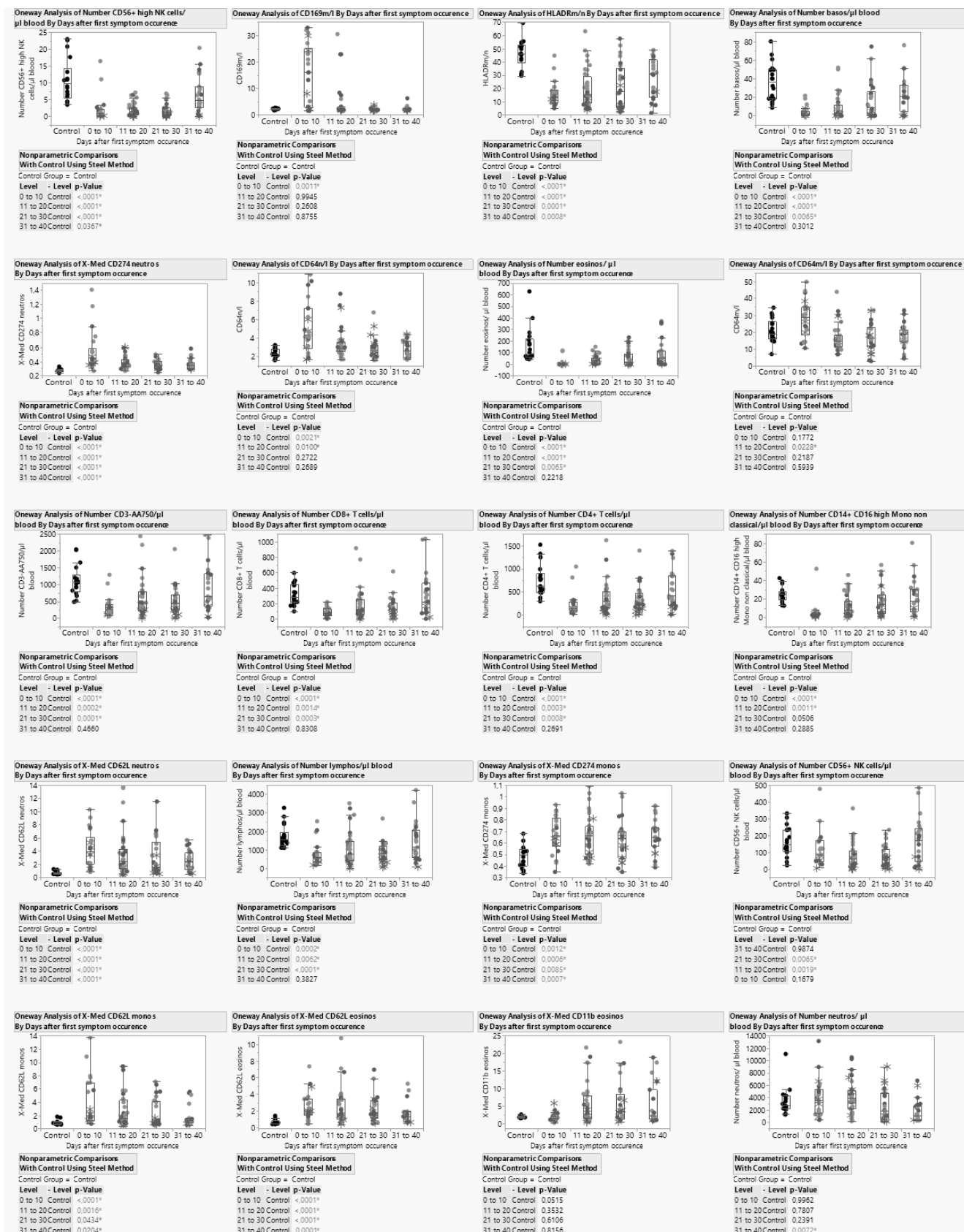
Supplemental figure 2. Response screen analyses comparing control and COVID-19 groups (a) and comparing non-MV and MV groups (b). p value is calculated upon ANOVA test and FDR p value is adjusted according to the Benjamini-Hochberg procedure.

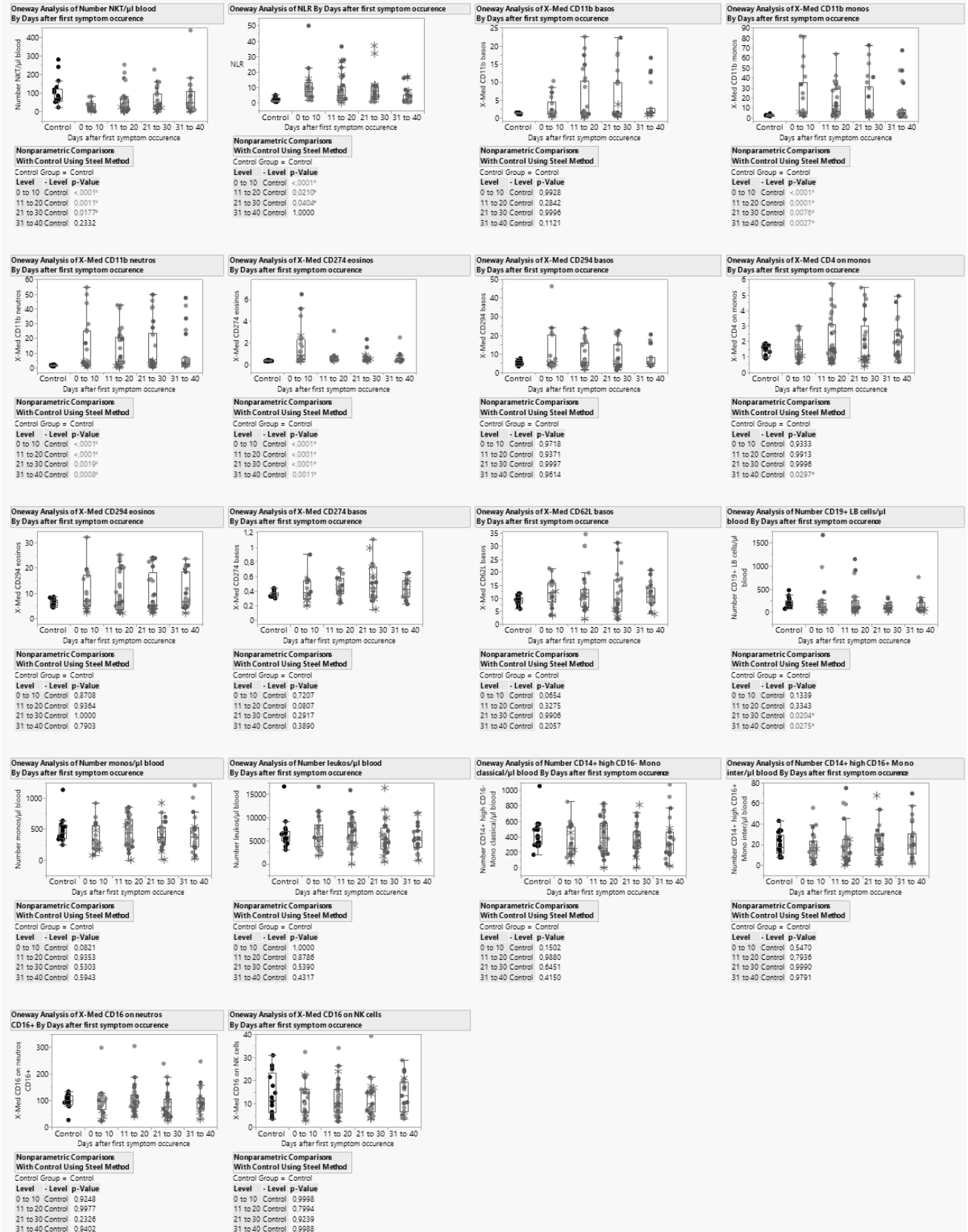


Supplemental figure 3. Receiver operating characteristic curve of the four best predictors yielded by the response screen and based on FDR p values: CD4 on monocytes (A), of CD8+ cell count (B), HLA-DR on monocytes (C), and LDH (D).



Supplemental figure 4. Pearson correlations and coefficients of determination (r^2) of the 4 best factors correlated with WHO and SOFA.





Supplemental figure 5. Progression analysis of the studied parameters over the course disease on Kruskal Wallis test.

Table 1. Demographic and clinical characteristics of the study population

Variables, units	COVID-19	Control
N	30	18
Age, yr	61 (50-71)	44 (34-53)
Sex, Male, n (%)	26 (87)	14 (70)
BMI, kg/m ²	30 (26-32)	25 (23-27)
Comorbidities, n (%)		
Diabetes	12 (40)	0
Hypertension	15 (50)	0
Chronic pulmonary diseases	3 (10)	0
Chronic heart diseases	5 (17)	0
Chronic liver diseases	0	0
Chronic renal failure	0	0
Active cancer	0	0
Immunosuppression	0	0
Characteristics at hospital admission		
Time from onset of symptom to hospital admission, days	8 (6-10)	-
Time from onset of symptom to enrollment, days	9 (7-11)	-
Time from hospital admission to enrollment, days	1 (1-2)	-
SAPS II, at admission	24 (18-35)	-
SOFA, at admission	2 (2-3)	-
Immune therapies during the stay		
Early corticosteroid therapy (dexamethasone), n (%)	28 (93)	-
Time from hospital admission to treatment, days	0 (0-1)	-
Rescue corticosteroid therapy (methylprednisolone), n (%)	8 (27)	-
Time from hospital admission to treatment, days	13 (11-15)	-
IL-6 receptor blocker (tocilizumab), n (%)	7 (23)	-
Time from hospital admission to treatment, days	1 (1-2)	-
Main outcomes		
ICU admission during the stay, n (%)	21 (70)	-
Length of hospital stay, days	14 (8-29)	-
Hospital mortality, n (%)	4 (13)	-
Maximal respiratory and organ support during the stay		
Oxygen (WHO-CS grade 5), n (%)	9 (30)	-
HFOT or NIV (WHO-CS grade 6), n (%)	7 (23)	-
MV (WHO-CS grade 7-9), n (%)	14 (47)	-

vvECMO, n (%)	3 (10)	-
Time from onset of symptom to onset of MV, days	9 (8-12)	-
Length of MV, days	15 (8-28)	-
Need for vasopressor, n (%)	10 (33)	-
Need for renal-replacement therapy, n (%)	3 (10)	-

Definition of abbreviations: BMI = body mass index; SAPS II = simplified acute physiologic score; SOFA = sequential organ failure assessment score; ICU = intensive care unit; WHO-CS = world health organization clinical progression scale; HFOT = high flow oxygen therapy; NIV = non-invasive ventilation; MV = mechanical ventilation; ECMO_{vv} = venovenous extracorporeal membrane oxygenation. SGOT = serum glutamic oxaloacetic transaminase. Data are expressed as median (interquartile range 25-75%) unless otherwise specified. *Normal values of D-dimer depend on age above 50 years and should be adjusted according to the following formula: $0.5 + (\text{age} \times 0.01)$. Non-evaluated parameters are represented by a dash (-).

Table 2. Univariate comparisons at hospital admission between COVID-19 patients according to the need for mechanical ventilation during the hospital stay.

Variables, units	MV	Non-MV	P Value
N	14	16	
Age, yr	69.5 [56-72]	53 [42-68]	0.032
Sex, Male, n (%)	12 (86)	14 (88)	0.888
BMI, kg/m ²	30 [29-33]	28 [25-30]	0.058
SAPS II, at admission	26 [21-37]	21 [18-30]	0.104
SOFA, at admission	2 [2-3]	2 [2-2]	0.066
Comorbidities, n (%)			
Diabetes	7 (50)	5 (31)	0.304
Hypertension	9 (64)	6 (38)	0.15
Chronic pulmonary diseases	1 (7)	2 (13)	0.631
Chronic heart diseases	4 (29)	1 (6)	0.107
Characteristics at hospital admission			
Time from first symptom to hospital admission, days	8 [6-10]	8 [6-10]	0.752
Time from first symptom to first sample, days	9 [7-11]	9 [8-11]	0.883
Immune therapies during the stay			
Corticosteroid therapy prior sample, n (%)	14 (100)	12 (75)	0.048
IL-6 receptor blocker prior sample, n (%)	1 (7)	1 (6)	0.923
Laboratory tests at inclusion (normal values)			
Leukocytes, ×10 ⁹ /L (4-11)	9.7 [7.7-12.5]	7.9 [5.4-10.1]	0.042
Neutrophils, ×10 ⁹ /L (1.8-6.6)	8.8 [6.8-11.4]	6.5 [4.3-8.5]	0.02
Lymphocytes, ×10 ⁹ /L (1.2-3.9)	0.54 [0.42-0.78]	0.86 [0.62-1.08]	0.05
Neutrophils/Lymphocytes Ratio	14.5 [9.5-21.5]	7.1 [4.8-9.5]	0.002
Monocytes, ×10 ⁹ /L (0.2-0.8)	0.39 [0.22-0.63]	0.36 [0.29-0.6]	0.546
Platelets, ×10 ⁹ /L (160-390)	230 [193-276]	250 [190-287]	0.647
D-dimer, µg/mL (<0.5*)	1.31 [0.96-2.15]	1.1 [0.59-1.76]	0.198
Fibrinogen, g/L (2-4)	7.4 [6.8-7.8]	7 [6.6-7.6]	0.406
C-reactive protein, mg/L (<5)	192 [172-286]	148 [109-203]	0.146
Procalcitonine, ng/mL (<0.5)	0.2 [0.09-0.63]	0.37 [0.2-0.67]	0.485
Ferritin, µg/L (20-250)	1253 [811-1794]	969 [651-1389]	0.17
SGOT, U/L (<50)	56 [44-67]	46 [32-93]	0.574
Lactate dehydrogenase, U/L (<248)	591 [513-643]	420 [330-475]	0.006
Creatinine, µmol/L (59-104)	80 [67-102]	60 [52-76]	0.008
High-sensitivity Troponin, ng/L (<19.8)	13.8 [6.8-25.7]	16.5 [8.9-25.2]	0.862

Definition of abbreviations: BMI = body mass index; SAPS II = simplified acute physiologic score; SOFA = Sequential Organ Failure Assessment.

Data are expressed as median [interquartile range 25-75%] unless otherwise specified.

* Normal values of D-Dimer depend on age above 50 years and should be adjusted according to the following formula: $0.5 + (\text{age} \times 0.01)$.

Supplemental Table 1. Flow cytometry panels of the study.

Panel	Conjugates	Format
DURAClone IM Phenotyping Basic	CD16-FITC, CD56-PE, CD19-ECD, CD14-PC7, CD4-APC, CD8-AF700, CD3-APC-AF750, and CD45-KrO	Dried
DURAClone IM Granulocytes	CD294-FITC, CD16-ECD, CD33-PC5.5, CD11b-PC7, CD274-APC, CD3-CD19-CD56-CD14 APC-AF700, CD62L-APC-AF750, CD15-PB, and CD45-KrO	Dried
IOTest Myeloid Activation Antibody Cocktail	CD169-PE, HLA-DR-APC, and CD64-PB	Liquid

Supplemental Table 2. Final multivariate logistic regression model of parameters associated with the need of mechanical ventilation during the hospital stay among COVID-19 patients.

Parameter	Estimate	SE	Wald X²	Pr>X²	OR	95% CI
Intercept	10,174	4,005	6,452	0,011	-	
CD4 on monocytes	-4,746	2,214	4,593	0,032	0,0087	0,0001 to 0,6665
T-CD8+ cell count	-0,044	0,0198	4,943	0,026	0,9569	0,9205 to 0,9948

Definition of abbreviations: SE = standard estimate, OR = odd ratio, CI = confidence interval.

Dans cette étude, nous avons identifié les biomarqueurs les plus pertinents sur le plan clinique par une analyse non supervisée de 38 paramètres immunitaires ainsi que 6 paramètres de laboratoires, enregistrés dans les 48 premières heures de l'admission à l'hôpital. Nous avons confirmé une signature COVID-19 comprenant : 1) une régulation positive de CD169, CD64, des marqueurs d'adhésion/migration (CD62L et CD11b) et de l'inhibiteur immunitaire CD274 ; 2) ; une réduction de l'expression de HLA-DR ; et 3) une diminution du nombre de basophiles, d'éosinophiles, de cellules T, de cellules NK et de monocytes non classiques (patrouilleurs). Ces altérations ont persisté dans le temps, de 10 à 40 jours après l'apparition des symptômes.

Les patients COVID-19 nécessitant une ventilation mécanique (VM ou « MV ») présentaient une expression significativement plus **faible de HLA-DR et de CD4 sur les monocytes**, ainsi qu'un nombre réduit de **cellules T CD8+** par rapport aux patients ne nécessitant pas de VM. Ces trois paramètres biologiques ont permis de prédire les besoins en VM avec des valeurs AUC respectives de 0,87, 0,87 et 0,79. Grâce à une analyse multivariée, un modèle a été défini associant les niveaux d'expression du CD4 et le nombre de T CD8+. Ces deux variables ont été sélectionnées dans le modèle car elles présentaient les colinéarités les plus faibles et restaient significatives après association. Le **modèle final présentait une AUC de 0,98**.

Les résultats dans leur ensemble démontrent que de la méthode en une étape combinée à des biomarqueurs d'intérêt soigneusement sélectionnés présente un potentiel dans le **diagnostic de l'étiologie des infections** quel que soit le pathogène mis en cause, mais aussi dans la **stratification des patients et la prédiction des formes graves de la maladie**.

Par ailleurs, l'étude des aspects fondamentaux de ces biomarqueurs lors de la réponse anti-infectieuse est nécessaire car elle permet la compréhension des mécanismes qui soutiennent l'apparition de ces biomarqueurs lors d'une infection.

4. L'étude des mécanismes d'induction des biomarqueurs d'intérêt

Les cellules myéloïdes possédant des récepteurs de reconnaissance de l'immunité innée **identifient les PAMP** et les **DAMP** provenant de micro-organismes et déclenchent une réponse inflammatoire robuste qui entraîne l'activation de différentes cascades de signalisation en fonction de la nature de l'agent infectieux. Cette interaction hôte/pathogène peut directement **induire la régulation à la hausse des biomarqueurs** d'intérêt comme nous l'avons montré précédemment lors de l'activation *in vitro* des monocytes par la protéine spike du SARS-CoV-2 (résultats publiés dans « *pathogens* »), ou alors de manière indirecte via l'induction de médiateurs antibactériens ou antiviraux, tels que **les IFN**. En particulier, la sécrétion **d'IFN-I** a été suggérée comme une réponse cellulaire spécifique des **infections virales** alors que **l'IFN-II** contribue principalement à la clairance des infections **bactériennes**. L'IFN-I et l'IFN-II sont donc des signatures claires associées aux infections virales et bactériennes mais leur courte durée de vie dans les fluides corporels ne permet pas une différenciation robuste.

La compréhension du lien fonctionnel qui existe entre les deux biomarqueurs et les IFNs produits en réponse aux infections pourrait aider à démontrer la pertinence de l'utilisation de ces biomarqueurs pour distinguer les infections bactériennes et virales. L'objectif principal de l'étude qui suit était donc de comprendre ce lien en activant *in vitro* des échantillons de sang total par de l'IFN-I, de l'IFN-II, des interleukines, ou des extraits infectieux tels que l'acide polyinosinique (Poly IC) ou le LPS afin d'imiter un état infectieux. Les expressions de CD64 et CD169 ont été évaluées dans ces échantillons par la procédure rapide de cytométrie en flux.

Ces travaux ont été effectués au tout début de la thèse et ont fait l'objet d'une publication dans « *Immunity, inflammation and disease* » intitulée : « **Rôle des interférons dans l'expression de CD64 et CD169 dans le sang total : Pertinence dans l'orientation de la réponse immunitaire virale ou bactérienne** », présentée en annexe 5.²³⁴

Dans cette étude, nous avons démontré que le **CD169** était augmenté à la surface des monocytes après 7h de stimulation par l'**IFN-I**, et que le **CD64** était augmenté à la surface des neutrophiles après 7h de stimulation par l'**IFN-II** (figure 32). Il a été observé ensuite que le CD64 et le CD169 peuvent être détectés en intracellulaire dès 4h de stimulation, et que les niveaux d'expression augmentent ensuite rapidement pendant au moins 24h. Par ailleurs, l'IFN-I et l'IFN-II semblent avoir des effets inhibiteurs croisés l'un sur l'autre en ce qui concerne l'induction de CD169 ou de CD64, respectivement, ce qui reflèterait l'orientation du système immunitaire en réponse à un virus ou à une bactérie.

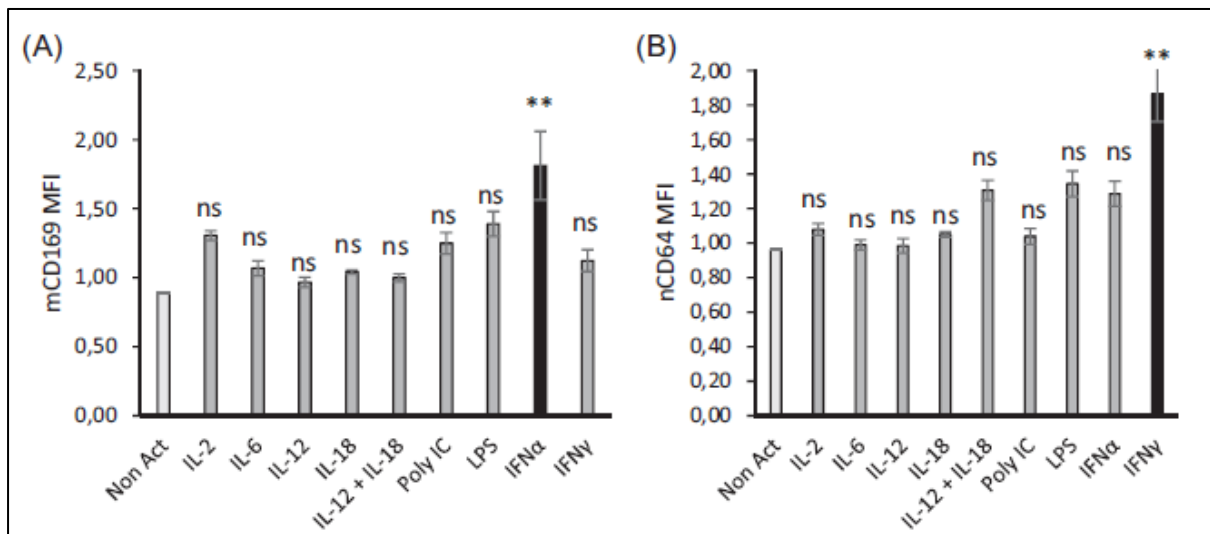


Figure 32 : Expressions de CD169 et CD64 après stimulation du sang. Le sang entier de trois donneurs a été coexposé pendant 7 heures à 37°C avec soit aucun activateur (Non Act), soit des interleukines (IL-2, IL-6, IL-12, IL-18, IL-12 + IL-18) ou des extraits infectieux (Poly IC, lipopolysaccharide [LPS]) ou des interférons (IFNα1 et IFN-γ). Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes ± écarts types de la médiane des intensités de fluorescence (MFI) de CD169 sur les monocytes (mCD169) (A) et de CD64 sur les neutrophiles (nCD64) (B). La comparaison de chaque condition avec le contrôle (Non Act) a été effectuée à l'aide du test de Dunnett, et la valeur P a été considérée comme non significative (ns) au-dessus de 0,05 (en gris ; ns) ou statistiquement significative en dessous de 0,05 (en noir ; ns).

Cependant, les pathogènes impliqués *in vivo* peuvent dévier la machinerie cellulaire conduisant à une réponse IFN de l'hôte différente. Par exemple, certains rapports ont montré que la **réponse IFN est tronquée** dans les formes sévères de **COVID-19** par des mécanismes cellulaires, des déficiences en IFN, ou l'induction d'auto-anticorps anti-IFN-I. Pourtant, nos résultats précédents ont montré une **très forte expression de l'ISG CD169** chez la majorité des patients atteints de la COVID-19 y compris chez ceux présentant des formes sévères. Ces observations suggèrent que **d'autres voies, indépendantes de l'IFN, pourraient être impliquées dans la régulation à la hausse du CD169**. Cela rejoint nos résultats *in vitro* précédents montrant une **induction directe du CD169 par interaction de la Spike avec les monocytes**.

L'ensemble de ces résultats montrent que les **phénotypes** les plus **graves** de la **COVID-19** sont associés à une **dérégulation des fréquences des sous-populations** leucocytaires (lymphopénie, basopénie, éosinopénie, et augmentation du nombre de neutrophiles) ainsi qu'à une **dérégulation de l'expression de récepteurs membranaires** (baisse du CD4 et HLA-DR sur les monocytes) et de la **production de médiateurs solubles** (production d'IFN tronquée et production excessive de cytokines pro-inflammatoires). Sur le plan clinique, ces formes sévères de la COVID-19 sont associées à la présence de **comorbidités** comme le diabète, l'hypertension et l'obésité. Néanmoins, un **biais du sexe ainsi qu'un biais de l'âge forts et indépendants** de la présence de comorbidités sont observés ²³⁷ (figure 33).

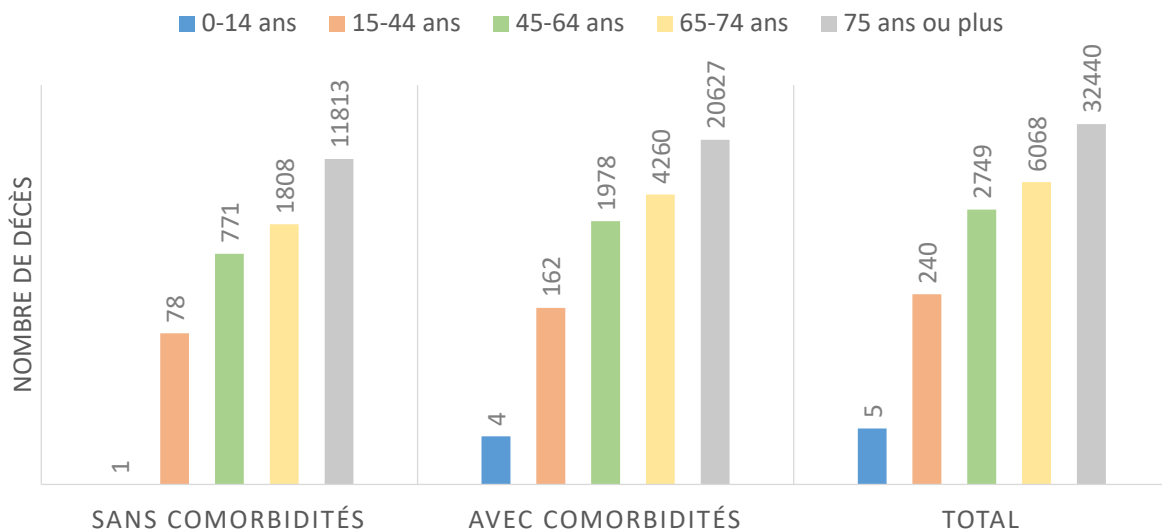


Figure 33 : Nombre de décès certifiés par voie électronique avec une mention COVID-19 dans les causes médicales de décès, du 1er mars 2020 au 29 mars 2021. Adapté de ²³⁷.

Certaines études comparant la prévalence des cas asymptomatiques selon l'âge indiquent que de façon générale la probabilité d'avoir une forme asymptomatique diminue avec l'âge. Plusieurs travaux suggèrent que la réponse immunitaire au SARS-CoV-2 est plus faible chez les patients asymptomatiques par rapport aux patients symptomatiques. Cependant, malgré la puissance statistique de ces travaux, d'autres études suggèrent plutôt une réponse immunitaire similaire ²³⁸.

Il est connu que l'épuisement du système immunitaire et le potentiel inflammatoire augmentent avec l'âge. Ce phénomène, également appelé **vieillesse inflammatoire** « inflamm-aging » pourrait expliquer le biais de sévérité de la maladie ²³⁹. Cependant, malgré les progrès transversaux réalisés au cours des derniers mois, à notre connaissance, on ne connaît toujours pas par quel mécanisme précis le SARS-CoV-2 induit des formes de maladie plus sévères chez l'adulte. Pour tenter de répondre à cette question, nous nous sommes concentrés sur les paramètres précédemment décrits comme étant associés à la sévérité de la COVID-19, et en particulier sur les monocytes, car de plus en plus de preuves montrent qu'ils peuvent jouer un rôle central dans l'orchestration d'une réponse immunitaire dérégulée ²⁴⁰.

Dans l'étude qui suit, nous avons réalisé un immunophénotypage assez exhaustif, par cytométrie en flux, de deux cohortes d'adultes et d'enfants sains. Comme il a été démontré que la protéine spike active les monocytes et les macrophages, nous avons développé un test fonctionnel *in vitro*, sur sang total, mimant une infection par le SARS-CoV-2. En parallèle de

l'immunophénotypage, nous avons utilisé ce test fonctionnel afin de caractériser et de comparer les réponses immunitaires des deux cohortes adultes versus enfants.

Ces travaux font l'objet d'une soumission dans *Scientific Reports*, intitulée : « **Pourquoi la COVID-19 est-elle plus agressive envers les adultes qu'envers les enfants ? L'activation différentielle des monocytes par la protéine Spike du SARS-CoV-2 pourrait expliquer ce biais** ».

Why is COVID-19 more aggressive toward adults than children? Differential monocyte activation by SARS-CoV-2 spike protein may explain this bias

Ines Ait-Belkacem^{1,2†}, Celia Cartagena García^{1,3†}, Ewa Millet-Wallisky¹, Nicolas Izquierdo¹, Marie Loosveld⁴, Isabelle Arnoux⁴, Pierre-Emmanuel Morange⁴, Franck Galland², Nathalie Lambert³, Fabrice Malergue¹, and Jean-Marc Busnel¹

¹Department of Research and Development, Beckman Coulter Life Sciences-ImmunoTech, Marseille, France

²Aix Marseille Université CNRS INSERM CIML Centre d'Immunologie de Marseille - Luminy, Marseille, France

³INSERM UMRs 1097, Aix Marseille University, Marseille, France

⁴Department of Immunology Laboratory, Timone University Hospital, APHM, Marseille, France

†These authors contributed equally to this work

For correspondence: fmalergue@beckman.com and jmbusnel@beckman.com

Key words: SARS-CoV-2, COVID-19, age, severity, whole blood, flow cytometry, spike

Abstract

A strong bias related to age is observed in COVID-19 patients with pediatric subjects developing a milder disease than adults. We hypothesized that a specific SARS-CoV2 effect conjugated with preexisting differences in the immune systems may explain this.

Using flow cytometry, we investigated basal immune differences in a cohort of non-infected young and aged individuals and further leveraged an in vitro whole blood model of SARS-CoV-2 infection so that functional differences could be mined as well.

Following unsupervised analysis, we first confirmed that the immune lymphoid and myeloid systems in adults are less efficient and prone to develop higher inflammation than those in children. We notably identified in adults a higher CD43 lymphocyte expression, known for its potentially inhibitory role.

The spike protein induced different responses between adults and children, notably a higher increase of inflammatory markers together with lower monocyte and B cell activation in adults. Interestingly, CD169, a CD43 ligand overexpressed in COVID-19 patients, was confirmed to be strongly modulated by the spike protein.

In conclusion, the spike protein exacerbated the preexisting lower immune responsiveness and higher inflammatory potential in adults. Altogether, some of the markers identified may explain the marked age bias and be predictive of severity.

Introduction

COVID-19 disease is a global health threat that remains poorly understood. It is often associated with asymptomatic and mild symptoms but may progress to severe pneumonia leading to ARDS (acute respiratory distress syndrome). These severe cases require ICU (intensive care unit) admission and/or respiratory assistance ¹.

This disease is caused by the SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus), which is composed of a single-stranded RNA and a nucleocapsid (N) protein. Both are encapsulated in an envelope that contains different proteins including the spike protein (S) ².

When entering into the upper respiratory tract of the lung, the spike protein encounters and binds to the angiotensin-converting enzyme 2 receptor (ACE2). Largely expressed on the lung epithelium, ACE2 allows the virus to enter host cells ³. SARS-CoV-2 infection leads to major releases of PAMPs (pathogen associated molecular patterns) and DAMPs (damage associated molecular patterns) that activate innate immune cells through their PRRs (pathogen-recognition receptors). Thus, endosomal TLR7 (toll-like receptor 7), TLR3, and RLR (RIG-like receptor) can detect single-stranded RNA (ssRNA) and induce the activation of IRF3 (interferon regulatory factor 3), IRF7 and NF- κ B (Nuclear factor κ B). This leads to the rapid production of type I and III interferons (IFN), and pro-inflammatory cytokines ⁴. Finally, the subsequent expression of interferon stimulated genes (ISGs) leads to key antiviral activity and effective innate and adaptative immune responses. The direct detection of IFN is challenging because of its low concentration and rapid clearance. Thus, measuring ISGs such as CD169 by flow cytometry may conveniently mirror IFN levels ^{5,6}. CD169 (Sialoadhesin or Siglec-1) is a cell adhesion molecule found on the surface of macrophages and IFN-I activated monocytes ⁷.

Some reports have shown that IFN response is blunted in severe forms of COVID-19 either through cellular mechanisms ⁸, IFN deficiencies ⁹, or auto-IFN-I antibodies ¹⁰. In contrast, we and others have observed a very high expression of the ISG CD169 in almost all COVID-19 patients ¹¹⁻¹⁶. This suggests that other pathways may be implicated in CD169 upregulation. Previous reports showed that SARS-CoV-2 can induce the direct activation of monocytes and macrophages through spike interaction with TLR4 and TLR2 on cell lines and mouse models ^{17,18}. Recently, Minutolo and colleagues observed CD169 upregulation upon *in vitro* stimulation of PBMCs with SARS-CoV-2 spike protein ¹⁴.

Others have shown SARS-CoV2-infection to be associated with abnormal immune response. Most severe phenotypes have one or more of three characteristics. First, they may be characterized by lung tissue damage. Second, leucocyte subpopulation dysregulation is common (lymphopenia, basopenia, eosinopenia and/or increased neutrophil count). Third, there is often an over production of pro-inflammatory cytokines and infection/inflammation-related biomarkers such as C-reactive protein (CRP) ¹⁹⁻²¹.

Comorbidities like diabetes, hypertension, and obesity are overrepresented in severe COVID-19 forms. Still, a strong and independent age bias is observed with pediatric patients developing milder diseases than adults ²²⁻²⁴. It is known that immune system exhaustion and inflammatory potential increases with age. This phenomenon is also called inflamm-aging and could explain the severity bias ²⁵. However, despite the cross-disciplinary progress achieved over the last months, to the best of our knowledge, it remains unclear by which mechanism SARS-CoV-2 virus specifically induces much more severe forms in adults, in comparison with other viruses. In an attempt to address this question, we focused on previously described parameters associated with COVID-19 disease severity and especially on monocytes since there are increasing evidences showing that they may orchestrate dysregulated immune responses ^{26,27}. We performed an exhaustive flow cytometry immunophenotyping in two non-infected cohorts of adults and children to identify the best discriminant markers. In parallel, since spike protein has been shown to activate monocytes and macrophages, we developed an *in vitro* whole blood functional assay of SARS-CoV-2 infection. This model aimed at characterizing the immune responses to spike stimulation in the two groups, and further identifying potential segregating features.

Material and methods

Samples

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and the French law on research involving humans. Residual ethylenediaminetetraacetic acid whole (EDTA) blood samples from 16 children (3 to 17 years old) and 16 adults (20 to 98 years old) were provided by the Biological Resources Center (CRB) of La Timone Hospital in May 2021, approved by the ethical committee of the Assistance Publique - Hôpitaux de Marseille (AP-HM, certified NF S96-900 & ISO 9001 v2015) and by The French ministry of Health (authorization AC-2018-3105). Informed consents were obtained from the subjects aged above 18 years and from the parents/legally authorized representative of the subjects aged under 18 years. All samples were pseudonymized and subject care was not modified. Donors were double negative for CD169 viral and CD64 bacterial markers and considered as infection-free²⁸.

Extracellular staining

For immunophenotyping, an infection related panel together with panels dedicated to granulocytes, T cells, B cells and dendritic cells (Table 1) were processed according to the recently developed rapid one-step method²⁸. Briefly, whole blood was simultaneously lysed and stained in a lysing/fixative buffer (Versalyse containing Fixative solution 0,05X, Beckman Coulter, Brea, USA) for at least 20 minutes.

Systemic activation panel was processed as follow: after 30 minutes of staining, OptiLyseC was added to lyse red blood cells following the manufacturer's instruction (Beckman Coulter, Brea, USA).

Granulocyte activation panel was treated as follow: after 30 minutes of staining, VersaLyse was added to lyse red blood cells following the manufacturer's instruction (Beckman Coulter, Brea, USA).

For all panels, cells were concentrated by centrifugation for 5 minutes at 150g and resuspended in Phosphate-Buffered Saline (PBS) before flow cytometry analysis.

Intracellular staining

Cytokine and regulatory T cell (Treg) panels were processed by fixing and further permeabilizing the cells following Perfix-nc manufacturer's instructions for use (Beckman Coulter, Brea, USA). All samples were concentrated by centrifugation (300g, 5 minutes) and resuspended in PBS prior to analysis.

Cell culture and functional assay

EDTA blood activation was possible after a 25-fold blood dilution in RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) containing 10% decompemented fetal veal serum (FVS, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 1mM of a calcium chloride solution (CaCl₂, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) and heparin at a concentration of $1,5 \times 10^{-3}$ mg/mL (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Besides enabling EDTA blood to be activated, the blood dilution step reduced the potential contribution of circulating SARS-CoV-2 antibodies that might have interfered with cell activation. Calcium pre-treatment countered EDTA-calcium chelation that prevents cell polarization and activation. Brefeldin A (5 µg/mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) was added for intracellular staining. Samples were treated with lipopolysaccharide (LPS, 2 mg/mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), SARS-CoV2 recombinant trimeric spike protein (5 mM, Acro Biosystems, Newark, USA), or PBS as a negative control. Samples were incubated at 37 °C in a 5% CO₂ incubator for 5 or 24 hours (only for the infection-related markers study). Cells underwent surface and intracellular staining as previously described using the following panels: leukocyte activation, granulocyte activation, cytokine, and infection-related panels.

Flow cytometry and statistical analysis

Samples were acquired either on a 10-color, 3-laser NAVIOS or a 13-color 3-laser CytoFLEX cytometer, both from Beckman Coulter.

Data treatment was performed with Kaluza Analysis 2.1 software (Beckman Coulter, Brea, USA) and statistical analyses were generated with JMP 14.2.0 (SAS Institute, Cary, USA). Marker mean fluorescence intensities (MFI) or subset percentages were studied. Unsupervised analysis of considered parameters was performed using the response screening platform that yielded most discriminative features based on ANOVA p-values and false discovery rate (FDR) corrected p-values. Principal component analysis (PCA) and hierarchical clustering were also conducted. Box plot representations and nonparametric Wilcoxon Rank Sum tests, equivalent to Mann-Whitney tests, were also performed to compare parameter levels across different subgroups of individuals. Statistical significances were established according to p-values lower than or equal to 0,05 (*). All p-values higher than 0,05 were considered statistically non-significant (ns).

Results

Immunophenotyping

It is known that basal immune characteristics are different between adults and children²⁵. In order to identify the stronger discriminators between the two groups, eight flow cytometry panels (4 to 10 colors) were considered to phenotype 16 children and 16 adults (infection-free). While 129 parameters were considered in total, an unsupervised analysis yielded 22 discriminative features between the two age groups with FDR p-values equal or lower than 0.05 (**fig. 1a**). Besides already described naïve CD4 and CD8 T cell subsets, lymphocyte CD43 expression was ranked as the third best discriminator between cohorts. The 22 identified discriminators were further used for PCA analysis, resulting in an effective separation of children and adults (**fig. 1b**). Together with a higher heterogeneity among adults, we observed that within this group, young adults (ranging from 20 to 30 years old) were located close to the children group. The children's group was better clustered with only the youngest child (three years old) outside the group.

To further investigate whether these parameters were up or downregulated in adults, we leveraged a hierarchical clustering analysis that showed that the adult group was characterized by less abundant naïve (naïve CD8+ T, naïve CD4+ T, IgM+ IgD+ B cells, naïve B cells, CD62L+ T, and NKT cells) and regulatory compartments (Treg) (**fig. 1c**). Accordingly, adults presented larger memory and effector compartments (central memory CD4+ T cells, CD21low CD38low B cells, IgM- IgG- B cells, effector CD8+ T cells, and effector memory CD4+ T cells), more senescent T cells (CD8+ CD57+ T cells and CD4+ CD57+T cells) and exhausted T cells (CD4+ PD1 T cells). CD43 and CD45, which are both involved in lymphocyte activation and regulation were found to be more expressed in adults than in children.

Beyond the lymphoid compartment, some differences, such as higher oxidative burst rates (DHR) and more apoptotic cells (DAPI+) in adults were also observed in the myeloid subsets. A lower CD11b expression on adult basophils was found, together with a higher eosinophil CD294 prostaglandin D2 receptor (CRTH2), both potentially related to the Th2 response. As illustrated in **supplementary fig 1**, it was interesting to find significant correlations between a variety of immune parameters and the age of the individuals.

Table 1: Flow cytometry panels used in the study

	Panel	Commercial/ prototype	Conjugates	Format	Cytometer
Phenotyping	Infection related panel (surface)	Myeloid activation test + CD43	CD169-PE, HLA-DR-APC, CD64-PB, and CD43-AF750	Liquid	NAVIOS
	Granulocyte panel (surface)	DURAClone IM Granulocytes	CD294-FITC, CD16-ECD, CD33-PC5.5, CD11b-PC7, CD274-APC, CD3-CD19-CD56-CD14 APC-AF700, CD62L-APC-AF750, CD15-PB, and CD45-KrO	Dried	NAVIOS
	T cell subset panel (surface)	DURAClone IM T cell subset	CD45RA-FITC, CD197-PE, CD28-ECD, CD279-PC5.5, CD27-PC7, CD4-APC, CD8-AF700, CD3-APC-AF750, CD57-PB, and CD45-KrO	Dried	NAVIOS
	B cell subset panel (surface)	DURAClone IM B cells	IgD-FITC, CD21-PE, CD19-ECD, CD27-PC7, CD24-APC, CD38-APC-AF750, IgM-PB, and CD45-KrO	Dried	NAVIOS
	Dendritic cell panel (surface)	DURAClone IM Dendritic cells	CD16-FITC, CD3-CD14-CD19-CD20-CD56-PE, CD1c-PC5.5, CD11c-PC7, Clec 9A-APC, CD123-APC-AF700, HLA-DR-PB, and CD45-KrO;	Dried	NAVIOS
	Treg panel (intracellular)	DURAClone IM Treg	CD45RA-FITC, CD25-PE, CD39-PC5.5, CD4-PC7, FoxP3-A647, CD3-APC-AF750, Helios-PB, and CD45-KrO.	Dried	NAVIOS
	Phenotyping + functional analysis	Leukocyte activation panel (surface)	Prototype	CD54-FITC, CD11b-PE, CD16-ECD, CD56-PC5.5, CD69-PC7, CD62L-APC, tmTNF-AF700, CD3-CD66b-APC-AF750, CD14-PB, and CD45-KrO	Liquid
Granulocyte activation panel (surface)		Prototype	DHR123-FITC**, MPO-PE, CD62L-ECD, CD11b-PC7, CD294-AF647, CD16-APC-AF700, CD66b-APC-AF750, DAPI-PB, and CD45-KrO	Liquid	CytoFLEX
Cytokine activation panel (intracellular)		Prototype	IL8-A488*, IL6-PE*, CD14-ECD, IL4-PC7, CD3-APC, TNFa-A700, IFN γ -PB, and CD8-CD45-KrO	Liquid	NAVIOS
Infection related panel (surface)		Myeloid activation test + CD43	CD169-PE, HLA-DR-APC, CD64-PB, and CD43-AF750	Liquid	NAVIOS

All the products are from Beckman Coulter except those indicated: *Product from Biolegend (San Diego, USA), **Product from Invitrogen (Waltham, USA).

Cell function

Next, in an effort to capture hypothetical functional differences between the two age groups, whole blood from the same 16 children and 16 adults was activated with a recombinant trimeric SARS-CoV-2 spike protein. Four flow cytometry panels were considered for the functional characterization of the samples. As positive controls, LPS induced TNF α upregulation whereas IFN I induced CD169 expression. Nucleocapsid and non-trimeric spike had no effect and therefore constituted additional negative controls (**supplementary fig 2**). LPS was chosen as a reference of monocyte activation for further analysis since spike protein interacts with TLR4 on monocytes¹⁸. Moreover, it has been shown that SARS-CoV-2 seems to mimic a bacterial infection through the induction of bacterial markers such as CD64²⁹. Like previous results^{14,18}, our model showed a strong monocyte response to trimeric spike activation, as demonstrated by TNF α production and CD169 upregulation. In total, 21 parameters out of the 83 analyzed were found to significantly vary across the three considered conditions (non-stimulated, LPS, or trimeric spike) (**fig. 2a**). These parameters were selected for PCA analysis and not only provided prominent separation between the three conditions tested, but also enabled a substantial separation between the two age groups (**fig. 2b**). On this latter point, the trimeric spike condition yielded the strongest discrimination between the two age groups, as exhibited by a hierarchical clustering experiment (**fig. 2c**).

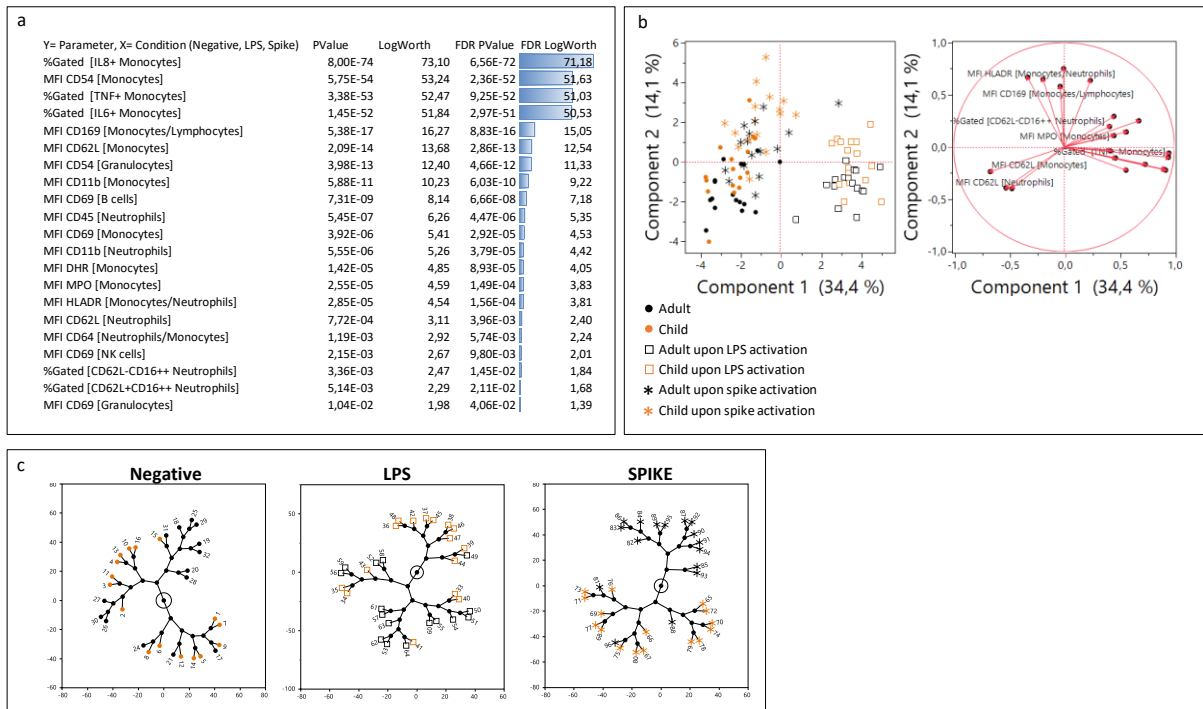


Figure 2: Unsupervised analysis of the biological parameters considered: a) Response screen comparing non-stimulated, LPS and spike conditions showing the most discriminant features. b) PCA analysis of the best discriminators. c) Constellation clustering analysis of the best factors. Orange color represents children and black adults. Squares illustrate LPS condition and asterisks spike condition.

To further elucidate the differences between LPS and trimeric spike activation, two unsupervised analyses were performed comparing LPS and trimeric spike conditions to negative control. As expected, LPS response was characterized by high IL-8, IL-6 and TNF α monocyte production correlated with a high monocyte activation (CD69), oxidative burst (DHR, MPO) and dysregulation of other adhesion molecules (CD62L, CD11b, CD54). Granulocytes were also activated, through direct or indirect signaling, showing dysregulated CD54, CD45, CD11b, CD62L, CD64, CD16, MPO, DHR and DAPI.

The trimeric spike protein induced a monocytic response characterized by TNF α and IL-6 production along with upregulation of CD54, DHR, and MPO and decreased CD62L. However, as suggested already by the eigenvectors of **fig 2b**, the trimeric spike response could be distinguished from the LPS one by strong monocyte CD169 and HLA-DR increases. A much weaker granulocyte activation (all parameters having FDR p-values higher than 0,05) could also be observed. Interestingly, a higher activation of B cell subset (CD69) also characterized the response to trimeric spike protein (**fig.3 and supplementary fig.3**).

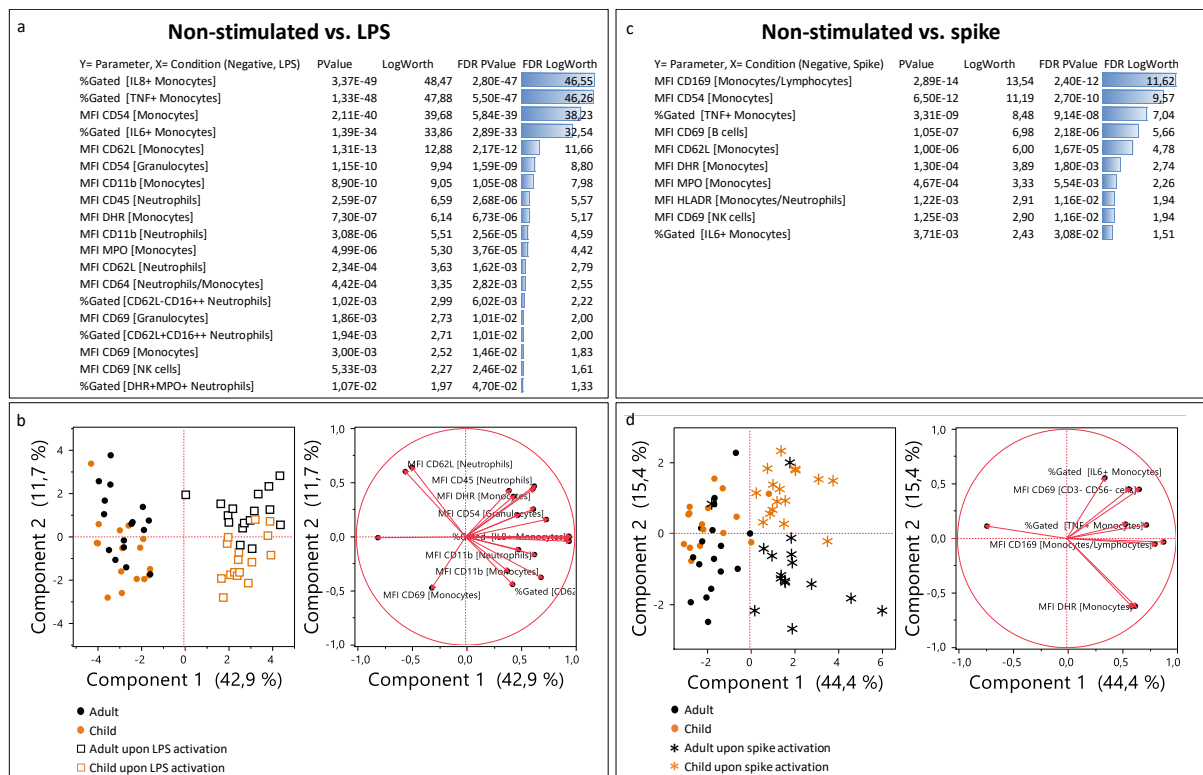


Figure 3: Unsupervised analysis of the biological parameters considered: a) Response screen comparing non-stimulated to LPS conditions (a) and non-stimulated to trimeric spike conditions (c) showing the most discriminant features. b and d) PCA analysis of the best discriminators. Orange color represents children and black adults. Squares illustrate LPS condition and asterisks spike condition.

Since the trimeric spike condition provided a better separation between adults and children (**fig.2 c**), we next focused on the trimeric spike condition to investigate possible functional differences existing between the two age groups. Box plot illustrations showed the 6 parameters responding to the trimeric Spike activation (p-value equal or lower than 0,05) that were significantly different between adults and children: Lower activation of B cells (CD69) was found in adults with lower monocyte response (IL6, CD69, and CD11b) and further increase of DHR and MPO on monocytes (**fig.4**).

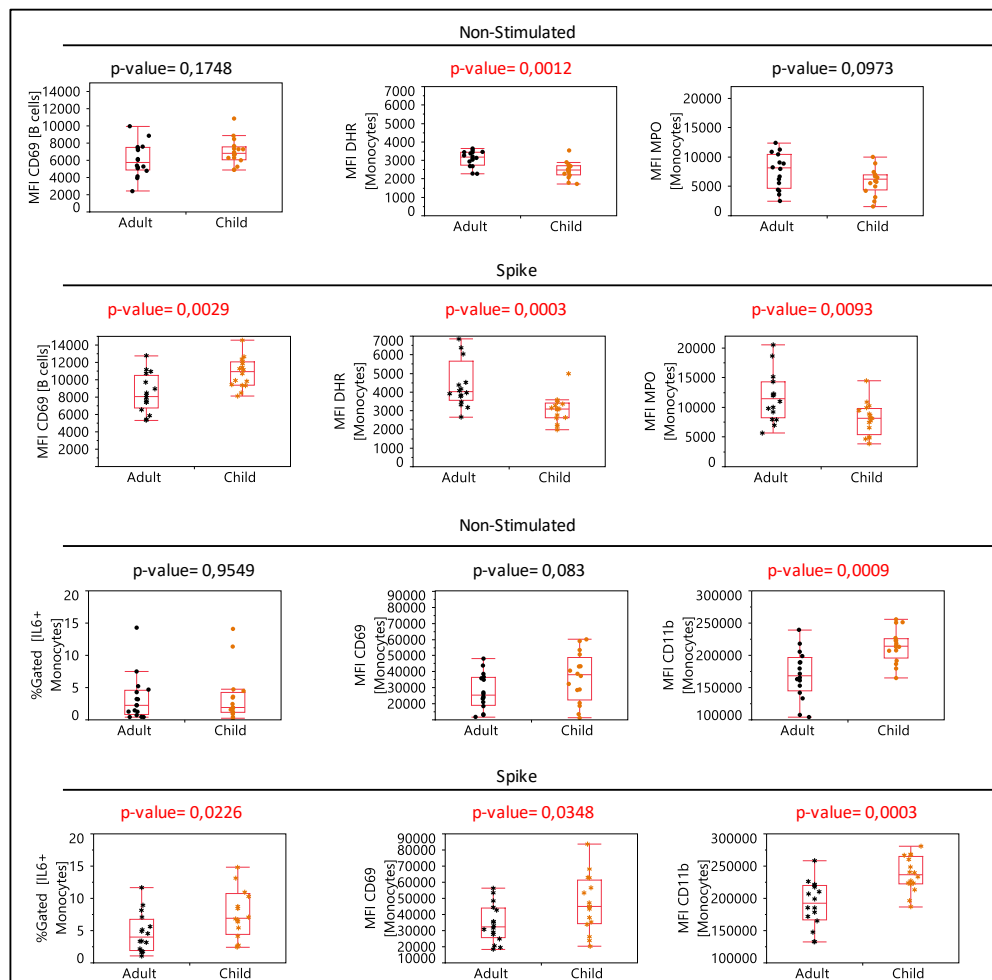


Figure 4: Representative box plots of the 6 parameters that differentially respond to spike stimulation (p-value equal or lower than 0,05) between adults and children. p-value in red color illustrates significant differences between child and adult group.

Discussion

A strong bias linked to age is observed in COVID-19 disease. As the immune system plays a key role in the progression of the disease, we hypothesized that a specific SARS-CoV2 mode of action conjugated with preexisting differences in their immune systems may explain this bias. To study these differences, we performed exhaustive immunophenotyping and functional analysis in two non-infected cohorts of adults and children to identify markers segregating the two groups.

Multiple flow cytometry panels optimized for fresh whole blood investigation combined with easy processing methods enabled an unbiased and robust study of 129 phenotypic markers on all major leukocyte populations.

We confirmed that adults are characterized by a reduced naïve and regulatory lymphoid compartment, a developed effector, memory, senescent, and exhausted lymphocyte set as well as a high oxidative burst rate, in agreement with literature that describes decreased immune function of lymphocytes upon aging³⁰, and the inflamm-aging phenomenon³¹. Our results also corroborated with less widely described features such as an increased CD43 and CD45 expression on lymphocytes with age^{32,33}. Both markers have been shown to be involved in T cell regulation, whose functions are controversial since they may activate or inhibit T cells³⁴⁻³⁶. Notably, we found that CD43 lymphocyte expression was one of the best discriminators. Interestingly, higher CD43 in adults has been associated with lower response efficiency to RSV infection, proposing that monocyte CD169 binding to the highly expressed CD43 reduces RSV-induced IFN- γ release by adult T cells³².

Moreover, lymphocytes from adults expressed less CD62L adhesion molecule suggesting that adults' patrolling capabilities may be less efficient as CD62L is required for cell homing to lymph nodes³⁷. Of note and potentially related to the COVID-19 pathogenicity, CD62L low lymphocytes tend to migrate preferentially to the lungs³⁸. Overall, these results indicate that the adults' immune lymphoid system is less efficient in comparison to children.

A deep myeloid compartment analysis showed higher apoptotic neutrophils with higher oxidative burst rate in adults. We found lower CD11b expression in adult basophils as compared to children, which may further explain the potential of adults to develop an uncontrolled inflammation as CD11b is proposed to play a critical role in limiting unwanted hyperinflammation via phagocytosis and anti-inflammatory cytokine production³⁹. Interestingly, previous report showed that a subset of neutrophils producing H₂O₂ is able to

inhibit T cell responses through the dimer CD11b/CD18 (Mac-1)⁴⁰. These results agree with the exhausted immune system in adults and reinforces its link with the severity of COVID-19. We also observed lower basal eosinophil CRTH2 expression in the children group. As a receptor for PGD₂, we hypothesized that CRTH2 could be perceived as a susceptibility factor for inflammatory events with higher levels correlating with a higher risk for more dramatic events. Previous studies have shown that CRTH2 expression on both basophils and eosinophils was significantly lower in severe forms of COVID-19, suggesting that CRTH2 downregulation may occur during an extreme inflammation event⁴¹. Altogether, these results indicate that adult's immune myeloid system is prone to develop higher inflammation environment compared to children.

Also, not only considering differences between children and adults but also heterogeneity among individuals, some of the markers identified could be predictive of more severe cases. As an example, CD43 is globally higher in adults than children, with children having low or medium CD43 levels and adults having medium or, in 4 out of 16 cases, high CD43 levels. **(supplementary fig.1)** Testing this hypothesis deserves a study on a larger prospective cohort.

We wondered how SARS-CoV-2 virus may interact with these two different preexisting immune systems. It is unclear whether the ACE2 receptor is expressed on leucocytes^{42,43}. However, it has been shown that SARS-CoV2 can induce monocyte/macrophage activation through direct trimeric spike interaction with TLR4 and TLR2. This interaction induces significant IL-1 β and IL-6 production through Myd88 and NF κ B signaling pathways^{17,18}. Other signaling pathways might be triggered upon monocyte activation in accordance with recent studies in which human monocytes from PBMCs were activated with the trimeric spike protein inducing IL6 and IL 10 release, and surprisingly both ISG CD169 (Siglec-1) and HLA-DR¹⁴. Still, these observations were limited to PBMCs, cell lines or mouse models. In our study, we reproduced this monocyte activation using a whole blood model, finding IL6, but also TNF α production. This supports TLR4 and/or TLR2 signaling.

Our data further confirmed CD169 and HLA-DR upregulation upon trimeric Spike activation. CD169 is an ISG that has been recently recognized as very convenient for IFN I monitoring⁵. In addition, CD169 expression induced by IFN I production is an early marker of acute viral infection, and more importantly, of SARS-CoV-2 infection since it is more expressed in

COVID-19 disease than in other respiratory viral infections^{12,44}. It is tempting to speculate that CD169 overexpression in COVID-19 patients may occur as a result of a combined IFN I response and SARS-CoV-2 spike protein contact with monocytes. Interestingly, van den Berg and colleagues showed that CD169 interacts with CD43⁴⁵. We and others have observed a higher lymphocyte CD43 expression in adult than in children³². Despite controversial literature, CD43 engagement can potentially result in an inhibitory effect on lymphocytes⁴⁶. These observations suggest that the high levels of CD43 in adults and CD169 characteristic of SARS-CoV2 infection may trigger a higher lymphocyte inhibition resulting in lower capabilities to fight the virus in adults compared to children. This could be related to the lymphopenia typically observed in COVID-19 patients. We believe that this new theory should be further investigated since the CD169/CD43 interaction might be an interesting therapeutic target. Furthermore, CD169 (sialoadhesin) interaction with SARS-CoV-2 and other viruses such as HIV through their sialylated surface protein is known to mediate trans-infection what could further exacerbates the cell-to-cell viral transmission⁴⁷.

Of note, most hospitalized COVID-19 patients are treated with corticosteroids, which are expected to reduce inflammation and avoid a cytokine storm. Interestingly, CD169 is decreased by corticoid in lupus patients and could play a role in this putative CD43/CD169 lymphocyte inhibition⁴⁸.

Regarding TLR2 and/or TLR4 engagement with the trimeric spike protein, we and others have demonstrated monocyte activation through inflammatory cytokine release (IL-1 β , IL-6 and TNF α)^{17,18}. Interestingly, this interaction requires a trimeric form of the Spike protein suggesting a crosslinking of receptors. In this study we observed modulation of activation markers on monocytes (CD69, CD54, MPO, DHR, and CD62L). Together with the ISG CD169, this observation points to another signaling pathway. It is known that the viral ligand/TLR2 complex is internalized and activates IRF7/3 or IRF2/IRF1/STAT1 to upregulate IFN- β or IFN- α respectively⁴⁹.

It is known that TLR4 mediates anti-bacterial immune responses by recognizing LPS from bacteria playing an important role in the development of sepsis^{50,51}. In this bacterial infection context, it has been shown that CD64 increases on neutrophils in most bacterial infections⁵². Interestingly, this bacterial-related marker is increased upon SARS-CoV2 infection confirming a dysregulated hyperinflammatory immune response²⁹. In our study, we observed a trend towards a higher expression of CD64 in neutrophils upon trimeric Spike activation although

no significant differences were found. Altogether, we hypothesize that the SARS-CoV2 virus may mimic a bacterial infection via TLR4 and further CD64 dysregulation. This would support the uncontrolled and inappropriate immune response characteristic of this condition.

Regarding the difference between adults and children upon trimeric spike activation, we have found a lower monocyte response (IL6, CD69, and CD11b), a higher increase of DHR and MPO on monocytes, and a lower activation of B cells (CD69) in adults. These findings agree with the exhausted and hyper-inflammatory immune system in adults.

To conclude, our data suggest that a direct interaction of the viral spike protein with monocytes/macrophages via toll-like receptors could play a central role in SARS-CoV2 pathogenicity. This interaction may induce and exacerbate different immune and inflammatory responses between children and adults who present pre-existing differences including ineffective and senescent lymphocytes, impaired regulation capabilities, as well as high oxidative and inflammatory granulocytes in adults. This may account for the marked age bias in disease severity, and we propose that some of the markers identified here could be predictive of COVID-19 severe forms.

References

1. Tzotzos, S. J., Fischer, B., Fischer, H. & Zeitlinger, M. Incidence of ARDS and outcomes in hospitalized patients with COVID-19: a global literature survey. *Crit Care* **24**, 516 (2020).
2. Machhi, J. *et al.* The Natural History, Pathobiology, and Clinical Manifestations of SARS-CoV-2 Infections. *J Neuroimmune Pharmacol* 1–28 (2020) doi:10.1007/s11481-020-09944-5.
3. Li, W. *et al.* Receptor and viral determinants of SARS-coronavirus adaptation to human ACE2. *EMBO J* **24**, 1634–1643 (2005).
4. Li, G. *et al.* Coronavirus infections and immune responses. *J Med Virol* **92**, 424–432 (2020).
5. Graf, M. *et al.* *SIGLEC1 enables straightforward assessment of type I interferon activity in inflammatory myopathies.* 2021.09.13.21263325
<https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2021.09.13.21263325v1> (2021)
doi:10.1101/2021.09.13.21263325.
6. Rice, G. I. *et al.* Assessment of Type I Interferon Signaling in Pediatric Inflammatory Disease. *J Clin Immunol* **37**, 123–132 (2017).
7. Bourgoin, P., Biéché, G., Ait Belkacem, I., Morange, P.-E. & Malergue, F. Role of the interferons in CD64 and CD169 expressions in whole blood: Relevance in the balance between viral- or bacterial-oriented immune responses. *Immun Inflamm Dis* **8**, 106–123 (2020).
8. Lei, X. *et al.* Activation and evasion of type I interferon responses by SARS-CoV-2. *Nat Commun* **11**, 3810 (2020).
9. Meffre, E. & Iwasaki, A. Interferon deficiency can lead to severe COVID. *Nature* **587**, 374–376 (2020).
10. Bastard, P. *et al.* Autoantibodies neutralizing type I IFNs are present in ~4% of uninfected individuals over 70 years old and account for ~20% of COVID-19 deaths. *Sci Immunol* **6**, eabl4340 (2021).

11. Bedin, A.-S. *et al.* Monocyte CD169 expression as a biomarker in the early diagnosis of COVID-19. *J Infect Dis* **jiaa724** (2020) doi:10.1093/infdis/jiaa724.
12. Bourgoin, P. *et al.* CD169 and CD64 could help differentiate bacterial from CoVID-19 or other viral infections in the Emergency Department. *Cytometry Part A* **99**, 435–445 (2021).
13. Doehn, J.-M. *et al.* CD169/SIGLEC1 is expressed on circulating monocytes in COVID-19 and expression levels are associated with disease severity. *Infection* **49**, 757–762 (2021).
14. Minutolo, A. *et al.* High CD169 Monocyte/Lymphocyte Ratio Reflects the Immunophenotyping Disruption and Predicts Oxygen Need in COVID-19 Patients. (2021) doi:10.20944/preprints202105.0731.v1.
15. Ortilon, M. *et al.* Monocyte CD169 expression in COVID-19 patients upon intensive care unit admission. *Cytometry Part A* **99**, 466–471 (2021).
16. Roussel, M. *et al.* Comparative immune profiling of acute respiratory distress syndrome patients with or without SARS-CoV-2 infection. *CR Med* **2**, (2021).
17. Zaki, H. & Khan, S. SARS-CoV2 spike protein induces inflammatory molecules through TLR2 in macrophages and monocytes. *The Journal of Immunology* **206**, 62.07-62.07 (2021).
18. Zhao, Y. *et al.* SARS-CoV-2 spike protein interacts with and activates TLR41. *Cell Res* **31**, 818–820 (2021).
19. Kuri-Cervantes, L. *et al.* Comprehensive mapping of immune perturbations associated with severe COVID-19. *Sci Immunol* **5**, eabd7114 (2020).
20. Laing, A. G. *et al.* A dynamic COVID-19 immune signature includes associations with poor prognosis. *Nat Med* **26**, 1623–1635 (2020).
21. Qin, C. *et al.* Dysregulation of Immune Response in Patients With Coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. *Clin Infect Dis* **71**, 762–768 (2020).
22. Lu, X. *et al.* SARS-CoV-2 Infection in Children. *New England Journal of Medicine* **382**, 1663–1665 (2020).

23. Ludvigsson, J. F. Systematic review of COVID-19 in children shows milder cases and a better prognosis than adults. *Acta Paediatrica* **109**, 1088–1095 (2020).
24. Dessie, Z. G. & Zewotir, T. Mortality-related risk factors of COVID-19: a systematic review and meta-analysis of 42 studies and 423,117 patients. *BMC Infect Dis* **21**, 855 (2021).
25. Cunha, L. L., Perazzio, S. F., Azzi, J., Cravedi, P. & Riella, L. V. Remodeling of the Immune Response With Aging: Immunosenescence and Its Potential Impact on COVID-19 Immune Response. *Front Immunol* **11**, 1748 (2020).
26. Pence, B. D. Severe COVID-19 and aging: are monocytes the key? *Geroscience* **42**, 1051–1061 (2020).
27. Merad, M. & Martin, J. C. Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages. *Nat Rev Immunol* **20**, 355–362 (2020).
28. Ait Belkacem, I., Bourgoin, P., Busnel, J. M., Galland, F. & Malergue, F. One-step White Blood Cell Extracellular Staining Method for Flow Cytometry. *Bio-protocol* **11**, e4135–e4135 (2021).
29. Karawajczyk, M. *et al.* High expression of neutrophil and monocyte CD64 with simultaneous lack of upregulation of adhesion receptors CD11b, CD162, CD15, CD65 on neutrophils in severe COVID-19. *Ther Adv Infect Dis* **8**, 20499361211034064 (2021).
30. Weiskopf, D., Weinberger, B. & Grubeck-Loebenstien, B. The aging of the immune system. *Transplant International* **22**, 1041–1050 (2009).
31. Fulop, T. *et al.* Immunosenescence and Inflamm-Aging As Two Sides of the Same Coin: Friends or Foes? *Front Immunol* **8**, 1960 (2017).
32. Jans, J. *et al.* Siglec-1 inhibits RSV-induced interferon gamma production by adult T cells in contrast to newborn T cells. *European Journal of Immunology* **48**, 621–631 (2018).
33. Yalcin, A. D., Gorczynski, R. M., Kahraman, M. S., Demirel, M. U. & Terzioglu, E. CD40, CD45 CTLA-4 levels are elevated in healthy older adults. *Clin Lab* **58**, 449–456 (2012).

34. Courtney, A. H. *et al.* CD45 functions as a signaling gatekeeper in T cells. *Science Signaling* **12**, eaaw8151 (2019).
35. Manjunath, N., Correa, M., Ardman, M. & Ardman, B. Negative regulation of T-cell adhesion and activation by CD43. *Nature* **377**, 535–538 (1995).
36. Rosenstein, Y., Santana, A. & Pedraza-Alva, G. CD43, a molecule with multiple functions. *Immunol Res* **20**, 89–99 (1999).
37. Klinger, A. *et al.* Cyclical expression of L-selectin (CD62L) by recirculating T cells. *International Immunology* **21**, 443–455 (2009).
38. Bingaman, A. W. *et al.* Novel phenotypes and migratory properties distinguish memory CD4 T cell subsets in lymphoid and lung tissue. *Eur J Immunol* **35**, 3173–3186 (2005).
39. Khan, S. Q., Khan, I. & Gupta, V. CD11b Activity Modulates Pathogenesis of Lupus Nephritis. *Frontiers in Medicine* **5**, 52 (2018).
40. Pillay, J. *et al.* A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *J. Clin. Invest.* **122**, 327–336 (2012).
41. Vitte, J. *et al.* A Granulocytic Signature Identifies COVID-19 and Its Severity. *J Infect Dis* **222**, 1985–1996 (2020).
42. Beyerstedt, S., Casaro, E. B. & Rangel, É. B. COVID-19: angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) expression and tissue susceptibility to SARS-CoV-2 infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1–15 (2021) doi:10.1007/s10096-020-04138-6.
43. Trojanowicz, B. *et al.* Monocytic angiotensin-converting enzyme 2 relates to atherosclerosis in patients with chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* **32**, 287–298 (2017).
44. Bedin, A.-S. *et al.* Monocyte CD169 Expression as a Biomarker in the Early Diagnosis of Coronavirus Disease 2019. *The Journal of Infectious Diseases* (2020) doi:10.1093/infdis/jiaa724.
45. van den Berg, T. K. *et al.* Cutting edge: CD43 functions as a T cell counterreceptor for the macrophage adhesion receptor sialoadhesin (Siglec-1). *J Immunol* **166**, 3637–3640 (2001).

46. Tong, J. *et al.* CD43 Regulation of T Cell Activation Is Not through Steric Inhibition of T Cell–APC Interactions but through an Intracellular Mechanism. *J Exp Med* **199**, 1277–1283 (2004).
47. Perez-Zsolt, D. *et al.* SARS-CoV-2 interaction with Siglec-1 mediates trans-infection by dendritic cells. *Cell Mol Immunol* **18**, 2676–2678 (2021).
48. Stuckrad, S. L. von *et al.* SIGLEC1 (CD169) is a sensitive biomarker for the deterioration of the clinical course in childhood systemic lupus erythematosus. *Lupus* **29**, 1914–1925 (2020).
49. de Oliveira Nascimento, L., Massari, P. & Wetzler, L. The Role of TLR2 in Infection and Immunity. *Frontiers in Immunology* **3**, 79 (2012).
50. Kuzmich, N. N. *et al.* TLR4 Signaling Pathway Modulators as Potential Therapeutics in Inflammation and Sepsis. *Vaccines (Basel)* **5**, 34 (2017).
51. Poltorak, A. *et al.* Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* **282**, 2085–2088 (1998).
52. Cid, J., Aguinaco, R., Sánchez, R., García-Pardo, G. & Llorente, A. Neutrophil CD64 expression as marker of bacterial infection: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Infection* **60**, 313–319 (2010).

Acknowledgments

I.A.B. is recipient of Convention Industrielle de Formation par la Recherche (CIFRE) Ph.D. grant (No. 2018/1212) from the ANRT (National Agency for Research and Technology). C.C.G. is supported by the European Union's Horizon 2020 Research and Innovation Program under Marie Skłodowska-Curie Grant Agreement 812890, ArthritisHeal.

Author Contributions

F.M., J.M.B., I.A.B., and C.C.G. designed the study. M.L., I.A., and P.E.M., provided blood samples. I.A.B., C.C.G., E.W., and N.I. performed the experiments. I.A.B., C.C.G., F.M., and J.M.B. performed data analysis. I.A.B., C.C.G., F.M., and J.M.B. wrote the manuscript. F.G., N.L., M.L., I.A., and P.E.M made critical revision of the manuscript.

Data availability statement

The authors confirm that the data supporting the findings of this study are available within the article and its supplementary materials.

Competing interests

I.A.B., C.C.G., E.W., N.I., F.M., and J.M.B. are Beckman Coulter Life Sciences employees. All other authors declare no conflict of interest.

Dans cette étude, l'analyse non supervisée de 129 marqueurs a permis d'abord de valider la cohorte étudiée et de confirmer que les systèmes **immunitaires lymphoïdes et myéloïdes sont moins efficaces** et plus enclins à développer une forte **inflammation** chez les **adultes** que chez les enfants. Ces caractéristiques immunitaires basales permettaient déjà de distinguer les adultes des enfants, et nous avons notamment identifié l'expression du **CD43 sur les lymphocytes comme le marqueur le plus discriminant**. Nous avons été surpris de découvrir que ce CD43 lymphocytaire est décrit comme un **ligand potentiel du CD169**, et qu'il aurait un rôle inhibiteur sur les lymphocytes. De manière frappante, la protéine spike a stimulé les monocytes pour qu'ils régulent à la hausse les cytokines inflammatoires, les marqueurs inflammatoires, et en particulier **CD169**. De plus, la **protéine spike a induit des réponses différentes entre les adultes et les enfants**, notamment des **réponses monocytaires (IL6, CD69 et CD11b) et lymphocytaire B (CD69) plus faibles** ainsi qu'une **augmentation plus importante des marqueurs inflammatoires (DHR et MPO) chez les adultes**. La protéine Spike pourrait donc exacerber la faible réactivité immunitaire préexistante chez les adultes ainsi que le potentiel inflammatoire plus élevé. Dans l'ensemble, certains des marqueurs identifiés ici peuvent expliquer le biais d'âge marqué et pourraient être prédictifs de la gravité de la maladie.

5. DISCUSSION

1. Caractéristiques de la procédure rapide

La thèse avait pour axe principal la recherche d'un test de cytométrie en flux répondant aux différentes contraintes identifiées lors de la prise en charge des patients présentant des signes d'infections. Même si la cytométrie en flux présente le puissant avantage de pouvoir analyser rapidement et précisément de nombreux paramètres simultanément sur des cellules individuelles dans un mélange complexe, l'utilisation de la méthode est restreinte à la recherche clinique et n'est pas encore en mesure d'être adoptée de manière routinière. En effet, les méthodes actuelles de prélèvement, de préparation et de préservation des échantillons sanguins ne sont pas adaptées à la prise en charge des patients au urgences de l'hôpital et encore moins dans les zones reculées. Des chercheurs ont tenté de simplifier la méthode de préparation des échantillons dans une seule étape en proposant de supprimer l'étape de lyse mais cela nécessitait un cytomètre en flux dédié ²⁴¹. De récents travaux de notre équipe ont permis de développer une nouvelle procédure rapide de préparation des échantillons en une étape réduisant de moitié le temps minimum jusque-là nécessaire (25-30 minutes), tout en conservant l'étape importante de la lyse, offrant ainsi un protocole de marquage extracellulaire plus rapide (10 – 15 minutes) pour la cytométrie en flux et applicable sur n'importe quel instrument ²³¹. Cette nouvelle configuration semble ainsi répondre aux besoins précédemment identifiés et ses caractéristiques sont comparables aux tests de détection de la CRP et de la PCT, largement utilisés en routine (table 7).

Table 7 : Comparaison des caractéristiques de la procédure rapide de la thèse avec les caractéristiques de deux POCT de référence (la PCT et la CRP), et les critères acceptables et idéales établies par le groupe de travail de l'OMS ⁴⁶.

	Temps total pour l'obtention du résultat	Temps de réalisation du test	Formation du personnel	Prix par test	Référence
Acceptable	< 2 heures	< 5 minutes	< 2 jours	5 USD	Consensus ⁴⁶
Idéal	< 10 minutes	< 1 minute	< 0,5 jours	< 1 USD	
PCT	30 minutes	< 1 minute	< 0,5 jours	20 USD	BRAHMS, ThermoFischer Scientific ²⁴²
CRP	< 10 minutes	< 1 minute	< 0,5 jours	4-8 USD	Alere Afinion, Abbott ²⁴³
Thèse	10 minutes	< 1 minute	< 0,5 jours	< 5 USD	Thèse ²³¹ (Bioprotocol)

La procédure présentée est simple et accessible, associant l'utilisation de réactifs prêts à l'emploi et stables à température ambiante, ainsi que des panels d'anticorps dont l'analyse est simple (pas de compensations) et robuste (ratios de fluorescence).

Concernant le prix du test, il s'élève actuellement à moins de 5\$ pour l'ensemble des réactifs nécessaires incluant la solution de lyse (1,5€) et le cocktail d'anticorps (2€). Ce dernier est actuellement disponible sous format liquide et pour une utilisation en recherche uniquement (RUO : « research use only »). Il est important de noter que la préparation des tubes de

conjugués secs nécessite des étapes supplémentaires plus coûteuses, mais que les deux formulations (liquide ou sèche) peuvent profiter de très fortes économies si le test devait se généraliser et être appliqué à grande échelle. Enfin, même si la solution sèche est souvent idéale, la solution liquide reste très bien adaptée à une utilisation en laboratoire central, où elle peut être distribuée dans les tubes tests par des automates. Pour une situation de test à domicile, il est également possible de mettre à disposition un kit (tube + bouchon + lancette) avec la lyse et les conjugués (secs) dissociés ou alors déjà mélangés (liquides). Cette dernière option demande de vérifier la stabilité de la solution lyse mélangées aux conjugués, mais permettrait d'encore diminuer le prix du test (moins d'emballage) et de simplifier l'utilisation.

Un dernier effort reste à fournir pour proposer un **cytomètre compact, léger, bon marché et muni d'un logiciel d'analyse entièrement automatisé**. Pour répondre à ce besoin, deux cytomètres de Beckman Coulter semblent intéressants, l'Aquios qui intègre un logiciel d'analyse permettant de rendre un résultat de manière automatique, et le Cytoflex qui est quant à lui compact (42.5 cm x 42.5 cm x 34 cm pour 23.4 kg) et économique (30-50k €). La combinaison des deux machines en un seul cytomètre, tout en réduisant le nombre de détecteurs et d'options afin de minimiser le cout final et de réduire la taille, peut être facilement envisagée. Des telles machines existent déjà plus ou moins sur le marché comme l'Accellix de LeukoDx (prix non communiqué) qui est petit et presse-bouton, et permet par exemple le compte des lymphocytes CD4+ pour le suivi du VIH ou la mesure du CD64 sur les neutrophiles pour le suivi du sepsis. Cependant toutes les machines disponibles présentent encore certaines limitations (temps de réaction, nombre de tests à l'heure, coût des réactifs, nombre de lasers/paramètres, sensibilité...etc.).

En conclusion, il nous semble que les solutions techniques existent pour concevoir le cytomètre idéal pour des applications de triage rapide en routine et à grande échelle. En le combinant avec un panel d'anticorps optimisé pour la méthode en une étape, il est possible de réaliser un test à la minute (donc environ >1000/jour et /cytomètre), avec une réponse en 10 minutes, pour seulement quelques euros. Cette configuration peut être adaptée à la fois à des tests en ambulatoire (avec prélèvement au doigt), ou en laboratoire central (sur prélèvement veineux standard). On peut aussi imaginer que les prélèvements au doigt (mis à marquer immédiatement) peuvent être envoyés au laboratoire pour **analyse délocalisée**. En effet, nous avons vérifié que grâce à l'ajout d'une petite dose de fixateur (formaldéhyde 0,025 à 0,05%) les tubes marqués sont stables 1 à 3 jours, et autorisent donc même un transport par courrier ou coursier, ce qui pourrait faire suite par exemple à un auto-prélèvement, bien utile en période de confinement (figure 34).

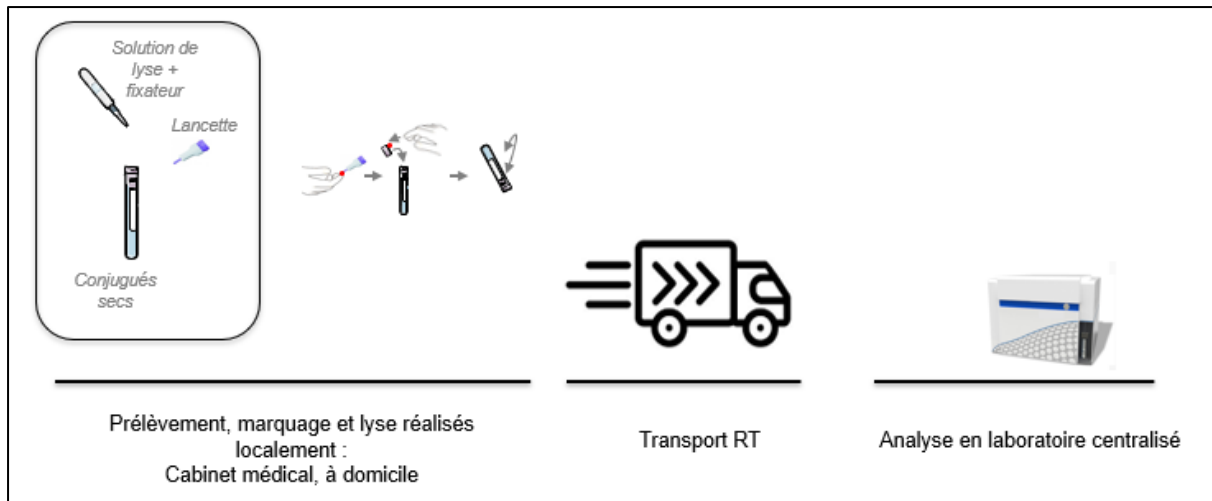


Figure 34 : Etapes permettant l'utilisation de la procédure pour une analyse délocalisée. Le prélèvement au doigt suivi du marquage peut se faire localement puis l'échantillon est transporté à température ambiante jusqu'au laboratoire central pour analyse.

2. Utilité de la préservation du sang dans les études multicentriques et les zones reculées

Le phénotypage immunitaire est un pilier majeur de la recherche biomédicale et la santé. Cependant, en raison de la dégradation cellulaire au cours du temps, l'analyse du sang soit se faire rapidement. Cela peut s'avérer difficile lorsque l'accès aux instruments de cytométrie en flux est limité. Ainsi, nous avons soulevé la possibilité de préserver et transporter l'échantillon de sang du site de prélèvement au laboratoire d'analyse. Pour cela, deux méthodes de préservation du sang total, par congélation ou séchage, ont été développés (figure 35).

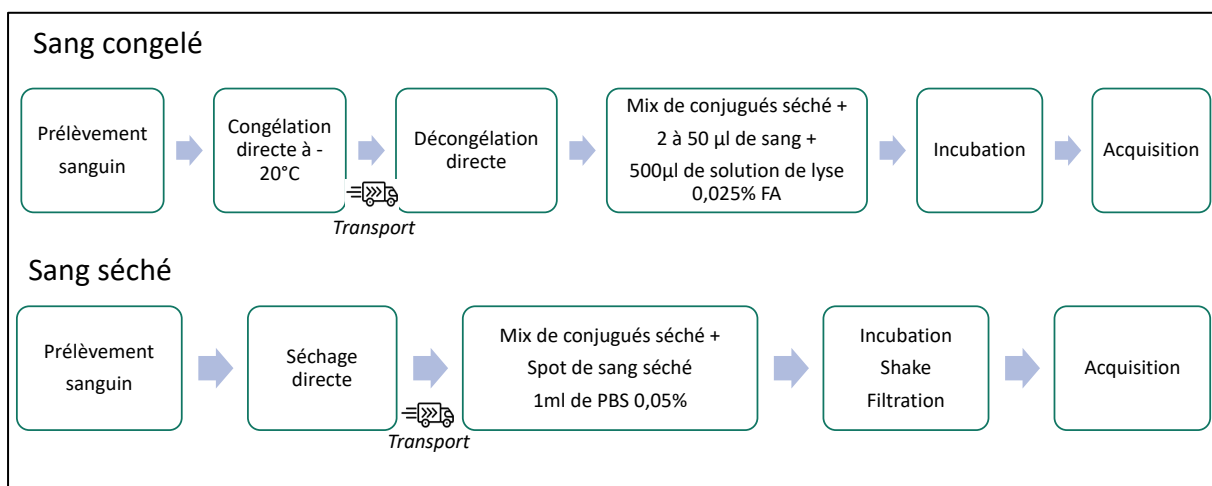


Figure 35 : Etapes permettant la préservation du sang total pour une préparation et analyse délocalisées. Le prélèvement sanguin est préservé par congélation directe à -20°C ou séchage direct à température ambiante. L'échantillon est transporté vers un laboratoire central pour être marqué et analysé.

La méthode de congélation directe sans DMSO

Une première méthode a porté sur la congélation directe du sang total, sans adjuvants, combinée à la procédure de marquage rapide. Nous avons montré que le DMSO n'était pas requis pour des applications d'immunophénotypage simples, ne nécessitant pas d'activation ou de prolifération cellulaire. Même si les cellules sanguines sont en grande partie perméabilisées en absence de DMSO, les proportions cellulaires et les niveaux d'expression des biomarqueurs dans les échantillons congelés sont proches de ceux des échantillons frais ce qui corrèle avec la littérature ayant montré que le sang congelé était comparable au sang frais pour l'énumération des principaux types de cellules leucocytaires²⁴⁴. Ces observations ont également été étendues à des sous-ensembles de monocytes, de cellules T et de cellules NK²⁴⁵. Il a même été suggéré que le sang périphérique congelé soit davantage pris en considération pour les études dans lesquelles la quantification de sous-ensembles leucocytaires est nécessaire.

La méthode de séchage direct

La seconde méthode a porté sur le séchage du sang total sur un support solide, combinée à la procédure de marquage rapide. 50% à 70% des cellules séchées ont pu être récupérées, ce qui est équivalent ou même supérieur au rendement obtenu lors de la préparation des PBMC, avec l'avantage supplémentaire de préserver les granulocytes²⁴⁶. Quelques microlitres de sang suffisent pour l'analyse et peuvent être conservés pendant au moins un mois à température ambiante. Cette taille d'échantillon permet la récupération de milliers de cellules ce qui convient à de nombreuses applications. Les cellules récupérées peuvent être analysées avec différentes sondes et anticorps pour détecter facilement les marqueurs de surface ou intracellulaires. Le tri des cellules et la quantification ultérieure de l'ARNm sur les cellules collectées sont aussi possibles.

– L'étape d'élution

L'élution des leucocytes n'a pas été possible lorsque le sang avait été séché sur un support solide en cellulose, en revanche cela a été possible en utilisant un support solide en polyester. Cela pourrait être dû aux propriétés structurales de chaque support solide. La cellulose est un réseau de fibres fines à mailles serrées qui forment des pores d'environ 0,2 à 1,2 µm de diamètre, ce qui peut ne pas permettre le maintien des leucocytes (5-20 µm), tandis que le support solide en polyester est constitué de fibres plus épaisses formant des pores d'environ 0,5-50 µm de diamètre. De plus, la plus grande surface de contact de la cellulose peut entraîner une adhésion cellulaire plus importante et plus serrée des cellules. En outre, le traitement au gaz plasma du support solide en polyester par le fabricant est décrit comme améliorant la bio-interaction avec les leucocytes. Aussi, le prétraitement du support solide à l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA), à la poly-l-lysine ou aux inhibiteurs de protéase a légèrement amélioré l'élution des leucocytes. Une forte agitation manuelle des tubes a également permis une meilleure élution des leucocytes par rapport à un vortex. Cela pourrait être dû au fait que le mouvement latéral provoque la séparation des feuillettes du support solide libérant ainsi les cellules. Cette étape pourrait être facilement automatisée à l'avenir afin de faciliter le processus. Lors du séchage, les globules rouges ont été lysés et les leucocytes récupérés ont tous été perméabilisés. Ceci permet un marquage intracellulaire facile sans la nécessité d'une étape de perméabilisation préalable. Les leucocytes récupérés avaient une structure altérée (taille et granularité réduites des cellules), mais l'ajout d'une faible concentration de fixateur (0,05% de formaldéhyde) dans la solution d'élution a amélioré leur intégrité structurale sans altérer le marquage des antigènes.

– L'étape de séchage et de stockage

Le séchage et le stockage du sang ont été réalisés à des niveaux de température et d'humidité ambiants. Bien sûr, ces conditions peuvent varier mais elles peuvent être facilement contrôlées. Le stockage du DBS à une température plus élevée (37°) a légèrement altéré la structure cellulaire mais a permis une récupération des leucocytes et des fréquences de sous-population similaires. Les DBS sont généralement stockés à température ambiante et toutes nos expériences ont fonctionné à cette température. Néanmoins, certains analytes ont été décrits comme sensibles à la température (par exemple, l'ARN du virus de l'immunodéficience humaine et la CRP). Dans ces cas, la stabilité peut être améliorée en stockant l'échantillon à des températures plus basses)²⁴⁷⁻²⁵⁰. Par ailleurs, l'humidité peut affecter la qualité des échantillons en provoquant une croissance bactérienne, en dégradant les molécules d'intérêt²²⁸. Un séchage complet est donc préférable et peut et peut être facilement réalisé n'importe où avec un dessiccant ajouté à un emballage imperméable²²⁶.

Le stockage des DBS nécessite peu d'espace et ne requiert pas de basses températures. Un intérêt supplémentaire, et non des moindres, est que les DBS sont considérés comme des matériaux non réglementés et peuvent donc être facilement transportés par courrier simple²⁵¹. C'est une méthode de prélèvement non invasive qui donne accès à des tests spécialisés aux personnes isolées, aux patients des régions éloignées ou même à la population générale nécessitant un certain type de dépistage. Les cellules récupérées en laboratoire peuvent être interrogées pour leur contenu en protéines et en acides nucléiques pour une variété d'applications comprenant les troubles immunologiques, les hémopathies malignes et les maladies infectieuses. En utilisant la cytométrie en flux, nous avons évalué les marqueurs de surface communs permettant un immunophénotypage de base, des marqueurs intracellulaires (CD79a et MPO) utiles dans la classification de certaines pathologies hématologiques, ainsi que le FOXP-3, le marqueur intranucléaire des lymphocytes T régulateurs, utilisé dans la détection du syndrome d'immunodérégulation, de polyendocrinopathie et d'entéropathie lié au chromosome X (IPEX).

En perspective, nous pourrions envisager cette méthode dans un contexte de pandémie active ou d'une quarantaine puisqu'elle permettrait l'auto-prélèvement/le prélèvement à domicile et l'envoi aux laboratoires centraux. En accord avec cette possibilité, nous avons constaté la possibilité d'analyser des leucocytes d'un échantillon de sang prélevé à partir d'une lancette et directement déposé sur le support solide. Néanmoins, une évaluation formelle des conditions d'expédition sur la qualité du DBS devrait être réalisée, en évaluant les effets du transport depuis des régions tropicales ou gelées par exemple, avec de fortes variations de températures et d'humidité.

La préservation des proportions leucocytaires

Les deux méthodes de préservation n'ont présenté aucun biais majeur lors de la mesure des fréquences des populations leucocytaires. Néanmoins, une légère diminution de lymphocytes, associée à un pourcentage légèrement plus élevé de neutrophiles, a été observé et pourrait s'expliquer par une plus grande fragilité des lymphocytes ou par une plus grande quantité de débris contaminant le groupe des neutrophiles. Si une quantification précise de ces pourcentages cellulaires est nécessaire pour des études futures, il pourrait être utile d'ajouter un marquage CD45 afin de mieux éliminer les débris. Un marqueur de viabilité tel que le 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) ou le propidium iodide (PI) pourrait être utile lors de l'élution de cellules préservées par séchage car toutes les cellules sont perméabilisées de manière homogène. Il existe un grand nombre de marqueurs de viabilité, utilisables très

facilement dans presque toutes les couleurs d'un cytomètre : DRAQ5, DRAQ7, Hoechst, 7 - aminoactinomycin D (7-AAD) ...etc. Inversement, les cellules congelées n'étant pas toutes perméabilisées, l'utilisation d'un tel marqueur introduirait un biais dans les proportions de cellules.

La préservation du marquage leucocytaire

Même si tous les marqueurs testés ont bien été détectés, les deux méthodes de préservation ont montré une augmentation du bruit de fond, réduisant ainsi le rapport signal/bruit. Cette augmentation pourrait être due au fait que les anticorps fluorescents ont accès au stock de biomarqueurs intracellulaires, augmentant ainsi la quantité totale mesurée par cellule. L'accès à l'espace intracellulaire est également accompagnée d'une augmentation du marquage non-spécifique. Il est également possible que les processus de séchage, congélation ou stockage augmentent la production de composés auto-fluorescents. Certains composés comme l'héparine peuvent aider à réduire la liaison non spécifique, en particulier dans les éosinophiles²⁵². Par ailleurs, la conservation des spots de sang séchés en présence de dessiccant ou l'utilisation de détergent dans le tampon de resuspension peut aider à minimiser l'autofluorescence. Néanmoins, les deux méthodes de préservation du sang ont montré que les niveaux d'expression de plusieurs marqueurs, dont le mCD169, pouvaient être évalués dans les deux types d'échantillons préservé (congelés ou séchés). Le biais dû à l'augmentation du bruit de fond peut être rectifié par un facteur correctif afin de redéfinir les seuils de décision pour chaque marqueur. La mesure du signal/ bruit au lieu du signal seul peut également minimiser l'effet de l'augmentation du bruit de fond.

Dans l'ensemble, ces premières études permettent de récupérer la plupart des leucocytes tout en préservant leurs proportions et leurs biomarqueurs. Il ne peut être exclu que certaines conditions médicales puissent avoir un impact sur l'intégrité et la récupération des cellules. Même si certains patients infectés ont été inclus, l'adéquation de ces méthodes nécessitera une validation plus large pour les patients de chaque application envisagée. Enfin, ces démonstrations ont été faite sur des sous-ensembles leucocytaires communs et sur quelques biomarqueurs ; d'autres marqueurs devraient être évalués afin de souligner la valeur globale du concept pour différentes applications. Enfin, il est probable que d'autres types d'échantillons, tels que les lignées cellulaires et les échantillons de moelle osseuse, puissent aussi se prêter à ces techniques.

3. Utilité de la procédure rapide dans le triage des patients

Les évaluations de la méthode dans des environnements infectieux divers ont montré des performances élevées dans le triage des patients présentant des signes d'infections, meilleures que celles de la CRP et la PCT (table 8).

Table 8 : Comparaison des performances de la procédure rapide de la thèse avec les performances de deux POCT de référence (la PCT et la CRP), et les critères acceptables et idéales établies par le groupe de travail de l'OMS ⁴⁶.

		Sensibilité :	Spécificité :	Cohortes étudiées :	Référence
Consensus	Acceptable	> 90%	> 80%		
	Idéal	> 95%	> 90%		
Niveaux PCT		38%-97%	31%-100%	Variables	147
Niveaux CRP		62%-100%	26%-100%	Variables	
Travaux précédents	nCD64 mCD169	88% (bactérien) 86% (viral)	90% (bactérien) 100% (viral)	138 patients fébriles se présentant aux urgences (91 non-infectés, 40 bactériens, 7 viraux) versus donneurs sains - Seuil de décision déterminé par l'étude	209
	nCD64 mCD169	82% (bactérien)	91% (bactérien)	50 patients fébriles se présentant aux urgences (7 non-infectés, 39 bactériens, 4 viraux) versus donneurs sains - Seuil de décision déterminé par l'étude	208
Thèse	nCD64 mCD169	90% (bactérien) 80% (viral)	78% (bactérien) 91% (viral)	85 patients fébriles se présentant aux urgences lors de la période hivernale (7 non-infectés, 38 bactériens, 11 viraux, 29 coinfectés) versus donneurs sains - Seuil de décision déterminé par l'étude	234 (Cytometry part A)
	mCD169	95%	100%	76 patients présentant une RT-PCR positive au SARS-CoV-2 versus donneurs sains - Seuil de décision déterminé par l'étude	
	mCD169	98% (symptomatiques <14j) 100% (asymptomatique)	50% (symptomatiques <14j) 84% (asymptomatique)	177 patients ayant présenté au moins un test PCR positif au SARS-CoV-2 dans les jours précédents l'inclusion : o 80 patients symptomatiques depuis <14j, o 71 patients symptomatiques depuis >14j, o 26 patients asymptomatiques - Seuil de décision fixé à 3,5	En soumission dans SAGE médecine
	mCD169	97%	92%	68 patients hospitalisés présentant une RT-PCR positive au SARS-CoV-2 versus donneurs sains - Seuil de décision fixé à 3,01	236 (Pathogens)
	mCD169	73%	100%	30 patients hospitalisés pour une infection au SARS-CoV-2 versus donneurs sains - Seuil de décision fixé à 3,03	En soumission dans Critical care médecine

Ces évaluations dans leur ensemble présentent plusieurs points forts mais aussi certains axes à approfondir :

Les performances cliniques

Les performances de nos marqueurs sont calculées en utilisant le **diagnostic final établi par le médecin comme référence**. Cependant, dans la majorité des cas, ce diagnostic est établi sur base d'évaluation clinique uniquement sans qu'aucun test de validation biologique n'ait confirmé la présence et le type de pathogène. Ainsi, il est difficile d'évaluer les réelles performances de nos marqueurs, et celles-ci sont souvent sous-estimées.

Par ailleurs, certains **tests de référence** utilisés tels que la PCR sont eux aussi discutables. Par exemple, sur la seconde cohorte de l'étude publiée dans « Cytometry part A »²³⁴, la sensibilité du CD169 était de 95%. Parmi les quatre patients CD169 négatifs mais positifs à RT-PCR détectant le SARS-CoV-2, deux étaient symptomatiques depuis plus de 10 jours et présentaient un résultat RT-PCR très faible (seuils de cycle à 30 et 32), compatible avec la disparition de la maladie, et la présence de reliquats de matériel génétique du SARS-CoV-2. Les deux autres patients sont potentiellement des faux-positifs car ils se sont présentés aux urgences pour des raisons autres que des symptômes infectieux, ils étaient asymptomatiques pour la COVID-19 et avaient un résultat RT-PCR encore plus faible (seuils de cycle à 32 et 34). Également, dans l'étude en soumission dans « SAGE medicine », la cohorte de patients symptomatiques précoces présentait une bonne sensibilité du CD169 (98%), mais une spécificité de seulement 50%. Cela illustre et est en accord avec les faux-négatifs de la RT-PCR qui sont fréquents (10 à 30 %) et principalement dû à un mauvais prélèvement²⁵³.

En outre, dans l'étude publiée dans « pathogens »²³⁶, la spécificité était de 97%. Parmi les 12 patients CD169 négatifs, 4 avaient présenté une RT-PCR négative le jour de l'évaluation du CD169 et 10 avaient été hospitalisés depuis plus de 5 jours. Dans l'étude en soumission dans « SAGE medicine », tous les patients présentant des symptômes depuis plus de 14 jours étaient négatifs au CD169 et la plupart à la RT-PCT. Dans l'étude en soumission dans « Critical care medicine », une sensibilité de 73% a été mesurée. Parmi les 8 patients présentant un CD169 négatif, 5 présentaient des symptômes depuis plus de 7 jours. Ces exemples témoignent de l'importance de mesurer précocement le CD169.

Les performances analytiques

D'un point de vue technique, l'utilisation du rapport Signal/ Bruit permet la **standardisation** facile de la méthode et la comparaison des résultats obtenus sur des cytomètres distincts et avec des réglages différents (résultats non montés sur 5 cytomètres, de 2 modèles différents, avec 2 réglages chacun, et 2 opérateurs). Ainsi, un seul seuil pourra être défini pour tous les laboratoires facilitant l'analyse et la lecture des résultats, néanmoins ce seuil reste à préciser avec d'avantages d'études. Par ailleurs, l'évaluation des performances du test ayant été effectuée dans des conditions de recherche (sang veineux, anticorps liquides ou secs, et cytomètre de paillasse), une évaluation du test dans des **situations de dépistage réelles** (sang capillaire, anticorps secs, cytomètre et analyse automatisés) sera nécessaire pour évaluer pleinement les capacités et les limites éventuelles de ce test. Néanmoins, les expériences préliminaires n'ont démontré aucun impact de ces conditions sur les résultats finaux.

Les interférences potentielles

Etant donnée la complexité du système immunitaire, l'expression des biomarqueurs sélectionnés peut être perturbée par des **inflammations non infectieuses** (maladies autoimmunes, néoplasies, ou autres maladies chroniques) ou des **traitements interférant** (chimiothérapie, antibiothérapie ou autre traitement immunostimulateur ou immunosuppresseur). Par exemple, l'expression de CD169 est reconnue comme un biomarqueur du lupus érythémateux systémique et de la sclérose en plaques, dans laquelle les cellules CD169 favorisent la neuro-inflammation^{254,255}. Dans ces maladies, les niveaux les plus élevés d'expression de CD169 ont été observés chez les patients ne recevant pas de médicaments, tels que les glucocorticoïdes ou l'hydroxychloroquine, qui diminuent la production d'IFN par l'inhibition des récepteurs Toll-like dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes²⁵⁴. Néanmoins, la plupart de ces maladies chroniques sont connues du patient et ne devraient donc pas induire une fausse interprétation du résultat du test. Aussi, nos résultats ont montré une baisse du CD169 chez les patients traités, mais pas une extinction, ce qui ne devrait donc pas affecter le triage des patients qui est qualitatif (positif ou négatif). Tout au plus, ces traitements pourraient être contraignant lorsque les niveaux de CD169 sont proches du seuil de décision. En revanche, la stratification des patients, où la hausse du marqueur corrèle avec la sévérité de la maladie, pourrait être affectée en présence de ces traitements. Bien-entendu, il sera nécessaire d'étudier plus amplement l'évolution des biomarqueurs dans ces pathologies et lors de l'utilisation de ce type de traitements.

Les biomarqueurs utilisés

Grâce à des études antérieures, nous avons estimé que, parmi une sélection de biomarqueurs pertinents, le CD169 et le CD64 présentaient les meilleures performances pour l'identification des infections virales et bactériennes respectivement²⁰⁸. Néanmoins, nous n'avons pas testé l'ensemble des biomarqueurs disponibles. Ainsi, la procédure de marquage rapide étant modulable, une amélioration des performances par ajout ou remplacement d'un ou plusieurs biomarqueurs n'est pas exclue. Par exemple, il a été montré que les pourcentages de cellules CD3+CD38+ présentaient des valeurs de spécificité et de sensibilité élevées pour la détection des infections virales²⁵⁶.

Les autres catégories d'infection

L'expression du CD169 et du CD64 reflète les niveaux des IFN de type I et II respectivement ce qui constitue un argument pour la sélection de ces marqueurs comme témoins d'une infection virale ou bactérienne respectivement. Néanmoins, ces IFN sont aussi sécrétés lors d'infections **fongiques ou parasitaires**, il sera donc nécessaire d'étudier l'expression de nos marqueurs dans ces contextes. Nous n'avons pas encore réussi à obtenir des échantillons suffisants pour conclure sur ces questions essentielles, en particulier dans les zones endémiques de parasites majeurs, mais un effort est actuellement fourni afin d'engager ces recherches. Par ailleurs, même si les évaluations des performances cliniques du test ont été effectuées sur des cohortes larges et variées, un tel test implique de valider la performance des marqueurs sur une multitude de pathologies/ pathogènes. Jusqu'à présent le test a été appliqué sur plus d'une vingtaine de pathogènes différents mais des efforts restent encore à faire pour étudier la grande **diversité des micro-organismes existants**.

La population pédiatrique

Les études menées jusqu'à présents se sont concentrées sur plusieurs cohortes de patients adultes mais les performances du test doivent encore être validées sur des **cohortes d'enfants** afin d'étendre le test à la totalité de la population. Comme le test utilise de petits volumes de sang capillaire, il sera d'autant plus utile pour la population pédiatrique. Des collaborations sont en cours pour répondre à cette question et les résultats préliminaires montrent que les deux marqueurs évoluent de manière similaire lors d'infections chez la population pédiatrique et adulte (données non montrées).

Enfin, la **diversité de l'état immunologique et clinique** des patients infectés ainsi que les **niveaux de ressources différents** en fonction de la zone géographique concernée font qu'il est plus intéressant de considérer les différents tests disponibles ensemble chacun avec ses bénéfices et ses limites plutôt que de se restreindre à seul test. La thèse s'inscrit donc dans un effort de recherche permanent de nouveaux biomarqueurs et de nouvelles approches afin de répondre aux mieux à la problématique de la lutte contre les infections.

Intérêt clinique de la procédure de marquage rapide dans le triage des patients présentant des signes d'infections

En se basant sur la mesure de biomarqueurs qui distinguent les infections bactériennes et virales, le test proposé permet de **rapidement trier**, isoler ou traiter un patient, mais également de **réduire la liste** des pathogènes cibles à rechercher par la suite. Cela permet ainsi de ne lancer des cultures bactériennes ou antibiogrammes qu'en cas de positivité du CD64, et des PCR ou tests antigéniques spécifiques de virus qu'en cas de positivité du CD169. L'utilisation du test en routine engendrerait donc un **gain de temps** pour le médecin et le patient ainsi qu'un **gain économique** conséquent pour les systèmes de santé. Certains de nos résultats illustrent aussi comment un tel test de triage pourrait **impacter la manière dont les traitements antibiotiques sont administrés**. Par exemple, dans la première cohorte de l'étude publiée dans « Cytometry part A »²³⁴, les données épidémiologiques ont montré qu'une antibiothérapie avait été initiée chez 67 des 85 patients. En examinant l'ensemble de la cohorte, nous avons trouvé que 36 des 38 sujets atteints d'infections bactériennes, et 23 des 29 co-infectés par des bactéries et des virus avaient reçu des antibiotiques de manière appropriée. A l'inverse, 8 sujets qui ne semblaient pas être infectés par une bactérie (CD64 négatifs) ont reçu des antibiotiques de manière potentiellement inadaptée. Les deux biomarqueurs pourraient donc être intégrés dans le processus de gestion clinique globale pour déterminer la nécessité ou non d'un traitement antibiotique. Ainsi, le test de triage pourrait avoir une utilité pour **fluidifier le parcours de soins des patients et leur prise en charge** par tous personnels même très peu qualifiés, notamment en **services d'Urgences**. Ce genre d'études pourrait être étendu à d'autres institutions médicales comme les **cabinets médicaux et les pharmacies**, à des **endroits sensibles et reculés** (zones à faible ressources ou militaires), ou même à des zones où le contrôle des épidémies est nécessaire (aéroports et frontières). De ce fait, le test aurait un intérêt pour la **gestion de crise en cas d'épidémies** pour trier et orienter les populations.

Intérêt de la procédure de marquage rapide dans la gestion de crise en cas d'épidémies

La pandémie de COVID-19 est un concentré d'illustrations et d'enseignements : elle a démontré la véracité de la menace des virus émergents ainsi que la difficulté des gouvernements et instances sanitaires à les gérer. Nous avons aussi pris conscience de nos faiblesses comme dans plusieurs secteurs manufacturiers, hospitaliers, ou diagnostiques. Néanmoins, beaucoup d'éléments positifs ont aussi été mis en lumière : La base de données de l'Organisation mondiale de la santé montre que 3547 essais ont été enregistrés auprès de

ClinicalTrials.gov en 1 an pour une seule maladie. Presque toutes les revues scientifiques ont traité en priorité la recherche sur la COVID-19, avec en tout environ 200 000 articles publiés à ce jour. La pandémie a également montré qu'il été possible de rapidement développer et mettre à disposition des POCT, et à quel point ils pouvaient être utiles. Tout cela illustre bien la pertinence d'avoir à disposition un POCT dit « général » permettant de distinguer n'importe quel virus ou bactérie même émergent. En particulier dans les premiers mois, le monde aurait sans doute profité d'un tel test de triage pour fluidifier le parcours de patients aux urgences mais aussi possiblement pour gérer les accès aux écoles et lieux de travail. Aussi, il est certain qu'il aurait coûté beaucoup moins cher que les tests PCR réalisés en quantité, et aurait au contraire permis de désengorger les laboratoires réalisant ces tests, en ne se concentrant que sur des confirmations.

4. Utilité de la procédure rapide dans la stratification des patients atteints de COVID-19

Il est évident que la COVID-19 n'est pas une infection respiratoire localisée mais **une maladie multi-systémique** causée par un processus systémique diffus impliquant une interaction complexe des **cascades immunologiques, inflammatoires et de coagulation**. Les différences génétiques et acquises dans le système immunitaire de l'hôte compliquent encore le répertoire de l'hôte, ce qui entraîne une grande hétérogénéité dans le tableau clinique, l'évolution et l'issue. L'évaluation clinique est indispensable, mais la mesure de certains marqueurs peut fournir des informations supplémentaires et objectives pouvant avoir un impact significatif sur la prise en charge des patients. Dans la littérature, différents **biomarqueurs** sont décrits comme pouvant contribuer à mieux prendre en charge les patients atteints de la COVID-19 ²⁵⁷ (figure 36).

Assessment of severity	Lymphopenia Lymphocyte subsets - ↓CD4+, CD8+, B, NK cells, ↑ plasma cells ↑ NLR & ↓ LCR ↑ IL-2R/Lymphocytes ratio ↑ IL-6 ↑ CRP, PCT ↑ Ferritin ↑ LDH ↑ D-dimers ↑ Specific cardiac biomarkers – CK-MB, CTnT, Mb, NT-proBNP
------------------------	---

Figure 36 : Biomarqueurs décrits comme reflétant le niveau de sévérité de la COVID-19. Tiré de ²⁵⁷.

Ainsi, nous nous sommes demandé si les niveaux du CD169 pouvaient prédire la sévérité de la COVID-19²³⁶. Ensuite, la procédure en une étape étant évolutive et pouvant être associée à divers biomarqueurs pertinents, nous avons analysé les niveaux d'une sélection de biomarqueurs d'intérêt et les avons corrélés avec la sévérité de la maladie. La table 9 résume les biomarqueurs étudiés dans la thèse et ayant présenté les meilleures performances pour la stratification des patients selon le besoin en oxygénation artificielle.

Table 9 : Les biomarqueurs de la thèse présentant les meilleures performances dans la stratification des patients selon le besoin en oxygénothérapie.

	AUC	Sensibilité	Spécificité	Cohorte étudiée	Référence
mCD169	0,879	89%	80%	54 patients hospitalisés présentant une RT-PCR positive au SARS-CoV-2 (25 sous oxygène et 25 sans oxygène) versus donneurs sains	236 Pathogens
nombre CD8+CD57+	0,54	65%	45%		
mHLA-DR	0,87	92%	75%	30 patients hospitalisés présentant une RT-PCR positive au SARS-CoV-2 (14 ventilés et 16 non-ventilés) versus donneurs sains	En soumission dans Critical care medicine
mCD4	0,87	86%	81%		
nombre CD8+	0,79	100%	62%		
mCD4 nombre CD8+	0,98	86%	100%		

Dans la première étude, publiée dans « Pathogens »²³⁶, nos collaborateurs ont trouvé des niveaux élevés de CD169, qui étaient en corrélation avec l'expression de l'ARN du SARS-CoV-2 détecté dans les prélèvements nasaux. Aussi, les niveaux de CD169 étaient en corrélation avec les marqueurs inflammatoires (fibrinogène, lipase), les cytokines pro-inflammatoires IL-6 et de l'IL-10 connus pour être associés à de mauvais pronostics^{258,259}, ainsi que le nombre de lymphocytes CD8+ sénescents (CD57+). Les deux paramètres : expression du CD169 et nombre des lymphocytes CD8+CD57+ étaient significativement plus élevés chez les patients nécessitant une oxygénothérapie avec des valeurs prédictives considérables (AUC : 0,88 et 0,54 respectivement).

Dans la deuxième étude, en soumission dans « Critical care medicine », nous avons trouvé que l'expression de HLA-DR et de CD4 sur les monocytes ainsi que le nombre de cellules T CD8+ étaient significativement plus faibles chez les patients ventilés par rapport aux patients non-ventilés. Ces résultats sont en accord avec les études précédentes montrant une réduction de l'expression de HLA-DR et du nombre de cellules T CD3+CD8+ dans la forme sévère de COVID-19^{169,260,261}, mais mettent également en lumière l'expression du CD4 sur les monocytes comme nouveau marqueur pertinent.

Le CD169 sur les monocytes et macrophages

Nous avons trouvé que l'expression du CD169 était fortement augmenté chez les patients atteints de COVID-19 sévère. Le rôle des macrophages CD169+ dans les infections virales est largement décrit dans la littérature²⁶². Les macrophages CD169+ résidant dans les organes lymphoïdes sont les premières cellules qui fixent les agents pathogènes entrants et agissent comme des gardiens pour empêcher leur propagation. Dans l'infection par le SARS-CoV-2, les cellules myéloïdes ont été décrites comme responsables de la physiopathologie de la maladie en contribuant aux dommages tissulaires locaux et en agissant comme producteurs potentiels de cytokines qui conduisent à l'état hyper-inflammatoire observé dans les cas graves de COVID-19^{251,263-265}. Les macrophages CD169+ jouent un rôle central dans la médiation de la translocation du SARS-CoV-2 dans la rate et les ganglions lymphatiques, et contribuent ainsi à la réplication et à la propagation du virus, ainsi qu'à la tempête de cytokines qui en résulte^{131,234,251,258,264,264-273}. Il a été montré que les monocytes CD169+ étaient présents en grand nombre dans les premiers stades de la COVID-19, où le compartiment monocyttaire était presque exclusivement constitué de groupes CD169^{131,270}.

Le HLA-DR sur les monocytes et macrophages

L'expression membranaire de HLA-DR sur les monocytes reflète des fonctions clés de l'immunité innée à médiation cellulaire, notamment la présentation des antigènes. Chez les patients atteints de septicémie bactérienne, la réduction de l'expression de HLA-DR sur les monocytes indique une immunosuppression, et constitue un facteur prédictif important de résultats cliniques défavorables futurs chez les patients en soins intensifs et de taux accrus d'infections secondaires et de mortalité²⁷⁴. Chez les patients COVID-19, à l'admission, nous avons observé une diminution similaire et une évolution qui reflète le résultat clinique. Cette immunosuppression acquise peut contribuer à la fois au retard de la clairance virale du CoV-2 du SARS, comme cela a été signalé chez les patients les plus graves²⁷⁵, mais aussi aux taux étonnamment élevés d'infections nosocomiales chez les patients COVID-19 gravement malades, principalement représentés par la pneumonie et la bactériémie^{276,277}.

Les lymphocytes

Dans l'immunité adaptative, les lymphocytes T CD8+ et CD4+ jouent un rôle essentiel dans le contrôle de l'infection virale en tuant les cellules infectées par le virus et en produisant des cytokines effectrices. La réponse des cellules T spécifiques du SARS CoV-2 est détectée dans les phases aiguës et convalescentes du COVID-19 et contribue à la survie des patients. Ces cellules subissent des changements quantitatifs et qualitatifs, notamment une diminution du nombre de cellules et des phénotypes d'activation/épuisement, en particulier dans les cas de maladie grave^{260,278,279}. Dans notre étude, nous avons confirmé que le nombre de lymphocytes T CD8+ et CD4+ était diminué et associé à la gravité de la maladie, plus précisément à la nécessité de l'initiation de la ventilation mécanique (lymphocytes T CD8+). Par ailleurs, les patients COVID-19 présentent un nombre accru de cellules T CD8+ exprimant le CD57, qui est considéré comme un marqueur clé de la sénescence et est associé à la fois au vieillissement et aux infections chroniques^{239,280}. Nous avons également trouvé une association entre le CD169 et l'expression de PD1, une molécule cruciale pour l'induction et le maintien de la tolérance périphérique ainsi que pour la stabilité et l'intégrité des lymphocytes T. En effet, l'axe PD1/PD-L1 transmet des signaux inhibiteurs puissants pour bloquer la prolifération et la fonction des cellules T-effecteurs, inhibant ainsi l'immunité antivirale²⁸¹.

Concernant la réponse humorale, il a été montré que le CD169 était inversement corrélé à la présence d'IgG spécifiques du SARS-CoV-2 dans le sérum^{267,282}. Comme nouveauté de notre étude, en caractérisant le compartiment des cellules B, nous avons démontré que le CD169 chez les patients non traités était directement corrélé avec le pourcentage de cellules B naïves et marginales, alors qu'il était inversement corrélé avec les plasmablastes et les cellules B commutées chez tous les patients. Ces résultats renforcent la dynamique spatio-temporelle des réponses des cellules B dans la production d'anticorps. De plus, les altérations du compartiment des cellules B dues à l'infection par le SARS-CoV-2 peuvent être le signe d'un effort du système immunitaire pour contrebalancer la lymphopénie en augmentant les cellules B transitoires et les plasmablastes^{283,284}.

Le CD4 sur les monocytes et macrophages

Dans cette étude, nous avons constaté une augmentation de l'expression de CD4 sur les monocytes chez les patients non-ventilés, ce qui contraste avec la réduction observée chez les patients ventilés. La molécule CD4 est exprimée par tous les monocytes humains périphériques, mais sa fonction sur ces cellules n'est pas entièrement comprise et est peu étudiée²⁸⁵. C'est une glycoprotéine membranaire, membre de la famille des récepteurs de l'immunoglobuline, connue pour être exprimée sur les cellules T et interagir avec le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II, l'IL-16 et la gp120 du virus de l'immunodéficience

humaine ²⁸⁶. Récemment, il a été proposé que l'interaction du CD4 sur les monocytes circulants avec le CMH-II exprimé par l'endothélium activé pourrait être un mécanisme potentiel d'activation des monocytes et de différenciation en macrophages qui contribuent à deux fonctions clés de l'immunité innée : la sécrétion de cytokines et la phagocytose ²⁸⁷. Nous suggérons donc que la régulation positive des CD4, observée chez les patients non-ventilés mais pas chez les patients ventilés, pourrait jouer un rôle clé dans la clairance du SARS-CoV-2 et pourrait être corrélée à un bon résultat clinique. Cette observation ouvre la voie à d'autres études sur le rôle *in vivo* de l'expression de CD4 sur les monocytes et les conséquences de cette expression dans le SARS-CoV-2 et d'autres infections virales ²⁸⁸.

L'influence des traitements

Ces résultats confirment la nécessité de tenir compte des traitements lors de la mesure du CD169. En effet, dans la première étude, l'ensemble des patients avaient été analysé avant et après corticothérapie ce qui nous a permis d'observer que l'expression du CD169 était modulée par la prise de traitements. A l'inverse, dans la seconde étude, la plupart des patients (93%) ont reçu une corticothérapie avant l'inclusion ce qui pourrait expliquer pourquoi le CD169 a démontré de plus faibles performances dans cette étude.

La fenêtre temporelle d'analyse

La fenêtre temporelle à laquelle les marqueurs sont mesurés est importante. Dans la première étude ²³⁶, les échantillons ont été prélevés au cours des 5 premiers jours d'hospitalisation mais la date exacte des premiers symptômes n'a pas été prise en compte. Dans la seconde étude, les patients ont été prélevés plusieurs fois depuis le jour d'admission à l'hôpital et la date des premiers symptômes a été prise en compte. Cela nous a permis de définir la fenêtre temporelle dans laquelle nos marqueurs sont détectables et atteignent leur pic. Par rapport à la PCT et la CRP qui sont toutes deux relativement précoces, détectables entre 2 et 4h (PCT) et entre 12 et 24h (CRP) et atteignant leur pic entre 6 et 24h (PCT) et à 48h (CRP), nos marqueurs ont l'avantage, en plus d'apparaître précocement, de se maintenir plus longtemps permettant ainsi un diagnostic plus tardif (jusqu'à 10 jours après l'infection) (figure 37).

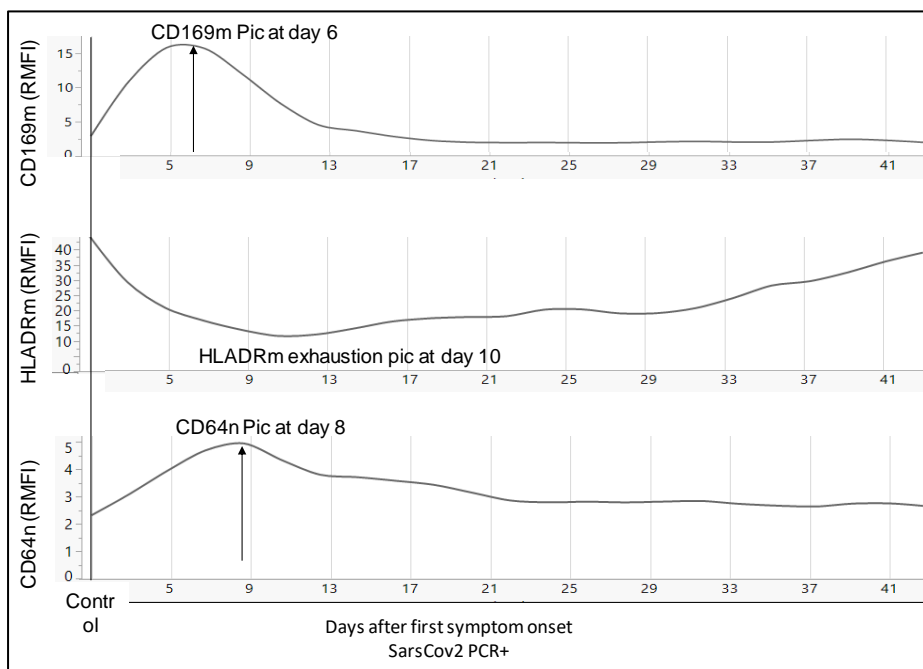


Figure 37 : Cinétique des biomarqueurs CD169, HLA-DR et CD64 au cours de la COVID-19.

Les marqueurs étudiés

Ces résultats dans leur ensemble ont permis de déterminer les marqueurs les plus pertinents dans le suivi des patients atteints de la COVID-19. Ils doivent être néanmoins confirmés dans une cohorte plus importante et indépendante pour validation avant généralisation, en utilisant un panel dédié incluant par exemple CD169, CD64, HLA-DR, CD4, CD8 et CD57. D'autres marqueurs sont également potentiellement importants.

L'évolution de l'expression des marqueurs immunitaires dans le temps présenté dans la thèse apporte un nouvel éclairage sur l'implication séquentielle de ces marqueurs dans la réponse immunitaire. Par exemple, l'ISG CD169 semble spécifique de la phase aiguë et revient à la ligne de base après une semaine ou deux, tandis que le récepteur Fc-gamma CD64 est augmenté pendant la phase aiguë mais son retour à un niveau basal est retardé à environ 3 semaines. Le CD11b sur les basophiles et les éosinophiles apparaît plus tard dans l'évolution de la maladie, ce qui suggère que ces cellules sont indirectement touchées par le SARS-CoV-2. À des moments plus tardifs, d'autres marqueurs permettent de distinguer les patients ventilés des patients non-ventilés, comme le nombre de basophiles, de neutrophiles et de NKT, ainsi que l'expression de CD11b et de CD294 sur les granulocytes. Ces marqueurs devraient être considérés et étudiés de manière plus approfondie dans les prochaines études.

5. Utilité de la procédure rapide dans l'étude de l'induction des biomarqueurs d'intérêt

La compréhension du lien fonctionnel qui existe entre le CD169/ CD64 et les IFNs produits en réponse aux infections pourrait aider à démontrer la pertinence de l'utilisation de ces biomarqueurs pour distinguer les infections bactériennes et virales. Lors de la réponse anti-infectieuse, les cellules myéloïdes possédant des PRR identifient les PAMP et les DAMP provenant de micro-organismes et déclenchent une réponse inflammatoire robuste qui entraîne l'activation de différentes cascades de signalisation en fonction de la nature de l'agent infectieux. Dans le travail publié dans « Immunity, inflammation and disease »¹²⁴, nous avons montré que cette interaction hôte/pathogène induit de manière indirecte la régulation à la hausse des biomarqueurs CD169 et CD64 via l'induction de la production d'IFN-I et II respectivement (figure 30 A).

Toutefois, il est connu que les pathogènes impliqués *in vivo* peuvent dévier la machinerie cellulaire conduisant à une réponse IFN de l'hôte différente. Par exemple, certains rapports ont montré que la réponse IFN est tronquée dans les formes sévères de COVID-19 par des mécanismes cellulaires, des déficiences en IFN, ou l'induction d'auto-anticorps anti-IFN-I. Pourtant, nos résultats précédents ont montré une très forte expression du CD169 chez la quasi-totalité des patients atteints de la COVID-19 y compris chez ceux présentant des formes sévères. Ces observations suggèrent que d'autres voies, indépendantes de l'IFN, pourraient être impliquées dans la régulation à la hausse du CD169. En effet, nos résultats d'activation *in vitro* sur PBMC (publiés dans « Pathogens »²³⁶) et sur sang total (en revue dans « Critical care medicine ») ont montré de façon assez inattendue que l'expression du CD169 pouvait être induite directement sur les monocytes par interaction avec la protéine Spike du SRAS-CoV-2 (figure 30 B). Mais alors comment le virus du SRAS-CoV-2 interagit avec ces monocytes ?

Nous ne savons toujours pas si le récepteur ACE2 est exprimé sur les leucocytes circulants^{289,290}, cependant il a été démontré que le SRAS-CoV2 peut induire l'activation des monocytes/macrophages par l'interaction directe de la Spike avec TLR4 et TLR2. Cette

interaction induit une production importante d'IL-1 et d'IL-6 par les voies de signalisation Myd88 et NFκB^{291,292}. Ainsi, dans la première étude analysant les PBMC, nous avons montré que les monocytes avaient été activés avec la protéine spike, induisant la libération d'IL6 et d'IL 10 et l'expression du CD169 et du HLA-DR. Dans la seconde étude, nous avons reproduit cette activation monocytaire en utilisant un modèle de sang total, retrouvant une production d'IL6, mais aussi de TNF-α en faveur d'une signalisation par TLR4 et/ou TLR2 (figure 38). Ces résultats suggèrent un rôle potentiel de l'activation des monocytes par la protéine Spike dans l'induction de la tempête cytokinique connue comme étant un élément central dans la physiopathologie de la COVID-19 et mériteraient donc de plus amples investigations.

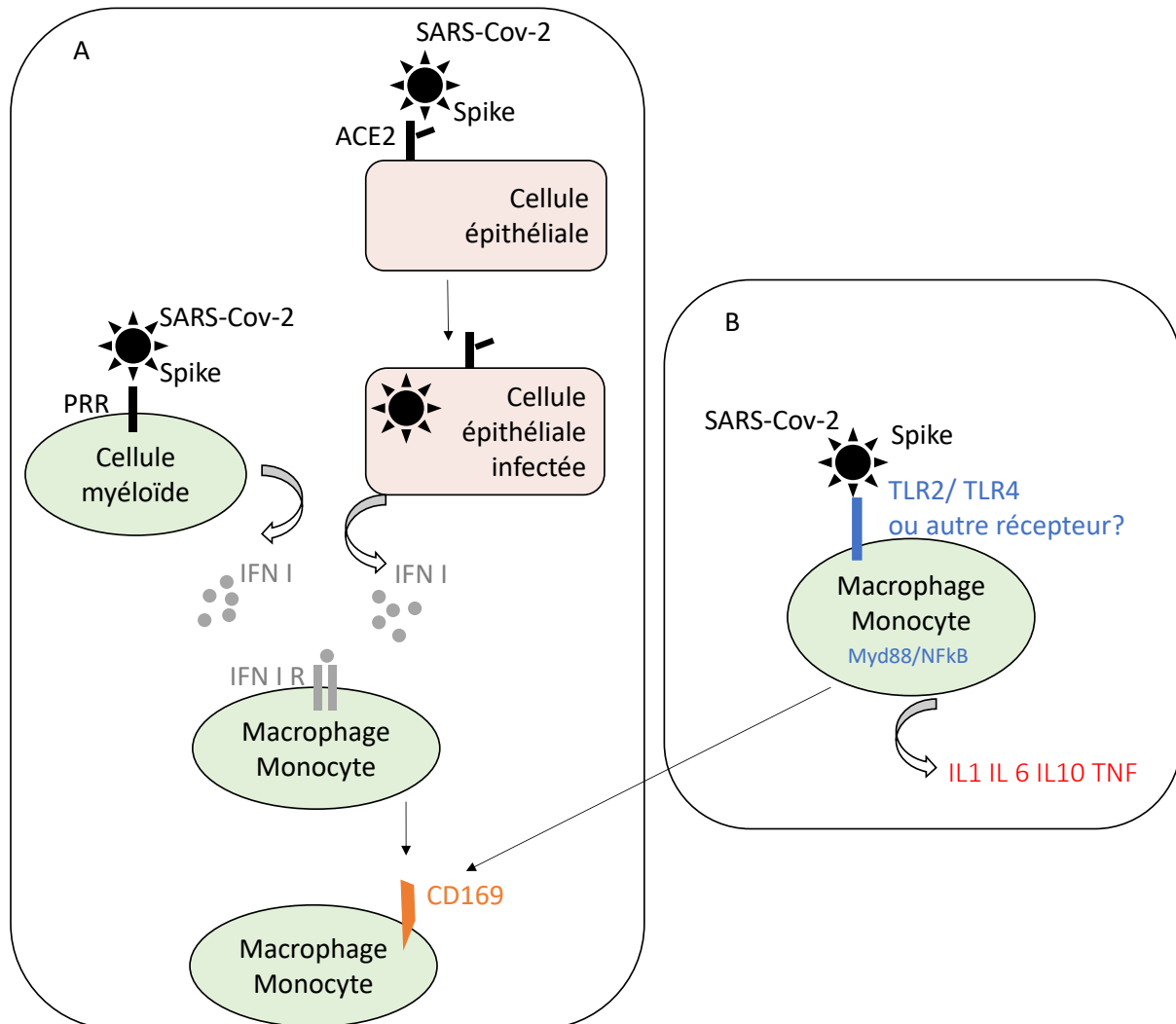


Figure 38 : Mécanismes hypothétiques indirect (A) et direct (B) de l'induction de l'expression du CD169 lors de l'infection par le SRAS-CoV-2.

L'ensemble de nos résultats jusqu'à présent suggère que les phénotypes les plus graves de la COVID-19 sont associés à une dérégulation des fréquences des sous-populations leucocytaires (lymphopénie, basopénie, éosinopénie, et augmentation du nombre de neutrophiles) ainsi qu'à une dérégulation de l'expression de récepteurs membranaires (augmentation du CD169, baisse du CD4 et HLA-DR sur les monocytes) et de la production de médiateurs solubles (production d'IFN tronquée et production excessive de cytokines pro-inflammatoires). Sur le plan clinique,

ces formes sévères de la COVID-19 sont associées à la présence de comorbidités comme le diabète, l'hypertension et l'obésité. Néanmoins, un biais de l'âge fort et indépendant de la présence de comorbidités sont observés. Il est connu que l'épuisement du système immunitaire et le potentiel inflammatoire augmentent avec l'âge. Ce phénomène, également appelé vieillissement inflammatoire « inflamm-aging » pourrait expliquer le biais de sévérité de la maladie ²³⁹.

Toutefois, malgré les progrès transversaux réalisés au cours des derniers mois, on ne connaît toujours pas par quel mécanisme le SRAS-CoV-2 induit des formes de maladie plus sévères chez l'adulte. Pour tenter de répondre à cette question, nous nous sommes concentrés sur les paramètres précédemment décrits comme étant associés à la sévérité de la COVID-19, et en particulier sur les monocytes, car de plus en plus de preuves montrent qu'ils peuvent jouer un rôle central dans l'orchestration d'une réponse immunitaire dérégulée ²⁴⁰.

Les résultats (en revue dans « *Scientific reports* ») ont confirmé que les systèmes immunitaires lymphoïdes et myéloïdes sont moins efficaces et plus enclins à développer une inflammation plus importante chez les adultes que chez les enfants (figure 39).

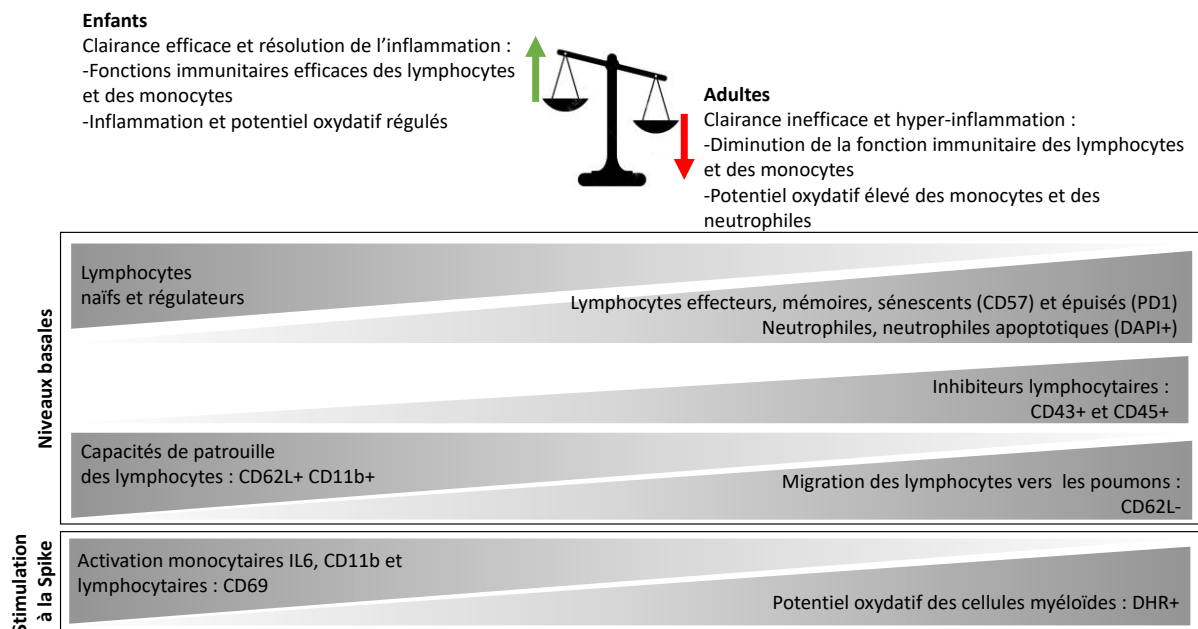


Figure 39 : Résumé des paramètres ayant montré des différences significatives entre les enfants et les adultes avant et après activation *in vitro* avec la protéine Spike.

L'axe CD169/CD43

Les caractéristiques immunitaires basales permettaient de distinguer les adultes des enfants, et nous avons notamment identifié l'expression CD43 sur lymphocytes, un ligand du CD169²⁹³, ayant un rôle inhibiteur potentiel, comme l'un des meilleurs discriminateurs. Il est intéressant de noter qu'un taux plus élevé de CD43 chez les adultes a été associé à une efficacité moindre de la réponse à l'infection par le virus respiratoire syncytial ¹⁵⁹. Ces observations suggèrent que les niveaux élevés de CD43 chez les adultes et de CD169, caractéristiques de l'infection par le SRAS-CoV2, peuvent déclencher une plus grande inhibition des lymphocytes, entraînant une moindre capacité à combattre le virus chez les adultes par rapport aux enfants. Cela pourrait également être lié à la lymphopénie typiquement observée chez les patients atteints de COVID-19. Nous pensons que cette nouvelle théorie devrait être étudiée de manière plus approfondie car l'interaction CD169/CD43 pourrait constituer une cible thérapeutique intéressante.

Les molécules d'adhésion

Les lymphocytes des adultes expriment moins de molécules d'adhésion (CD62L/ CD11b), ce qui suggère que la capacité de patrouille des lymphocytes chez les adultes pourrait être moins efficaces car ces molécules sont nécessaires pour que les cellules se dirigent vers les ganglions lymphatiques, en roulant puis en traversant la paroi vasculaire²⁹⁴. Il convient de noter que les lymphocytes à faible taux de CD62L ont tendance à migrer préférentiellement vers les poumons, ce qui pourrait être lié à la pathogénicité de la COVID-19²⁹⁵.

La voie Th2

Nous avons également observé une plus faible expression basale du « Chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on TH2 cells » (CRTH2) sur les éosinophiles des enfants par rapport aux adultes. Le CRTH2 est le récepteur de la Prostaglandin D2 (PGD2). Il est considéré comme un marqueur des cellules T de type Th2. Parmi les granulocytes, CRTH2 est exclusivement exprimé dans les éosinophiles et les basophiles. Le CRTH2 semble impliqué dans diverses activités pro-inflammatoires des leucocytes, notamment la migration, l'adhésion, l'extravasation, et certaines fonctions effectrices²⁹⁶. Il a été proposé que le CRTH2 pouvait permettre de prédire des contextes pro-inflammatoires dans certaines pathologies telles que les allergies²⁹⁷. Ainsi, les niveaux de CRTH2 plus élevés chez les adultes par rapport aux enfants pourraient refléter un potentiel inflammatoire plus fort. Cependant, des études antérieures ont montré que l'expression du CRTH2 sur les basophiles et les éosinophiles était significativement plus faible dans les formes sévères de COVID-19, ce qui suggère qu'une régulation négative de CRTH2 peut se produire au cours d'un événement inflammatoire extrême²⁹⁸.

L'activation par la protéine spike

L'activation du sang total par la protéine spike a induit des réponses différentes entre adultes et enfants, notamment : une réponse monocyttaire plus faible (IL6, CD69 et CD11b), une augmentation plus importante des marqueurs inflammatoires (DHR et MPO), et une activation plus faible des cellules B (CD69) chez les adultes, exacerbant ainsi la faible réactivité immunitaire préexistante et le potentiel inflammatoire plus élevé chez les adultes. Ces tests fonctionnels dans leur ensemble montrent que des mécanismes complexes, directs et indirects soutiennent l'induction des biomarqueurs d'intérêt et suggèrent que certains d'entre eux peuvent expliquer le biais d'âge marqué dans la sévérité de la COVID-19. Néanmoins, une limite importante de ces tests fonctionnels, est qu'il est difficile de parfaitement reproduire un environnement cellulaire *in vitro* en raison du large spectre d'interactions qui existe entre les cellules immunitaires sanguines et les autres éléments de l'organisme qui ne sont pas pris en compte dans ce contexte. Ainsi, les résultats obtenus restent hypothétiques et doivent être validés par d'autres méthodes.

6. CONCLUSIONS GENERALES

L'enjeu de la thèse a été de faciliter le diagnostic des patients présentant des signes d'infection en proposant des méthodes de cytométrie en flux adaptées. La première solution apportée est une méthode de préparation des échantillons de cytométrie en flux auprès du patient, précise et standardisée. Cette procédure réduit les besoins en matériel et formation du personnel et pourrait aider à surmonter les contraintes logistiques rencontrées dans de nombreuses applications de cytométrie en flux. L'utilisation de la méthode pour la mesure des biomarqueurs CD64 et du CD169 à la surface des cellules leucocytaires permet de distinguer une infection bactérienne d'une infection virale. La procédure combinée à ces marqueurs a été évaluée sur plusieurs pathologies infectieuses et dans divers contextes, dont le service des urgences, la réanimation ou même en ambulatoire. L'induction du CD169 sur les monocytes et de CD164 sur les neutrophiles par les IFN de type I et de type II respectivement confirme la pertinence de ces marqueurs pour évaluer si une réponse immunitaire est orientée vers un virus ou vers une bactérie.

L'utilisation de la méthode pour la mesure précoce du CD169, du HLA-DR et du CD4 sur les monocytes ainsi que le nombre de CD8+, à l'admission du patient, ainsi que l'immunophénotypage des lymphocytes T et B, fournit une mesure précoce et fiable de l'état immunitaire, et de l'évaluation de la progression de la COVID-19, afin d'orienter potentiellement l'approche thérapeutique. L'interaction directe de la protéine virale Spike avec les monocytes/macrophages via les récepteurs Toll-like pourrait jouer un rôle central dans la pathogénicité du SARS-CoV-2. Cette interaction peut induire et exacerber des réponses immunitaires et inflammatoires différentes entre les enfants et les adultes qui présentent des différences préexistantes, notamment des lymphocytes inefficaces et sénescents, des capacités de régulation altérées, ainsi que des granulocytes oxydatifs et inflammatoires élevés chez les adultes. Cela pourrait expliquer le biais d'âge marqué dans la sévérité de la maladie, et nous proposons que certains des marqueurs identifiés ici pourraient être prédictifs des formes sévères de la COVID-19.

Deux autres solutions permettant un immunophénotypage délocalisé ont été proposées. Un protocole de préservation par congélation facile a été établi qui permet de conserver les échantillons de sang total à -20°C dans son intégralité. Cette méthode est prometteuse dans le cadre des études multicentriques ou prospectives car elle permet d'économiser du temps et des efforts tout en fournissant un immunophénotypage similaire à un protocole de congélation en DMSO ou à une mesure sur sang frais. L'autre protocole de préservation repose sur le séchage direct du sang total sur un papier buvard. Ainsi, la plupart des leucocytes contenus dans une goutte de sang peuvent être facilement stockés et expédiés à température ambiante. Le prélèvement par piqûre au doigt ou au talon est une méthode non invasive qui donne accès à des tests spécialisés aux personnes isolées, aux patients de régions éloignées ou même à la population générale nécessitant un dépistage. Les cellules récupérées en laboratoire peuvent être interrogées pour leur contenu en protéines et en acides nucléiques, pour une variété d'applications englobant les troubles immunologiques, les hémopathies malignes et les maladies infectieuses.

L'ensemble de ces études ouvrent de nouvelles perspectives à la cytométrie en flux : de nouvelles applications réalisées de façon plus simple, de manière décentralisée, ou alors au contraire regroupées dans des laboratoires centraux depuis des zones reculées.

Bibliographie

1. On Agriculture — Cato, Varro.
<https://www.hup.harvard.edu/catalog.php?isbn=9780674993136>.
2. Une histoire des microbes / Patrick Berche - Université de Lorraine. https://ulyse.univ-lorraine.fr/discovery/fulldisplay/alma991005571789705596/33UDL_INST:UDL.
3. Bastian, H. C. The Germ-Theory of Disease. *Br Med J* **1**, 469–476 (1875).
4. Chapter 13 - Immunity to Infection. in *Primer to the Immune Response (Second Edition)* (eds. Mak, T. W., Saunders, M. E. & Jett, B. D.) 295–332 (Academic Cell, 2014). doi:10.1016/B978-0-12-385245-8.00013-3.
5. LePan, N. Visualizing the History of Pandemics. *Visual Capitalist*
<https://www.visualcapitalist.com/history-of-pandemics-deadliest/> (2020).
6. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention, National Institute for Occupational Safety and Health. *1994 Fact book: national program for occupational safety and health in construction*.
<https://www.cdc.gov/niosh/docs/94-114/> (1994) doi:10.26616/NIOSH PUB94114.
7. Cohen, M. L. Changing patterns of infectious disease. *Nature* **406**, 762–767 (2000).
8. DOOR, J.-P. & BLANDIN, M.-C. Le risque épidémique (tome 1, rapport).
<https://www.senat.fr/rap/r04-332-1/r04-332-11.html> (2004).
9. Poliomyelitis prevention in the United States: introduction of a sequential vaccination schedule of inactivated poliovirus vaccine followed by oral poliovirus vaccine. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep* **46**, 1–25 (1997).
10. Armstrong, G. L., Conn, L. A. & Pinner, R. W. Trends in Infectious Disease Mortality in the United States During the 20th Century. *JAMA* **281**, 61–66 (1999).
11. Meslé, F. La mortalité en France: le recul se poursuit. *Population (French Edition)* **50**, 745–778 (1995).

12. World Health Organization. Communicable Diseases Cluster. *Removing obstacles to healthy development : report on infectious diseases*. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/65847> (1999).
13. Institute of Medicine (US) Committee on Emerging Microbial Threats to Health. *Emerging Infections: Microbial Threats to Health in the United States*. (National Academies Press (US), 1992).
14. Organisation mondiale de la santé. Les 10 principales causes de mortalité. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.
15. World Health Organization. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. <https://covid19.who.int>.
16. @NatGeoFrance. Le COVID-19 a fait plus 5 millions de morts à travers le monde. *National Geographic* <https://www.nationalgeographic.fr/sciences/sante-le-covid-19-a-fait-plus-5-millions-de-morts-a-travers-le-monde> (2021).
17. Ventola, C. L. The Antibiotic Resistance Crisis. *P T* **40**, 277–283 (2015).
18. Annunziato, G. Strategies to Overcome Antimicrobial Resistance (AMR) Making Use of Non-Essential Target Inhibitors: A Review. *International Journal of Molecular Sciences* **20**, 5844 (2019).
19. The World Health Organization. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>.
20. Cassini, A. *et al.* Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *Lancet Infect Dis* **19**, 56–66 (2019).
21. Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O. & Piddock, L. J. V. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* **13**, 42–51 (2015).
22. Bush, K. *et al.* Tackling antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* **9**, 894–896 (2011).

23. Ten health issues WHO will tackle this year. <https://www.who.int/news-room/spotlight/ten-threats-to-global-health-in-2019>.
24. Bartlett, J. G., Gilbert, D. N. & Spellberg, B. Seven ways to preserve the miracle of antibiotics. *Clin Infect Dis* **56**, 1445–1450 (2013).
25. Sabuncu, E. *et al.* Significant Reduction of Antibiotic Use in the Community after a Nationwide Campaign in France, 2002–2007. *PLOS Medicine* **6**, e1000084 (2009).
26. Hamad, B. The antibiotics market. *Nature Reviews Drug Discovery* **9**, 675–676 (2010).
27. Angine : état des lieux de l'ANSM sur les TROD disponibles en pharmacie. VIDAL <https://www.vidal.fr/actualites/23998-angine-etat-des-lieux-de-l-anism-sur-les-trod-disponibles-en-pharmacie.html>.
28. Katella, K. Rapid diagnostic for gonorrhea wins \$19 million federal prize competition to combat antibiotic resistance | National Institutes of Health (NIH). *National Institutes of Health (NIH)* <https://www.nih.gov/news-events/news-releases/rapid-diagnostic-gonorrhea-wins-19-million-federal-prize-competition-combat-antibiotic-resistance> (2020).
29. Katelaris, A. L. *et al.* Effectiveness of BCG Vaccination Against Mycobacterium tuberculosis Infection in Adults: A Cross-sectional Analysis of a UK-Based Cohort. *The Journal of Infectious Diseases* **221**, 146–155 (2020).
30. Patel, P. D. *et al.* Safety and Efficacy of a Typhoid Conjugate Vaccine in Malawian Children. *New England Journal of Medicine* **385**, 1104–1115 (2021).
31. Biswal, S. *et al.* Efficacy of a tetravalent dengue vaccine in healthy children aged 4–16 years: a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet* **395**, 1423–1433 (2020).
32. Ledford, H. Malaria vaccine shows promise — now come tougher trials. *Nature* **593**, 17–17 (2021).
33. Song, K. R. *et al.* Oral Cholera Vaccine Efficacy and Effectiveness. *Vaccines (Basel)* **9**, 1482 (2021).

34. Shepherd, B. O., Chang, D., Vasan, S., Ake, J. & Modjarrad, K. HIV and SARS-CoV-2: Tracing a Path of Vaccine Research and Development. *Curr HIV/AIDS Rep* (2022) doi:10.1007/s11904-021-00597-4.
35. Barda, N. *et al.* Effectiveness of a third dose of the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine for preventing severe outcomes in Israel: an observational study. *The Lancet* **398**, 2093–2100 (2021).
36. Thomas, S. J. *et al.* Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine through 6 Months. *New England Journal of Medicine* **385**, 1761–1773 (2021).
37. Hart, R. Pfizer Shot Just 39% Effective Against Delta Infection, But Largely Prevents Severe Illness, Israel Study Suggests. *Forbes*
<https://www.forbes.com/sites/roberthart/2021/07/23/pfizer-shot-just-39-effective-against-delta-infection-but-largely-prevents-severe-illness-israel-study-suggests/> (2021).
38. Lauring, A. S. *et al.* Clinical severity of, and effectiveness of mRNA vaccines against, covid-19 from omicron, delta, and alpha SARS-CoV-2 variants in the United States: prospective observational study. *BMJ* **376**, (2022).
39. Vaccin Novavax contre la COVID-19 : ce qu'il faut savoir. <https://www.who.int/fr/news-room/feature-stories/detail/the-novavax-vaccine-against-covid-19-what-you-need-to-know>.
40. Le vaccin Sinovac-CoronaVac contre la COVID-19 : ce qu'il faut savoir.
<https://www.who.int/fr/news-room/feature-stories/detail/the-sinovac-covid-19-vaccine-what-you-need-to-know>.
41. Le vaccin d'Oxford/AstraZeneca (chAdOx1-S [recombinant]) contre la COVID-19 : ce qu'il faut savoir. <https://www.who.int/fr/news-room/feature-stories/detail/the-oxford-astrazeneca-covid-19-vaccine-what-you-need-to-know>.
42. Patrick.Tonissen. IPBES #PandemicsReport: Escaping the 'Era of Pandemics'. *IPBES secretariat*
<https://ipbes.net/pandemics> (2020).

43. Preventing Emerging Infectious Diseases: A Strategy for the 21st Century Overview of the Updated CDC Plan. <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00054779.htm>.
44. Minghui, R. OMS | Maladies infectieuses endémiques: les 15 prochaines années. *WHO* <http://www.who.int/mediacentre/commentaries/2016/Endemic-infectious-diseases-next-15-years/fr/>.
45. Mabey, D., Peeling, R. W., Ustianowski, A. & Perkins, M. D. Diagnostics for the developing world. *Nat Rev Microbiol* **2**, 231–240 (2004).
46. Dittrich, S. *et al.* Target Product Profile for a Diagnostic Assay to Differentiate between Bacterial and Non-Bacterial Infections and Reduce Antimicrobial Overuse in Resource-Limited Settings: An Expert Consensus. *PLOS ONE* **11**, e0161721 (2016).
47. Pilly, E. *Maladies infectieuses et tropicales: prépa ECN, tous les items d'infectiologie.* (Alinéa plus, 2019).
48. CDCBreastCancer. Know the Signs and Symptoms of Infection. *Centers for Disease Control and Prevention* <https://www.cdc.gov/cancer/preventinfections/symptoms.htm> (2021).
49. Singer, M. *et al.* The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* **315**, 801–810 (2016).
50. Vincent, J. L. *et al.* The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med* **22**, 707–710 (1996).
51. Rudd, K. E. *et al.* Association of the Quick Sequential (Sepsis-Related) Organ Failure Assessment (qSOFA) Score With Excess Hospital Mortality in Adults With Suspected Infection in Low- and Middle-Income Countries. *JAMA* **319**, 2202–2211 (2018).
52. Seymour, C. W. *et al.* Assessment of Clinical Criteria for Sepsis. *JAMA* **315**, 762–774 (2016).
53. Destin des maladies infectieuses (3e édition) / par Charles Nicolle,... | Gallica. <https://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k62789251.texteImage>.

54. McIntosh, K. Community-Acquired Pneumonia in Children. *New England Journal of Medicine* **346**, 429–437 (2002).
55. Peltola, V., Reunanen, T., Ziegler, T., Silvennoinen, H. & Heikkinen, T. Accuracy of clinical diagnosis of influenza in outpatient children. *Clin Infect Dis* **41**, 1198–1200 (2005).
56. Stein, J. *et al.* Performance Characteristics of Clinical Diagnosis, a Clinical Decision Rule, and a Rapid Influenza Test in the Detection of Influenza Infection in a Community Sample of Adults. *Annals of Emergency Medicine* **46**, 412–419 (2005).
57. Choby, B. A. Diagnosis and treatment of streptococcal pharyngitis. *Am Fam Physician* **79**, 383–390 (2009).
58. Sans signe de gravité. *AntiBioEst* <https://www.antibioest.org/antibioguide/sans-signe-de-gravite/>.
59. Sokic-Milutinovic, A., Pavlovic-Markovic, A., Tomasevic, R. S. & Lukic, S. Diarrhea as a Clinical Challenge: General Practitioner Approach. *DDI* **40**, 282–289 (2022).
60. Diagnostic Accuracy of FebriDx: A Rapid Test to Detect Immune Responses to Viral and Bacterial Upper Respiratory Infections - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28991170/>.
61. Oved, K. *et al.* A Novel Host-Proteome Signature for Distinguishing between Acute Bacterial and Viral Infections. *PLOS ONE* **10**, e0120012 (2015).
62. Srugo, I. *et al.* Validation of a Novel Assay to Distinguish Bacterial and Viral Infections. *Pediatrics* **140**, e20163453 (2017).
63. Parrott, G. *et al.* Evaluation of Anyplex™ II RV16 and RB5 real-time RT-PCR compared to Seeplex® RV15 OneStep ACE and PneumoBacter ACE for the simultaneous detection of upper respiratory pathogens. *J Infect Chemother* **23**, 859–861 (2017).
64. Chen, H., Liu, K., Li, Z. & Wang, P. Point of care testing for infectious diseases. *Clinica Chimica Acta* **493**, 138–147 (2019).

65. SARS-CoV-2 Rapid Antigen Test. *Diagnostics*
<https://diagnostics.roche.com/global/en/products/params/sars-cov-2-rapid-antigen-test.html>.
66. Want to know more? <https://binx.jotform.com/211757351861054>.
67. ID NOW™ COVID-19. <https://www.globalpointofcare.abbott/en/product-details/id-now-covid-19.html>.
68. cobas® Liat® Analyzer. <https://diagnostics.roche.com/global/en/products/instruments/cobas-liat.html>.
69. Mason, J. Point-of-Care Testing for Influenza. in *CADTH Issues in Emerging Health Technologies* (Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health, 2016).
70. Revogene® SARS-CoV-2 | Meridian Bioscience.
<https://www.meridianbioscience.com/diagnostics/disease-areas/respiratory/coronavirus/revogene-sars-cov-2/>.
71. Alethia Molecular Diagnostic Platform | Meridian Bioscience.
<https://www.meridianbioscience.com/diagnostics/platforms/molecular/alethia/>.
72. BIOFIRE® FILMARRAY®. *bioMérieux* <https://www.biomerieux-usa.com/solutions/healthcare-solutions/covid-19-comprehensive-solutions>.
73. Land, K. J., Boeras, D. I., Chen, X.-S., Ramsay, A. R. & Peeling, R. W. REASSURED diagnostics to inform disease control strategies, strengthen health systems and improve patient outcomes. *Nat Microbiol* **4**, 46–54 (2019).
74. How much does a BioFire cost? | EverythingWhat.com. <https://everythingwhat.com/how-much-does-a-biofire-cost>.
75. Venge, P. Human neutrophil lipocalin (HNL) as a biomarker of acute infections. *Ups J Med Sci* **123**, 1–8 (2018).
76. Xu, S. Y., Pauksen, K. & Venge, P. Serum measurements of human neutrophil lipocalin (HNL) discriminate between acute bacterial and viral infections. *Scand J Clin Lab Invest* **55**, 125–131 (1995).

77. Venge, P. *et al.* HNL (Human Neutrophil Lipocalin) and a multimarker approach to the distinction between bacterial and viral infections. *J Immunol Methods* **474**, 112627 (2019).
78. Venge, P. & Xu, S. Diagnosis and Monitoring of Acute Infections with Emphasis on the Novel Biomarker Human Neutrophil Lipocalin. *J Appl Lab Med* **3**, 664–674 (2019).
79. van Houten, C. B. *et al.* A host-protein based assay to differentiate between bacterial and viral infections in preschool children (OPPORTUNITY): a double-blind, multicentre, validation study. *Lancet Infect Dis* **17**, 431–440 (2017).
80. Thiriet, C. *et al.* Automated measurement of neutrophil CD64 expression for diagnosing sepsis in critically ill patients. *Minerva Anesthesiol* **85**, 943–950 (2019).
81. Zouiouich, M., Gossez, M., Venet, F., Rimmelé, T. & Monneret, G. Automated bedside flow cytometer for mHLA-DR expression measurement: a comparison study with reference protocol. *Intensive Care Med Exp* **5**, 39 (2017).
82. Carlton, H. C., Savović, J., Dawson, S., Mitchelmore, P. J. & Elwenspoek, M. M. C. Novel point-of-care biomarker combination tests to differentiate acute bacterial from viral respiratory tract infections to guide antibiotic prescribing: a systematic review. *Clin Microbiol Infect* **27**, 1096–1108 (2021).
83. Clark, T. W. *et al.* Diagnostic accuracy of the FebriDx host response point-of-care test in patients hospitalised with suspected COVID-19. *J Infect* **81**, 607–613 (2020).
84. Houston, H. *et al.* Use of the FebriDx point-of-care assay as part of a triage algorithm for medical admissions with possible COVID-19.
<http://medrxiv.org/lookup/doi/10.1101/2021.01.05.21249154> (2021)
doi:10.1101/2021.01.05.21249154.
85. Shirley, M. FebriDx®: A Rapid Diagnostic Test for Differentiating Bacterial and Viral Aetiologies in Acute Respiratory Infections. *Mol Diagn Ther* **23**, 803–809 (2019).

86. Mansbridge, C. T. *et al.* FebriDx host response point-of-care testing improves patient triage for coronavirus disease 2019 (COVID-19) in the emergency department. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1–8 (2022) doi:10.1017/ice.2021.531.
87. Karim, N. *et al.* Utility of the FebriDx point-of-care test for rapid triage and identification of possible coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Int J Clin Pract* **75**, e13702 (2021).
88. Lagi, F. *et al.* Use of the FebriDx point-of-care test for the exclusion of SARS-CoV-2 diagnosis in a population with acute respiratory infection during the second (COVID-19) wave in Italy. *International Journal of Infectious Diseases* **108**, 231–236 (2021).
89. Akelew, Y. *et al.* Evaluation of C-reactive protein and myxovirus resistance protein A to guide the rational use of antibiotics among acute febrile adult patients in Northwest Ethiopia. *Int J Infect Dis* **101**, 276–282 (2020).
90. Shapiro, N. I. *et al.* A prospective, multi-centre US clinical trial to determine accuracy of FebriDx point-of-care testing for acute upper respiratory infections with and without a confirmed fever. *Ann Med* **50**, 420–429 (2018).
91. Meisner, M. Update on Procalcitonin Measurements. *Ann Lab Med* **34**, 263–273 (2014).
92. Hausfater, P. *et al.* Serum procalcitonin measurement as diagnostic and prognostic marker in febrile adult patients presenting to the emergency department. *Crit Care* **11**, R60 (2007).
93. Tang, B. M. P., Eslick, G. D., Craig, J. C. & McLean, A. S. Accuracy of procalcitonin for sepsis diagnosis in critically ill patients: systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* **7**, 210–217 (2007).
94. Vijayan, A. L. *et al.* Procalcitonin: a promising diagnostic marker for sepsis and antibiotic therapy. *Journal of Intensive Care* **5**, 51 (2017).
95. Markic, J. *et al.* CD15s is a potential biomarker of serious bacterial infection in infants admitted to hospital. *Eur J Pediatr* **172**, 1363–1369 (2013).
96. Nijman, R. G. *et al.* Clinical prediction model to aid emergency doctors managing febrile children at risk of serious bacterial infections: diagnostic study. *BMJ* **346**, f1706 (2013).

97. Le Bel, J. *et al.* Diagnostic accuracy of C-reactive protein and procalcitonin in suspected community-acquired pneumonia adults visiting emergency department and having a systematic thoracic CT scan. *Crit Care* **19**, 366 (2015).
98. Azzini, A. M. *et al.* A 2020 review on the role of procalcitonin in different clinical settings: an update conducted with the tools of the Evidence Based Laboratory Medicine. *Annals of Translational Medicine* **8**, 610–610 (2020).
99. Schneider, J. E., Boehme, C., Borisch, B. & Dittrich, S. Application of a simple point-of-care test to reduce UK healthcare costs and adverse events in outpatient acute respiratory infections. *Journal of Medical Economics* **23**, 673–682 (2020).
100. Al-Shura, A. N. Chapter 7 - Immune System 1: Leukocytes. in *Hematology in Traditional Chinese Medicine Cardiology* (ed. Al-Shura, A. N.) 29–31 (Academic Press, 2014). doi:10.1016/B978-0-12-800124-0.00007-5.
101. *Immunologie fondamentale et immunopathologie: enseignements thématique et intégré tissu lymphoïde et sanguin, immunopathologie et immuno-intervention.* (Elsevier Masson, 2018).
102. Crozat, K., Vivier, E. & Dalod, M. Crosstalk between components of the innate immune system: promoting anti-microbial defenses and avoiding immunopathologies. *Immunol Rev* **227**, 129–149 (2009).
103. Eberl, G. & Pradeu, T. Towards a General Theory of Immunity? *Trends Immunol* **39**, 261–263 (2018).
104. Pradeu, T., Jaeger, S. & Vivier, E. The speed of change: towards a discontinuity theory of immunity? *Nat Rev Immunol* **13**, 764–769 (2013).
105. Janeway, C. Immunogenicity signals 1,2,3 ... and 0. *Immunol Today* **10**, 283–286 (1989).
106. Matzinger, P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* **12**, 991–1045 (1994).
107. Kunder, C. A., St John, A. L. & Abraham, S. N. Mast cell modulation of the vascular and lymphatic endothelium. *Blood* **118**, 5383–5393 (2011).

108. Ou, Z., Dolmatova, E., Lassègue, B. & Griendling, K. K. β 1- and β 2-integrins: central players in regulating vascular permeability and leukocyte recruitment during acute inflammation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **320**, H734–H739 (2021).
109. L-selectin (CD62L) cross-linking signals neutrophil adhesive functions via the Mac-1 (CD11b/CD18) beta 2-integrin. | The Journal of Immunology.
<https://www.jimmunol.org/content/155/3/1502>.
110. Bartlett, N. W. *et al.* Defining critical roles for NF- κ B p65 and type I interferon in innate immunity to rhinovirus. *EMBO Mol Med* **4**, 1244–1260 (2012).
111. Falvo, J. V., Parekh, B. S., Lin, C. H., Fraenkel, E. & Maniatis, T. Assembly of a functional beta interferon enhanceosome is dependent on ATF-2-c-jun heterodimer orientation. *Mol Cell Biol* **20**, 4814–4825 (2000).
112. Panne, D., Maniatis, T. & Harrison, S. C. An atomic model of the interferon-beta enhanceosome. *Cell* **129**, 1111–1123 (2007).
113. Wang, J. *et al.* NF-kappa B RelA subunit is crucial for early IFN-beta expression and resistance to RNA virus replication. *J Immunol* **185**, 1720–1729 (2010).
114. Slauch, J. M. How does the oxidative burst of macrophages kill bacteria? Still an open question. *Mol Microbiol* **80**, 580–583 (2011).
115. Aratani, Y. Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. *Arch Biochem Biophys* **640**, 47–52 (2018).
116. Mutua, V. & Gershwin, L. J. A Review of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Disease: Potential Anti-NETs Therapeutics. *Clin Rev Allergy Immunol* **61**, 194–211 (2021).
117. Ferrand, J. & Ferrero, R. Recognition of Extracellular Bacteria by NLRs and Its Role in the Development of Adaptive Immunity. *Frontiers in Immunology* **4**, (2013).
118. Role of the interferons in CD64 and CD169 expressions in whole blood: Relevance in the balance between viral- or bacterial-oriented immune responses - Bourgoin - 2020 - Immunity,

Inflammation and Disease - Wiley Online Library.

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/iid3.289>.

119. REPONSES AUX PATHOGENES, IMMUNITE ANTI-INFECTIEUSE. 7.
120. Kaufmann, S. H. Immunity to intracellular bacteria. *Annu Rev Immunol* **11**, 129–163 (1993).
121. Thakur, A., Mikkelsen, H. & Jungersen, G. Intracellular Pathogens: Host Immunity and Microbial Persistence Strategies. *Journal of Immunology Research* **2019**, e1356540 (2019).
122. Carty, M., Guy, C. & Bowie, A. G. Detection of Viral Infections by Innate Immunity. *Biochemical Pharmacology* **183**, 114316 (2021).
123. Maria, N. I. *et al.* MxA as a clinically applicable biomarker for identifying systemic interferon type I in primary Sjögren's syndrome. *Annals of the Rheumatic Diseases* **73**, 1052–1059 (2014).
124. Bourgoin, P., Biéché, G., Ait Belkacem, I., Morange, P.-E. & Malergue, F. Role of the interferons in CD64 and CD169 expressions in whole blood: Relevance in the balance between viral- or bacterial-oriented immune responses. *Immun Inflamm Dis* **8**, 106–123 (2020).
125. Muñoz-Carrillo, J. L. *et al.* Cytokine Profiling Plays a Crucial Role in Activating Immune System to Clear Infectious Pathogens. *Immune Response Activation and Immunomodulation* (IntechOpen, 2018). doi:10.5772/intechopen.80843.
126. Hislop, A. D., Taylor, G. S., Sauce, D. & Rickinson, A. B. Cellular responses to viral infection in humans: lessons from Epstein-Barr virus. *Annu Rev Immunol* **25**, 587–617 (2007).
127. Li, W. *et al.* Receptor and viral determinants of SARS-coronavirus adaptation to human ACE2. *EMBO J* **24**, 1634–1643 (2005).
128. Li, G. *et al.* Coronavirus infections and immune responses. *J Med Virol* **92**, 424–432 (2020).
129. Abers, M. S. *et al.* An immune-based biomarker signature is associated with mortality in COVID-19 patients. *JCI Insight* **6**, e144455 (2020).
130. Cao, X. COVID-19: immunopathology and its implications for therapy. *Nat Rev Immunol* 1–2 (2020) doi:10.1038/s41577-020-0308-3.

131. Chevrier, S. *et al.* A distinct innate immune signature marks progression from mild to severe COVID-19. *Cell Reports Medicine* **2**, 100166 (2021).
132. Giamarellos-Bourboulis, E. J. *et al.* Complex Immune Dysregulation in COVID-19 Patients with Severe Respiratory Failure. *Cell Host & Microbe* **27**, 992-1000.e3 (2020).
133. Kermali, M., Khalsa, R. K., Pillai, K., Ismail, Z. & Harky, A. The role of biomarkers in diagnosis of COVID-19 – A systematic review. *Life Sci* **254**, 117788 (2020).
134. Mohamed Khosroshahi, L. & Rezaei, N. Dysregulation of the immune response in coronavirus disease 2019. *Cell Biol Int* 10.1002/cbin.11517 (2020) doi:10.1002/cbin.11517.
135. Qin, C. *et al.* Dysregulation of Immune Response in Patients With Coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. *Clinical Infectious Diseases* **71**, 762–768 (2020).
136. Varchetta, S. *et al.* Unique immunological profile in patients with COVID-19. *Cell Mol Immunol* **18**, 604–612 (2021).
137. Bost, P. *et al.* Deciphering the state of immune silence in fatal COVID-19 patients. *Nat Commun* **12**, 1428 (2021).
138. Chen, Z. & John Wherry, E. T cell responses in patients with COVID-19. *Nat Rev Immunol* **20**, 529–536 (2020).
139. Diao, B. *et al.* Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Frontiers in Immunology* **11**, 827 (2020).
140. Hadjadj, J. *et al.* Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. *Science* **369**, 718–724 (2020).
141. Mann, E. R. *et al.* Longitudinal immune profiling reveals key myeloid signatures associated with COVID-19. *Science Immunology* **5**, eabd6197 (2020).
142. Schulte-Schrepping, J. *et al.* Severe COVID-19 Is Marked by a Dysregulated Myeloid Cell Compartment. *Cell* **182**, 1419-1440.e23 (2020).
143. Urban, J. F. *et al.* Local TH1 and TH2 responses to parasitic infection in the intestine: regulation by IFN-gamma and IL-4. *Vet Immunol Immunopathol* **54**, 337–344 (1996).

144. Beiting, D. P. Protozoan parasites and type I interferons: a cold case reopened. *Trends Parasitol* **30**, 491–498 (2014).
145. Silva-Barrios, S. & Stäger, S. Protozoan Parasites and Type I IFNs. *Front. Immunol.* **8**, (2017).
146. Hain, S. & Drummond, R. A. Immunity to Fungal Infections. in *Reference Module in Biomedical Sciences* (Elsevier, 2021). doi:10.1016/B978-0-12-818731-9.00102-6.
147. Kapasi, A. J., Dittrich, S., González, I. J. & Rodwell, T. C. Host Biomarkers for Distinguishing Bacterial from Non-Bacterial Causes of Acute Febrile Illness: A Comprehensive Review. *PLOS ONE* **11**, e0160278 (2016).
148. Hulett, M. D. & Hogarth, P. M. The second and third extracellular domains of FcγRI (CD64) confer the unique high affinity binding of IgG2a. *Mol Immunol* **35**, 989–996 (1998).
149. Nimmerjahn, F. & Ravetch, J. V. Fcγ receptors: old friends and new family members. *Immunity* **24**, 19–28 (2006).
150. Perussia, B., Dayton, E. T., Lazarus, R., Fanning, V. & Trinchieri, G. Immune interferon induces the receptor for monomeric IgG1 on human monocytic and myeloid cells. *J Exp Med* **158**, 1092–1113 (1983).
151. Li, S. *et al.* Neutrophil CD64 expression as a biomarker in the early diagnosis of bacterial infection: a meta-analysis. *International Journal of Infectious Diseases* **17**, e12–e23 (2013).
152. Corrêa, R. da S. *et al.* Neutrophil CD64 expression levels in IGRA-positive individuals distinguish latent tuberculosis from active disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **114**, e180579 (2019).
153. Monneret, G. *et al.* Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive Care Med* **32**, 1175–1183 (2006).
154. Caballero, I. S. *et al.* Lassa and Marburg viruses elicit distinct host transcriptional responses early after infection. *BMC Genomics* **15**, 960 (2014).
155. Cutler, A. J. *et al.* Capturing the systemic immune signature of a norovirus infection: an n-of-1 case study within a clinical trial. *Wellcome Open Res* **2**, 28 (2017).

156. Farina, A. *et al.* Epstein-Barr virus lytic infection promotes activation of Toll-like receptor 8 innate immune response in systemic sclerosis monocytes. *Arthritis Res Ther* **19**, 39 (2017).
157. Green, A. M. & Harris, E. Monocyte-plasmablast crosstalk during dengue. *Cell Host Microbe* **16**, 7–9 (2014).
158. Hirsch, A. J. *et al.* Zika Virus infection of rhesus macaques leads to viral persistence in multiple tissues. *PLoS Pathog* **13**, e1006219 (2017).
159. Jans, J. *et al.* Siglec-1 inhibits RSV-induced interferon gamma production by adult T cells in contrast to newborn T cells. *European Journal of Immunology* **48**, 621–631 (2018).
160. Kwissa, M. *et al.* Dengue virus infection induces expansion of a CD14(+)CD16(+) monocyte population that stimulates plasmablast differentiation. *Cell Host Microbe* **16**, 115–127 (2014).
161. Lastrucci, C. *et al.* Tuberculosis is associated with expansion of a motile, permissive and immunomodulatory CD16(+) monocyte population via the IL-10/STAT3 axis. *Cell Res* **25**, 1333–1351 (2015).
162. Lin, G.-L., McGinley, J. P., Drysdale, S. B. & Pollard, A. J. Epidemiology and Immune Pathogenesis of Viral Sepsis. *Front Immunol* **9**, 2147 (2018).
163. Sammicheli, S. *et al.* Inflammatory monocytes hinder antiviral B cell responses. *Sci Immunol* **1**, eaah6789 (2016).
164. Theobald, S. J. *et al.* Signatures of T and B Cell Development, Functional Responses and PD-1 Upregulation After HCMV Latent Infections and Reactivations in Nod.Rag.Gamma Mice Humanized With Cord Blood CD34+ Cells. *Front Immunol* **9**, 2734 (2018).
165. Seyerl, M. *et al.* Human rhinoviruses induce IL-35-producing Treg via induction of B7-H1 (CD274) and sialoadhesin (CD169) on DC. *European Journal of Immunology* **40**, 321–329 (2010).
166. Noriega, V. M. *et al.* Human Cytomegalovirus Modulates Monocyte-Mediated Innate Immune Responses during Short-Term Experimental Latency In Vitro. *J Virol* **88**, 9391–9405 (2014).

167. Cid, J., Aguinaco, R., Sánchez, R., García-Pardo, G. & Llorente, A. Neutrophil CD64 expression as marker of bacterial infection: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Infection* **60**, 313–319 (2010).
168. Wang, X. *et al.* Neutrophil CD64 expression as a diagnostic marker for sepsis in adult patients: a meta-analysis. *Critical Care* **19**, 245 (2015).
169. Benlyamani, I., Venet, F., Coudereau, R., Gossez, M. & Monneret, G. Monocyte HLA-DR Measurement by Flow Cytometry in COVID-19 Patients: An Interim Review. *Cytometry Part A* **97**, 1217–1221 (2020).
170. Biswas, S. K. & Lopez-Collazo, E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol* **30**, 475–487 (2009).
171. Wolk, K., Döcke, W. D., von Baehr, V., Volk, H. D. & Sabat, R. Impaired antigen presentation by human monocytes during endotoxin tolerance. *Blood* **96**, 218–223 (2000).
172. Pickkers, P. & Kox, M. Towards precision medicine for sepsis patients. *Critical Care* **21**, 11 (2017).
173. Galbraith, N., Walker, S., Carter, J. & Polk, H. C. Past, Present, and Future of Augmentation of Monocyte Function in the Surgical Patient. *Surg Infect (Larchmt)* **17**, 563–569 (2016).
174. Venet, F., Demaret, J., Gossez, M. & Monneret, G. Myeloid cells in sepsis-acquired immunodeficiency. *Ann N Y Acad Sci* **1499**, 3–17 (2021).
175. Venet, F. & Monneret, G. Advances in the understanding and treatment of sepsis-induced immunosuppression. *Nat Rev Nephrol* **14**, 121–137 (2018).
176. Gustafson, M. P. *et al.* Systemic immune suppression in glioblastoma: the interplay between CD14+HLA-DRlo/neg monocytes, tumor factors, and dexamethasone. *Neuro Oncol* **12**, 631–644 (2010).
177. Chávez-Galán, L., Olleros, M. L., Vesin, D. & Garcia, I. Much More than M1 and M2 Macrophages, There are also CD169(+) and TCR(+) Macrophages. *Front Immunol* **6**, 263 (2015).

178. Zhang, J. *et al.* CD169 identifies an activated CD8(+) T cell subset in regional lymph nodes that predicts favorable prognosis in colorectal cancer patients. *Oncoimmunology* **5**, e1177690 (2016).
179. Fagerberg, L. *et al.* Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Mol Cell Proteomics* **13**, 397–406 (2014).
180. Biesen, R. *et al.* Sialic acid-binding Ig-like lectin 1 expression in inflammatory and resident monocytes is a potential biomarker for monitoring disease activity and success of therapy in systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* **58**, 1136–1145 (2008).
181. Li, W. *et al.* Identification and transcriptome analysis of erythroblastic island macrophages. *Blood* **134**, 480–491 (2019).
182. Zaccai, N. R. *et al.* Crystallographic and in silico analysis of the sialoside-binding characteristics of the Siglec sialoadhesin. *J Mol Biol* **365**, 1469–1479 (2007).
183. Edgar, L. J., Kawasaki, N., Nycholat, C. M. & Paulson, J. C. Targeted Delivery of Antigen to Activated CD169+ Macrophages Induces Bias for Expansion of CD8+ T Cells. *Cell Chem Biol* **26**, 131-136.e4 (2019).
184. Liu, Y., Xia, Y. & Qiu, C.-H. Functions of CD169 positive macrophages in human diseases (Review). *Biomed Rep* **14**, 26 (2021).
185. Macauley, M. S., Crocker, P. R. & Paulson, J. C. Siglec regulation of immune cell function in disease. *Nat Rev Immunol* **14**, 653–666 (2014).
186. Kim, W.-K. *et al.* Increased Expression of CD169 on Blood Monocytes and Its Regulation by Virus and CD8 T Cells in Macaque Models of HIV Infection and AIDS. *AIDS Res Hum Retroviruses* **31**, 696–706 (2015).
187. Pino, M. *et al.* HIV-1 immune activation induces Siglec-1 expression and enhances viral trans-infection in blood and tissue myeloid cells. *Retrovirology* **12**, 37 (2015).

188. Rempel, H., Calosing, C., Sun, B. & Pulliam, L. Sialoadhesin Expressed on IFN-Induced Monocytes Binds HIV-1 and Enhances Infectivity. *PLoS One* **3**, e1967 (2008).
189. van der Kuyl, A. C. *et al.* Sialoadhesin (CD169) Expression in CD14+ Cells Is Upregulated Early after HIV-1 Infection and Increases during Disease Progression. *PLoS One* **2**, e257 (2007).
190. Zou, Z. *et al.* Siglecs Facilitate HIV-1 Infection of Macrophages through Adhesion with Viral Sialic Acids. *PLoS ONE* **6**, e24559 (2011).
191. Izquierdo-Useros, N. *et al.* Siglec-1 Is a Novel Dendritic Cell Receptor That Mediates HIV-1 Trans-Infection Through Recognition of Viral Membrane Gangliosides. *PLoS Biol* **10**, e1001448 (2012).
192. Puryear, W. B. *et al.* Interferon-Inducible Mechanism of Dendritic Cell-Mediated HIV-1 Dissemination Is Dependent on Siglec-1/CD169. *PLoS Pathog* **9**, e1003291 (2013).
193. Rottinghaus, E. K. *et al.* Evaluation of Dried Blood Spots Collected on Filter Papers from Three Manufacturers Stored at Ambient Temperature for Application in HIV-1 Drug Resistance Monitoring. *PLoS ONE* **9**, e109060 (2014).
194. Nuutila, J. *et al.* A rapid flow cytometric method for distinguishing between febrile bacterial and viral infections. *Journal of Microbiological Methods* **92**, 64–72 (2013).
195. Lees, O. Immunophénotypage : Apport de la cytométrie à la biologie clinique. *Revue Française des Laboratoires* **2000**, 91–103 (2000).
196. Zahra El Hentati, F., Iobagiu, C. & Lambert, C. Cytométrie et ses applications en immunologie clinique / Cytometry and its clinical applications in immunology. *Revue Francophone des Laboratoires* **410**, 23–2 (2009).
197. Bourgoin, P. Recherche de nouveaux tests rapides en cytométrie en flux pour l'établissement de diagnostics « aux lits des patients » : application à la discrimination des infections bactériennes et/ou virales en vue de réduire l'usage inutile des antibiotiques. (Aix-Marseille, 2020).

198. O'Donahue, M. Title: Lysing Methods and Reagents for Flow Cytometry Immunophenotyping - PDF Free Download. <https://docplayer.net/49130458-Title-lysing-methods-and-reagents-for-flow-cytometry-immunophenotyping.html>.
199. Tangri, S. *et al.* Validation of cell-based fluorescence assays: Practice guidelines from the ICSH and ICCS – part III – analytical issues. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry* **84**, 291–308 (2013).
200. Jacobs, M. H. & Stewart, D. R. THE ROLE OF CARBONIC ANHYDRASE IN CERTAIN IONIC EXCHANGES INVOLVING THE ERYTHROCYTE. *J Gen Physiol* **25**, 539–552 (1942).
201. van Agthoven, A. VersaLyse and the mechanism of ammonium chloride lysis. *International Journal of Laboratory Hematology* **29**, 65–66 (2007).
202. Plank, K., Dorn, C. & Krause, S. W. The effect of erythrocyte lysing reagents on enumeration of leukocyte subpopulations compared with a no-lyse-no-wash protocol. *Int J Lab Hematol* **43**, 939–947 (2021).
203. Greve, B. *et al.* High-Grade Loss of Leukocytes and Hematopoietic Progenitor Cells Caused by Erythrocyte-Lysing Procedures for Flow Cytometric Analyses. *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research* **12**, 321–330 (2003).
204. Simon, M. R., Roi, L. D., Desai, S., Salberg, D. J. & Rose, N. R. Comparison of cultures of human lymphocytes obtained following NH₄Cl induced red blood cell lysis and Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation. *Immunol Commun* **12**, 301–314 (1983).
205. Vuorte, J., Jansson, S. E. & Repo, H. Evaluation of red blood cell lysing solutions in the study of neutrophil oxidative burst by the DCFH assay. *Cytometry* **43**, 290–296 (2001).
206. Bourgoin, P. *et al.* A novel one-step extracellular staining for flow cytometry: Proof-of-concept on sepsis-related biomarkers. *J. Immunol. Methods* **470**, 59–63 (2019).
207. Bourgoin, P. *et al.* Toward Monocyte HLA-DR Bedside Monitoring: A Proof of Concept Study. *Shock* (2020) doi:10.1097/SHK.0000000000001673.
208. Bourgoin, P. *et al.* Flow cytometry evaluation of infection-related biomarkers in febrile subjects in the emergency department. *Future Microbiology* **15**, 189–201 (2020).

209. Bourgoin, P. *et al.* Clinical research assessment by flow cytometry of biomarkers for infectious stratification in an Emergency Department. *Biomarkers in Medicine* **13**, 1373–1386 (2019).
210. Jamin, C. *et al.* Multi-center harmonization of flow cytometers in the context of the European ‘PRECISESADS’ project. *Autoimmun Rev* **15**, 1038–1045 (2016).
211. Mazur, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **247**, C125–C142 (1984).
212. Santos, A. G., da Rocha, G. O. & de Andrade, J. B. Occurrence of the potent mutagens 2-nitrobenzanthrone and 3-nitrobenzanthrone in fine airborne particles. *Sci Rep* **9**, 1 (2019).
213. Stevens, V. L. *et al.* Cryopreservation of Whole Blood Samples Collected in the Field for a Large Epidemiologic Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **16**, 2160–2163 (2007).
214. Nazarpour, R. *et al.* Optimization of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) Cryopreservation. *Int J Mol Cell Med* **1**, 88–93 (2012).
215. Hininger, I. *et al.* Assessment of DNA damage by comet assay on frozen total blood: method and evaluation in smokers and non-smokers. *Mutat Res* **558**, 75–80 (2004).
216. Damsgaard, C. T., Lauritzen, L., Calder, P. C., Kjaer, T. M. R. & Frøkiaer, H. Whole-blood culture is a valid low-cost method to measure monocytic cytokines - a comparison of cytokine production in cultures of human whole-blood, mononuclear cells and monocytes. *J Immunol Methods* **340**, 95–101 (2009).
217. Appay, V. *et al.* New generation vaccine induces effective melanoma-specific CD8+ T cells in the circulation but not in the tumor site. *J Immunol* **177**, 1670–1678 (2006).
218. Duffy, D. *et al.* Standardized whole blood stimulation improves immunomonitoring of induced immune responses in multi-center study. *Clin Immunol* **183**, 325–335 (2017).
219. Mallone, R. *et al.* Isolation and preservation of peripheral blood mononuclear cells for analysis of islet antigen-reactive T cell responses: position statement of the T-Cell Workshop Committee of the Immunology of Diabetes Society. *Clin Exp Immunol* **163**, 33–49 (2011).

220. Brodin, P., Duffy, D. & Quintana-Murci, L. A Call for Blood-In Human Immunology. *Immunity* **50**, 1335–1336 (2019).
221. Hayes, R. B., Smith, C. O., Huang, W.-Y., Read, Y. & Kopp, W. C. Whole Blood Cryopreservation in Epidemiological Studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **11**, 1496–1498 (2002).
222. Schindler, S. *et al.* Cryopreservation of human whole blood for pyrogenicity testing. *Journal of Immunological Methods* **294**, 89–100 (2004).
223. Penno, M. B., Pedrotti-Krueger, M. & Ray, T. Cryopreservation of whole blood and isolated lymphocytes for B-cell immortalization. *Journal of Tissue Culture Methods* **15**, 43–47 (1993).
224. Harrison, D. *et al.* Interlaboratory comparison of the TransFix[®]/EDTA Vacuum Blood Collection tube with the 5 mL Cyto-Chex[®] BCT. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry* **96**, 496–507 (2019).
225. Sakkestad, S. T., Skavland, J. & Hanevik, K. Whole blood preservation methods alter chemokine receptor detection in mass cytometry experiments. *Journal of Immunological Methods* **476**, 112673 (2020).
226. Andrlova, L. & Kandar, R. The dried blood spot sampling method in the laboratory medicine. *BLL* **120**, 223–234 (2019).
227. Guthrie, R. & Susi, A. A SIMPLE PHENYLALANINE METHOD FOR DETECTING PHENYLKETONURIA IN LARGE POPULATIONS OF NEWBORN INFANTS. *Pediatrics* **32**, 338–343 (1963).
228. Amsterdam, P. van & Waldrop, C. The application of dried blood spot sampling in global clinical trials. *Bioanalysis* **2**, 1783–1786 (2010).
229. Wagner, M., Tonoli, D., Varesio, E. & Hopfgartner, G. The use of mass spectrometry to analyze dried blood spots: USE OF MS TO ANALYZE DBS. *Mass Spec Rev* **35**, 361–438 (2016).
230. Crawford, E. *et al.* Direct analysis in real time coupled with dried spot sampling for bioanalysis in a drug-discovery setting. *Bioanalysis* **3**, 1217–1226 (2011).
231. Ait Belkacem, I., Bourgoin, P., Busnel, J. M., Galland, F. & Malergue, F. One-step White Blood Cell Extracellular Staining Method for Flow Cytometry. *Bio-protocol* **11**, e4135–e4135 (2021).

232. Ait Belkacem, I. *et al.* Cell Analysis from Dried Blood Spots: New Opportunities in Immunology, Hematology, and Infectious Diseases. *Advanced Science* **n/a**, 2100323 (2021).
233. Bourgoin, P., Belkacem, I. A., Arnoux, I., Morange, P.-E. & Malergue, F. Direct freezing of whole blood enables analysis of leucocyte markers by flow cytometry: a proof-of-concept study. *Future Microbiology* **16**, 955–966 (2021).
234. Bourgoin, P. *et al.* CD169 and CD64 could help differentiate bacterial from COVID-19 or other viral infections in the Emergency Department. *Cytometry Part A* **n/a**,
235. Michel, M. *et al.* An ultra-sensitive, ultra-fast whole blood monocyte CD169 assay for COVID-19 screening. *medRxiv* 2020.10.22.20215749 (2020) doi:10.1101/2020.10.22.20215749.
236. Minutolo, A. *et al.* High CD169 Monocyte/Lymphocyte Ratio Reflects the Immunophenotyping Disruption and Predicts Oxygen Need in COVID-19 Patients. (2021)
doi:10.20944/preprints202105.0731.v1.
237. Santé publique France. COVID-19 : point épidémiologique du 1er avril 2021.
<https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/maladies-et-infections-respiratoires/infection-a-coronavirus/documents/bulletin-national/covid-19-point-epidemiologique-du-1er-avril-2021>.
238. Institut national de santé publique du Québec. Revue rapide de la littérature scientifique : proportion de personnes asymptomatiques, leur réponse immunitaire et leur potentiel de transmission de la COVID-19. *INSPQ* <https://www.inspq.qc.ca/publications/2989-asymptomatique-transmission-covid19>.
239. Weiskopf, D., Weinberger, B. & Grubeck-Loebenstien, B. The aging of the immune system. *Transplant International* **22**, 1041–1050 (2009).
240. Pence, B. D. Severe COVID-19 and aging: are monocytes the key? *Geroscience* **42**, 1051–1061 (2020).
241. Petriz, J., Bradford, J. A. & Ward, M. D. No lyse no wash flow cytometry for maximizing minimal sample preparation. *Methods* **134–135**, 149–163 (2018).

242. B·R·A·H·M·S PCT-Q | Infectious Diseases. *Thermo Fisher Scientific*
<https://www.thermofisher.com/infectious-diseases/fr/fr/procalcitonin/brahms-pct-q.html>.
243. Afinion CRP | Diagnostic rapide en POC – Abbott.
<https://www.globalpointofcare.abbott/fr/product-details/afinion-crp.html>.
244. Verschoor, C. P., Kohli, V. & Balion, C. A comprehensive assessment of immunophenotyping performed in cryopreserved peripheral whole blood. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry* **94**, 818–826 (2018).
245. Verschoor, C. P. & Kohli, V. Cryopreserved whole blood for the quantification of monocyte, T-cell and NK-cell subsets, and monocyte receptor expression by multi-color flow cytometry: A methodological study based on participants from the canadian longitudinal study on aging. *Cytometry A* **93**, 548–555 (2018).
246. Corkum, C. P. *et al.* Immune cell subsets and their gene expression profiles from human PBMC isolated by Vacutainer Cell Preparation Tube (CPT™) and standard density gradient. *BMC Immunol* **16**, 48 (2015).
247. Aitken, S. C., Wallis, C. L., Stevens, W., de Wit, T. R. & Schuurman, R. Stability of HIV-1 Nucleic Acids in Dried Blood Spot Samples for HIV-1 Drug Resistance Genotyping. *PLoS ONE* **10**, e0131541 (2015).
248. Brindle, E., Fujita, M., Shofer, J. & O'Connor, K. A. Serum, plasma, and dried blood spot high-sensitivity C-reactive protein enzyme immunoassay for population research. *Journal of Immunological Methods* **362**, 112–120 (2010).
249. Chace, D. H., De Jesús, V. R. & Spitzer, A. R. Clinical Chemistry and Dried Blood Spots: Increasing Laboratory Utilization by Improved Understanding of Quantitative Challenges. *Bioanalysis* **6**, 2791–2794 (2014).
250. Metherel, A. H., Hogg, R. C., Buzikievich, L. M. & Stark, K. D. Butylated hydroxytoluene can protect polyunsaturated fatty acids in dried blood spots from degradation for up to 8 weeks at room temperature. *Lipids Health Dis* **12**, 22 (2013).

251. Merad, M. & Martin, J. C. Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages. *Nat Rev Immunol* **20**, 355–362 (2020).
252. Rahman, A. H., Tordesillas, L. & Berin, M. C. Heparin Reduces Nonspecific Eosinophil Staining Artifacts in Mass Cytometry Experiments. *Cytometry A* **89**, 601–607 (2016).
253. Miller, T. E. *et al.* Clinical sensitivity and interpretation of PCR and serological COVID-19 diagnostics for patients presenting to the hospital. *FASEB J* **34**, 13877–13884 (2020).
254. Stuckrad, S. L. von *et al.* SIGLEC1 (CD169) is a sensitive biomarker for the deterioration of the clinical course in childhood systemic lupus erythematosus. *Lupus* **29**, 1914–1925 (2020).
255. Bogie, J. F. *et al.* CD169 is a marker for highly pathogenic phagocytes in multiple sclerosis. *Mult Scler* **24**, 290–300 (2018).
256. He, Z., Liu, J., Shu, G., Ma, S. & Wu, G. Diagnostic Utility of CD64 and CD38 Biomarkers for the Differential Diagnosis of Infections. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers* (2022) doi:10.1089/gtmb.2021.0269.
257. Samprathi, M. & Jayashree, M. Biomarkers in COVID-19: An Up-To-Date Review. *Frontiers in Pediatrics* **8**, (2021).
258. Ji, P. *et al.* Association of elevated inflammatory markers and severe COVID-19: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* **99**, e23315 (2020).
259. Han, H. *et al.* Profiling serum cytokines in COVID-19 patients reveals IL-6 and IL-10 are disease severity predictors. *Emerging Microbes & Infections* **9**, 1123–1130 (2020).
260. Du, R.-H. *et al.* Predictors of mortality for patients with COVID-19 pneumonia caused by SARS-CoV-2: a prospective cohort study. *Eur Respir J* **55**, 2000524 (2020).
261. Spinetti, T. *et al.* Reduced Monocytic Human Leukocyte Antigen-DR Expression Indicates Immunosuppression in Critically Ill COVID-19 Patients. *Anesth Analg* **131**, 993–999 (2020).
262. Sialoadhesin in recognition of self and non-self - PubMed.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22450957/>.

263. Subcapsular sinus macrophages limit acute gammaherpesvirus dissemination | Microbiology Society. <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/vir.0.000140>.
264. McKechnie, J. L. & Blish, C. A. The Innate Immune System: Fighting on the Front Lines or Fanning the Flames of COVID-19? *Cell Host & Microbe* **27**, 863–869 (2020).
265. Immunology of COVID-19: Current State of the Science: Immunity. [https://www.cell.com/immunity/fulltext/S1074-7613\(20\)30183-7?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1074761320301837%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/immunity/fulltext/S1074-7613(20)30183-7?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1074761320301837%3Fshowall%3Dtrue).
266. Perez-Zsolt, D. *et al.* Anti-Siglec-1 antibodies block Ebola viral uptake and decrease cytoplasmic viral entry. *Nat Microbiol* **4**, 1558–1570 (2019).
267. Ortilon, M. *et al.* Monocyte CD169 expression in COVID-19 patients upon intensive care unit admission. *Cytometry Part A* **99**, 466–471 (2021).
268. Bedin, A.-S. *et al.* Monocyte CD169 Expression as a Biomarker in the Early Diagnosis of Coronavirus Disease 2019. *The Journal of Infectious Diseases* (2020) doi:10.1093/infdis/jiaa724.
269. Comins-Boo, A. *et al.* Validation of a Quick Flow Cytometry-Based Assay for Acute Infection Based on CD64 and CD169 Expression. New Tools for Early Diagnosis in COVID-19 Pandemic. *Front Med (Lausanne)* **8**, 655785 (2021).
270. Martinez, F. O., Combes, T. W., Orsenigo, F. & Gordon, S. Monocyte activation in systemic Covid-19 infection: Assay and rationale. *EBioMedicine* **59**, 102964 (2020).
271. Di Micco, P. *et al.* Prognostic Value of Fibrinogen among COVID-19 Patients Admitted to an Emergency Department: An Italian Cohort Study. *J Clin Med* **9**, E4134 (2020).
272. Barlass, U. *et al.* Marked Elevation of Lipase in COVID-19 Disease: A Cohort Study. *Clin Transl Gastroenterol* **11**, e00215 (2020).
273. Kulkarni, A. V. *et al.* Systematic review with meta-analysis: liver manifestations and outcomes in COVID-19. *Aliment Pharmacol Ther* **52**, 584–599 (2020).

274. Leijte, G. P. *et al.* Monocytic HLA-DR expression kinetics in septic shock patients with different pathogens, sites of infection and adverse outcomes. *Crit Care* **24**, 110 (2020).
275. Buetti, N. *et al.* SARS-CoV-2 detection in the lower respiratory tract of invasively ventilated ARDS patients. *Crit Care* **24**, 610 (2020).
276. Rouzé, A. *et al.* Relationship between SARS-CoV-2 infection and the incidence of ventilator-associated lower respiratory tract infections: a European multicenter cohort study. *Intensive Care Med* **47**, 188–198 (2021).
277. Buetti, N. *et al.* COVID-19 increased the risk of ICU-acquired bloodstream infections: a case-cohort study from the multicentric OUTCOMEREA network. *Intensive Care Med* **47**, 180–187 (2021).
278. Bange, E. M. *et al.* CD8+ T cells contribute to survival in patients with COVID-19 and hematologic cancer. *Nat Med* **27**, 1280–1289 (2021).
279. Rha, M.-S. & Shin, E.-C. Activation or exhaustion of CD8+ T cells in patients with COVID-19. *Cell Mol Immunol* 1–9 (2021) doi:10.1038/s41423-021-00750-4.
280. Balestrieri, E. *et al.* Evidence of the pathogenic HERV-W envelope expression in T lymphocytes in association with the respiratory outcome of COVID-19 patients. *eBioMedicine* **66**, (2021).
281. Chamoto, K., Al-Habsi, M. & Honjo, T. Role of PD-1 in Immunity and Diseases. *Curr Top Microbiol Immunol* **410**, 75–97 (2017).
282. The Novel Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Directly Decimates Human Spleens and Lymph Nodes | medRxiv.
<https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.03.27.20045427v1>.
283. De Biasi, S. *et al.* Expansion of plasmablasts and loss of memory B cells in peripheral blood from COVID-19 patients with pneumonia. *Eur J Immunol* **50**, 1283–1294 (2020).
284. Sosa-Hernández, V. A. *et al.* B Cell Subsets as Severity-Associated Signatures in COVID-19 Patients. *Frontiers in Immunology* **11**, (2020).

285. Crocker, P. R., Jefferies, W. A., Clark, S. J., Chung, L. P. & Gordon, S. Species heterogeneity in macrophage expression of the CD4 antigen. *Journal of Experimental Medicine* **166**, 613–618 (1987).
286. Lynch, G. W. *et al.* Marked differences in the structures and protein associations of lymphocyte and monocyte CD4: Resolution of a novel CD4 isoform. *Immunology & Cell Biology* **84**, 154–165 (2006).
287. Zhen, A. *et al.* CD4 Ligation on Human Blood Monocytes Triggers Macrophage Differentiation and Enhances HIV Infection. *J Virol* **88**, 9934–9946 (2014).
288. Kazancioglu, S. *et al.* Lymphocyte Subset Alteration and Monocyte CD4 Expression Reduction in Patients with Severe COVID-19. *Viral Immunology* **34**, 342–351 (2021).
289. Beyerstedt, S., Casaro, E. B. & Rangel, É. B. COVID-19: angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) expression and tissue susceptibility to SARS-CoV-2 infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1–15 (2021) doi:10.1007/s10096-020-04138-6.
290. Trojanowicz, B. *et al.* Monocytic angiotensin-converting enzyme 2 relates to atherosclerosis in patients with chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* **32**, 287–298 (2017).
291. Zaki, H. & Khan, S. SARS-CoV2 spike protein induces inflammatory molecules through TLR2 in macrophages and monocytes. *The Journal of Immunology* **206**, 62.07-62.07 (2021).
292. Zhao, Y. *et al.* SARS-CoV-2 spike protein interacts with and activates TLR41. *Cell Res* **31**, 818–820 (2021).
293. van den Berg, T. K. *et al.* Cutting edge: CD43 functions as a T cell counterreceptor for the macrophage adhesion receptor sialoadhesin (Siglec-1). *J Immunol* **166**, 3637–3640 (2001).
294. Klinger, A. *et al.* Cyclical expression of L-selectin (CD62L) by recirculating T cells. *International Immunology* **21**, 443–455 (2009).
295. Bingaman, A. W. *et al.* Novel phenotypes and migratory properties distinguish memory CD4 T cell subsets in lymphoid and lung tissue. *Eur J Immunol* **35**, 3173–3186 (2005).

296. Nagata, K. & Hirai, H. The second PGD2 receptor CRTH2: structure, properties, and functions in leukocytes. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **69**, 169–177 (2003).
297. Pettipher, R. The roles of the prostaglandin D2 receptors DP1 and CRTH2 in promoting allergic responses. *Br J Pharmacol* **153**, S191–S199 (2008).
298. Vitte, J. *et al.* A Granulocytic Signature Identifies COVID-19 and Its Severity. *J Infect Dis* **222**, 1985–1996 (2020).

Remerciements

Le travail présenté dans cette thèse a pu être réalisé grâce à la contribution et au soutien de nombreuses personnes.

Je tiens tout d'abord à remercier mon superviseur en entreprise, le Dr Fabrice MALERGUE pour m'avoir encadré tout au long de cette longue aventure qu'est le doctorat. Cher Fabrice, je te serai à jamais reconnaissante de m'avoir fait confiance. Ton expertise en cytométrie en flux et ton humanité exceptionnelle m'ont éclairé tout au long de ces trois années. Merci pour ta disponibilité, tes précieux conseils, ta compréhension et ton soutien infaillible, qui ont été fondamentaux pour l'aboutissement de la thèse.

Je tiens tout autant à remercier le Dr Jean-Marc BUSNEL pour m'avoir accueilli dans son équipe. Cher Jean-Marc, c'était, et ça restera, un privilège de t'avoir comme chef d'équipe. Tu as toujours su nous guider tout en ayant un regard critique sur nos travaux. Merci aussi pour ta confiance et tes encouragements qui nous aident chaque jour à avancer.

Je souhaite aussi remercier chaleureusement mon directeur de thèse, le Pr. Franck GALLAND, qui m'a accordé sa confiance et son soutien. Son savoir et son partage de ses connaissances en immunologie m'ont été précieux dans la conduite de ma thèse.

Un grand merci à nos collaborateurs du Centre d'immunologie de Marseille-Luminy, Sandrine ROULLAND et Noushine MOSSADEGH-KELLER pour avoir mis en notre disposition la plateforme de trie cellulaire. Je remercie également les collaborateurs qui nous ont permis d'avoir accès aux échantillons biologiques et aux données cliniques, qui ont directement ou indirectement participé au design, à l'analyse ou à l'interprétation des résultats : Isabelle ARNOUX, Marie LOOSVELD, Pierre-emmanuel MORANGE, Thibaut MARKARIAN, Pierre MICHELET, Jean-Louis MEGE, Jérôme ALLARDET-SERVENT, Moïse, MICHEL, Joana VITTE, Antonella MINUTOLO, Claudia MATTEUCCI.

Je souhaite exprimer ma gratitude aux membres du jury de thèse, le Pr Edouard TUAILLON et le Pr Guillaume MONNERET pour avoir accepté d'être rapporteurs. Je les remercie pour le temps et l'énergie qu'ils ont consacré à l'évaluation de mon manuscrit. Je tiens tout autant à remercier les autres membres du jury, le Dr Elena TOMASLLLO, le Dr Emilie MAMESSIER, et le Dr Jérôme ALLARDET-SERVENT pour avoir accepté d'être examinateurs ainsi que le Pr Sylvain LEHMANN pour avoir accepté d'examiner la thèse et de présider le jury. Je souhaite également remercier le Dr Michel AURRAND-LIONS pour avoir fait partie de mon comité de thèse avec Elena et Emilie.

Je tiens à remercier les autres membres de l'équipe « Innovation » à laquelle j'appartiens, Pénélope BOURGOIN, Célia CARTAGENA CARCIA, et Rihane ARIF. Vous, les super-nanas, êtes pour moi d'un soutien immensurable, tous les jours. Je vous en suis extrêmement reconnaissante. Une pensée particulière au Dr Andreas VAN AGTHOVEN. Tes connaissances scientifiques et ta bienveillance sont pour moi un modèle. Je ne t'oublierai jamais.

Je tiens également à remercier les membres de l'équipe du Dr Cédric MAURANGE à l'Institut de Biologie du Développement de Marseille, dont notamment Karine, Cassandra et Sophie. Vous avez été les premiers à me faire confiance. Merci de m'avoir donné goût à la recherche et de m'avoir fait prendre confiance en moi. Vous avez été un élément central dans mon cursus et je vous en suis très reconnaissante.



Je ne remercierai jamais assez l'ensemble de l'équipe « Recherche et Développement » de Marseille pour leur bonne humeur et leur sympathie. Merci à tous de faire de ces longues journées de travail des moments si joyeux !

Je pense aussi à tous mes amis d'Alger et de Marseille. Je remercie spécialement Emilie, Philippe, Marie, Margaux, Alexia, Célia, Fabien, Iara, et bien sûr Valentin pour avoir toujours été présents. Vous m'avez apporté l'équilibre et le soutien infaillible qui m'ont aidé à affronter toutes les péripéties de la thèse.

Pour finir, je tiens à remercier ma famille : mes grands-parents, mes oncles, mes tantes et mes cousins pour leur soutien et leurs encouragements. Je tiens tout particulièrement à exprimer ma gratitude à mes parents sans qui je n'aurais pas pu accomplir mon parcours universitaire. Je leur dédie cette thèse, ainsi qu'à ma sœur et à mon frère.

Annexe

Direct freezing of whole blood enables analysis of leucocyte markers by flow cytometry: a proof-of-concept study

Pénélope Bourgoin^{*,1,2} , Inès Ait Belkacem^{1,3}, Isabelle Arnoux⁴, Pierre-Emmanuel Morange^{2,4} & Fabrice Malergue¹ 

¹Department of Research & Development, Beckman Coulter Life Sciences-Immunotech, 130 Avenue de Lattre de Tassigny, Marseille, 13009, France

²C2VN INSERM-INRAE, Aix-Marseille University, 27 Boulevard Jean Moulin, Marseille, 13385, France

³UMR 7280, Marseille-Luminy Immunology Center (CIML), Marseille, 13009, France

⁴Laboratory of Hematology, La Timone Hospital, 264 Rue Saint-Pierre, Marseille, 13385, France

*Author for correspondence: Tel.: +33 618 004 205; pbourgoin01@beckman.com

Aim: A new one-step flow cytometry procedure has been recently demonstrated for identifying subjects with infections, but only for fresh whole blood samples. The goal of this study was to assess its applicability on frozen samples, by proposing a new method to perform the sample freezing directly and easily.

Methods: Fresh blood was tested, then frozen either directly or with dimethylsulfoxide and serum. Common markers of white blood cells as well as infection-related biomarkers were tested. **Results:** All percentages of leucocyte subsets and levels of infection-related biomarkers were significantly correlated between frozen and fresh samples. **Conclusion:** The direct freezing method enables an accurate assessment of common cellular sub-populations and of levels of important infectious biomarkers via flow cytometry.

First draft submitted: 10 February 2021; Accepted for publication: 16 July 2021; Published online: 18 August 2021

Keywords: CD169 • CD64 • flow cytometry • HLA-DR • one-step freezing • whole blood analysis

Flow cytometry is increasingly used by many research fields for its diversity of applications [1]. Recently, a new method was described for performing sample preparation for flow cytometry in only one step [2]: whole blood undergoes gentle red cell lysis and simultaneous staining with antibodies, without any harmful washing step, prior to data acquisition on a flow cytometer. One of the primary benefits of this simple procedure is its application to the measurement of two infection-related biomarkers – CD64 on neutrophils (nCD64) and CD169 on monocytes (mCD169) – in complex environments such as the emergency department [3]. Applying this easy technique to measure both biomarkers can enable rapid triage and proper treatment of infected subjects. However, the procedure has been evaluated only on fresh whole blood samples, raising the question about its suitability for testing infected samples from geographically distant areas (e.g., for multi-center studies), or samples that require testing in large retrospective studies (e.g., biobank samples used for research studies).

An easy solution could be to freeze samples until they can be tested. However, the freezing/thawing procedure consists of several steps, and dimethylsulfoxide (DMSO) is often used as a cryoprotectant. A high concentration of DMSO is toxic to human leucocytes, and can thus affect functional and phenotypic properties of measured cells [4]. Despite similar sample preparation issues, testing of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) could be an option, because many studies have demonstrated that PBMC extracted from whole blood samples, frozen and thawed for later analyses, provide good cellular viability and recovery after thawing [5]. However, using cryopreserved PBMC is not a method of choice for later assessment of infection-related biomarkers, because they are devoid of neutrophils and thus unable to provide data on nCD64 levels.

In this study, the aim was to propose a direct method of whole blood freezing, free of complex or toxic preparation issues. The main hypothesis was that direct whole blood freezing could enable delayed sample testing with the

new one-step flow cytometry method, because the procedure is rapid and devoid of stressful and time-consuming washing steps.

Materials & methods

One-step flow cytometry fresh evaluation

For the evaluation at Immunotech (Marseille, France), EDTA blood samples from 5 then 31 volunteers from the La Timone Hospital (Marseille, France) were, upon informed consent, freshly tested according to the new one-step flow cytometry method [2]: 5 μ l of blood was stained and incubated in the dark for 15 min at room temperature, with 500 μ l of Versalyse lysing solution and either (1) a liquid antibody cocktail of anti-CD45-Phycoerythrin-Cyanin 7 (PC7) (clone J33) and 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) viability dye, or (2) a dried antibody cocktail of common antigens that are anti-CD3-Allophycocyanin (APC) (clone UCHT1), anti-CD4-Pacific Blue (PBE) (clone 13B8.2), anti-CD8-Phycoerythrin (PE) (clone B9.11), anti-CD14-Krome Orange (KRO) (clone RMO52) and anti-CD15-Fluorescein Isothiocyanate (FITC) (clone 80H5), or (3) a dried mix of infection-related biomarkers that are anti-CD169-PE (clone 7-239), anti-human leucocyte antigen (HLA)-DR-APC (clone Immu 357) and anti-CD64-PBE (clone 22).

All reagents were products or custom research products from Beckman Coulter Inc. (CA, USA). The drying process was the DURA Innovations technology from Beckman Coulter Inc., used to reduce sources of human error and variability [6,7]. This observational study was approved by the La Timone Hospital Ethical Committee and the Committee for Protection of Persons (CPP approval no. 181160; ID-RCB approval no. 2018 A02706-49; ClinicalTrials.gov identifier NCT03912870). Procedures followed were in accordance with the Helsinki declaration.

Comparison between DMSO & direct freezing methods

For the DMSO freezing procedure used for comparison, part of the whole blood from the 36 volunteers was supplemented in a 1:1 ratio with 20% DMSO (Sigma Aldrich, MO, USA) and 80% fetal bovine serum (FBS) (Stem Cell Technologies, BC, Canada). After mixing, samples were directly placed at -20°C for at least 24 h without using a cryo-freezing container.

In the direct freezing procedure, the other part of the same samples was directly placed at -20°C for at least 24 h.

Samples were stored for up to 2 weeks. Both types of frozen samples were then simultaneously placed between 18° and 25°C for an average of 2 min. As soon as the frozen samples were partially thawed (with ice still visible), samples were tested according to the one-step flow cytometry procedure. The only difference was that 10 μ l of DMSO-frozen/thawed samples were treated, compared with only 5 μ l of directly frozen/thawed samples, in order to ensure analysis of an equivalent number of cells.

Flow cytometry acquisition & data analysis

A minimum of 10,000 events were collected without any compensations on a three-laser, ten-color Navios flow cytometer from Beckman Coulter Inc. Unstained cells were used to set the parameters of the flow cytometer, such that the lymphocyte geometric mean of fluorescence intensity (MFI) was around 0.3 in each channel. Flow-set beads (Beckman Coulter Inc.) were used before each test to control for potential variability in device performance, but no harmonization between the measured values over the study period was necessary.

Analysis was done using Kaluza Analysis Software version 2.1 (Beckman Coulter Inc.). Compensations between channels were set using samples labeled with conjugated antibody alone to remove residual spectral overlap. An unlabeled sample containing large numbers of dead cells, which were stained with 7-AAD was used to compensate 7-AAD fluorescence entering other channels.

For the first antibody cocktail, leucocytes were first gated on the basis of their typical forward- and side-scatter characteristics, avoiding debris, and then on their CD45 positive expression. Leucocyte 7-AAD negative expression on fresh samples was used to set threshold to discriminate between viable (7-AAD-) and dead (7-AAD+) events.

For both other antibody cocktails, lymphocytes, monocytes and neutrophils were first gated on the basis of their typical forward- and side-scatter characteristics. The proportions and expression levels of CD3, CD4, CD8 on lymphocytes (lCD3, lCD4, lCD8 respectively), of CD14, CD169, HLA-DR on monocytes (mCD14, mCD169, mHLA-DR, respectively) and of CD15, CD64 on neutrophils (nCD15, nCD64, respectively) were determined as percentages and geometric MFI, respectively. Unstained cells were used to set threshold for each marker to discriminate between negative and positive events.

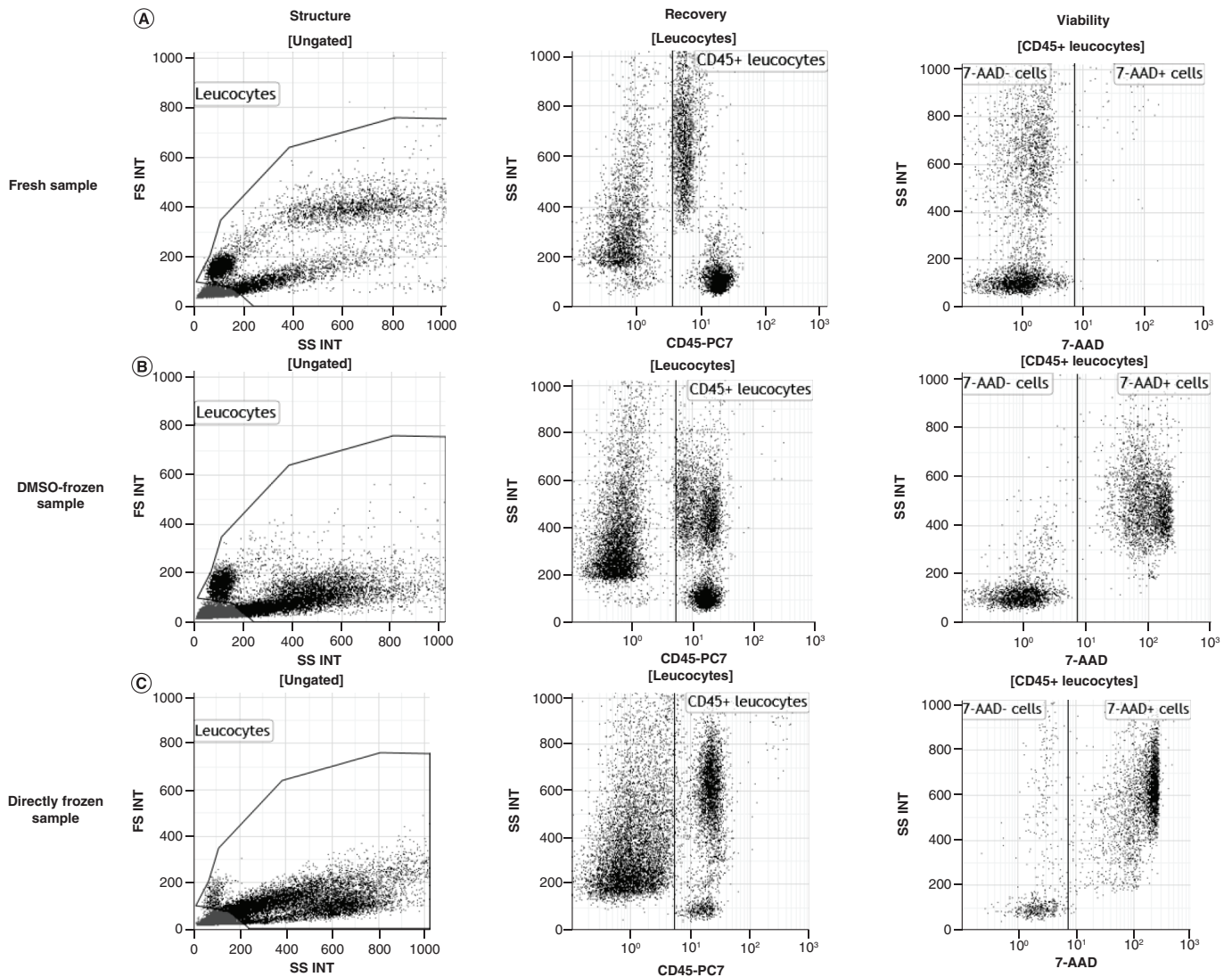


Figure 1. Structure, recovery and viability of cells. Plots representing forward (FS INT) and side (SS INT) scatter characteristics, CD45 positive (CD45⁺) expression on leucocytes, and 7-Aminoactinomycin D negative (7-AAD⁻) and positive (7-AAD⁺) expressions on CD45⁺ leucocytes, on one whole blood sample that was either (A) fresh, (B) frozen with DMSO or (C) directly frozen. FS INT: Forward scatter characteristics; SS INT: Side scatter characteristics.

Comparisons of quantitative variables were performed using an ANOVA test. Correlations between methods were evaluated using the Pearson's correlation coefficient. The Bland–Altman approach was used to assess the agreement between methods. The statistical analyses were performed using Jump software version 10 (SAS Institute Inc., NC, USA). All p-values were considered statistically significant under 0.05.

Results

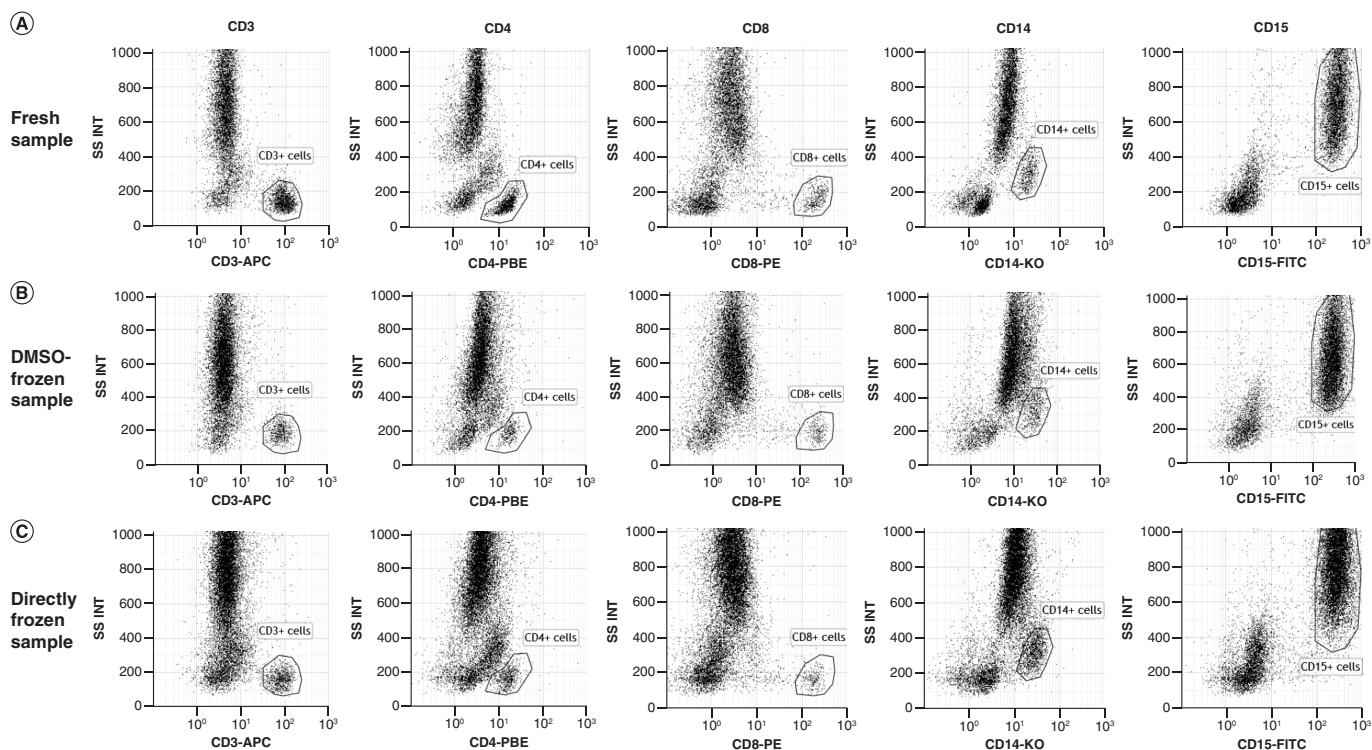
Recovery and viability of leucocytes were compared between fresh, DMSO-frozen and directly frozen samples (Figure 1). Results showed that recovery is unaffected by freezing ($p = 0.7904$), but that, as expected, viability is strongly decreased ($p < 0.001$; Table 1). DMSO allows a better viability (36%) than direct freezing (13%), still the majority of cells are permeabilized in both cases.

This result not only questioned the need for this cryoprotectant in simple staining applications, but also pointed out that leucocyte subsets were not equally permeabilized upon freezing, thus distinguishing dead and viable cells may have strongly affected cell proportions (Supplementary Table 1). Therefore, cell markers and proportions were analyzed among all the recovered cells.

Table 1. Cellular recovery and viability after freezing.

Characteristics	Fresh sample	DMSO-frozen sample	Directly frozen sample	p-value
Mean CD45 ⁺ cells count	3987	4416	3884	0.7904
Standard deviation	± 1357	± 1312	± 1188	
CI	[2303; 5672]	[2787; 6044]	[2409; 5359]	
Recovery (%)	100	111	97	
Mean 7-AAD ⁺ cells proportion	4.2%	63.8%	86.9%	p < 0.001[†]
Standard deviation	± 1.5%	± 7.0%	± 5.5%	
CI	[2.4; 6.1]	[55.1; 72.6]	[80.1; 93.8]	
Viability (%)	95.8	36.2	13.1	

Counts of CD45-positive (CD45⁺) cells and proportions of 7-Aminoactinomycin D positive (7-AAD⁺) leucocytes were evaluated in whole blood samples from five donors, tested either fresh, or frozen with DMSO, or directly frozen. Results are expressed as means ± standard deviations, with CIs. Recovery (CD45⁺ cell count in frozen sample divided by CD45⁺ cell count in fresh sample) and viability (100 minus 7-AAD⁺ leucocyte proportion) have been calculated. Comparison was made using an ANOVA test. [†]p-value was considered statistically significant under 0.05 (in bold). DMSO: Dimethylsulfoxide.

**Figure 2. Analysis of common markers.** Plots representing CD3, CD4, CD8, CD14 and CD15 expression on leucocytes are compared on one whole blood sample that was either (A) fresh, (B) frozen with dimethylsulfoxide or (C) directly frozen.

Proportions of different leucocyte subsets were compared between fresh, DMSO-frozen and directly frozen samples: CD3⁺ lymphocytes, CD3⁺ CD4⁺ lymphocytes, CD3⁺ CD8⁺ lymphocytes, CD14⁺ monocytes and CD15⁺ neutrophils. Examples of plots representing those subsets within the different samples are shown in Figure 2.

Pearson correlation coefficients for the percentages of all these leucocyte subsets, between fresh and DMSO-frozen samples and between fresh and directly frozen samples, were all >0.9 (Figure 3).

As a consequence, Pearson correlation coefficients for the percentages of all these leucocyte subsets, between DMSO and directly frozen samples, were also all >0.9 (Supplementary Figure 1).

Therefore, Pearson results indicate that percentages of common leucocyte subsets obtained in both kinds of frozen samples are strongly correlated to those obtained in fresh samples. Bland–Altman bias plots were constructed to assess the agreement between percentages provided by frozen techniques versus measurement of fresh samples (Figure 4).

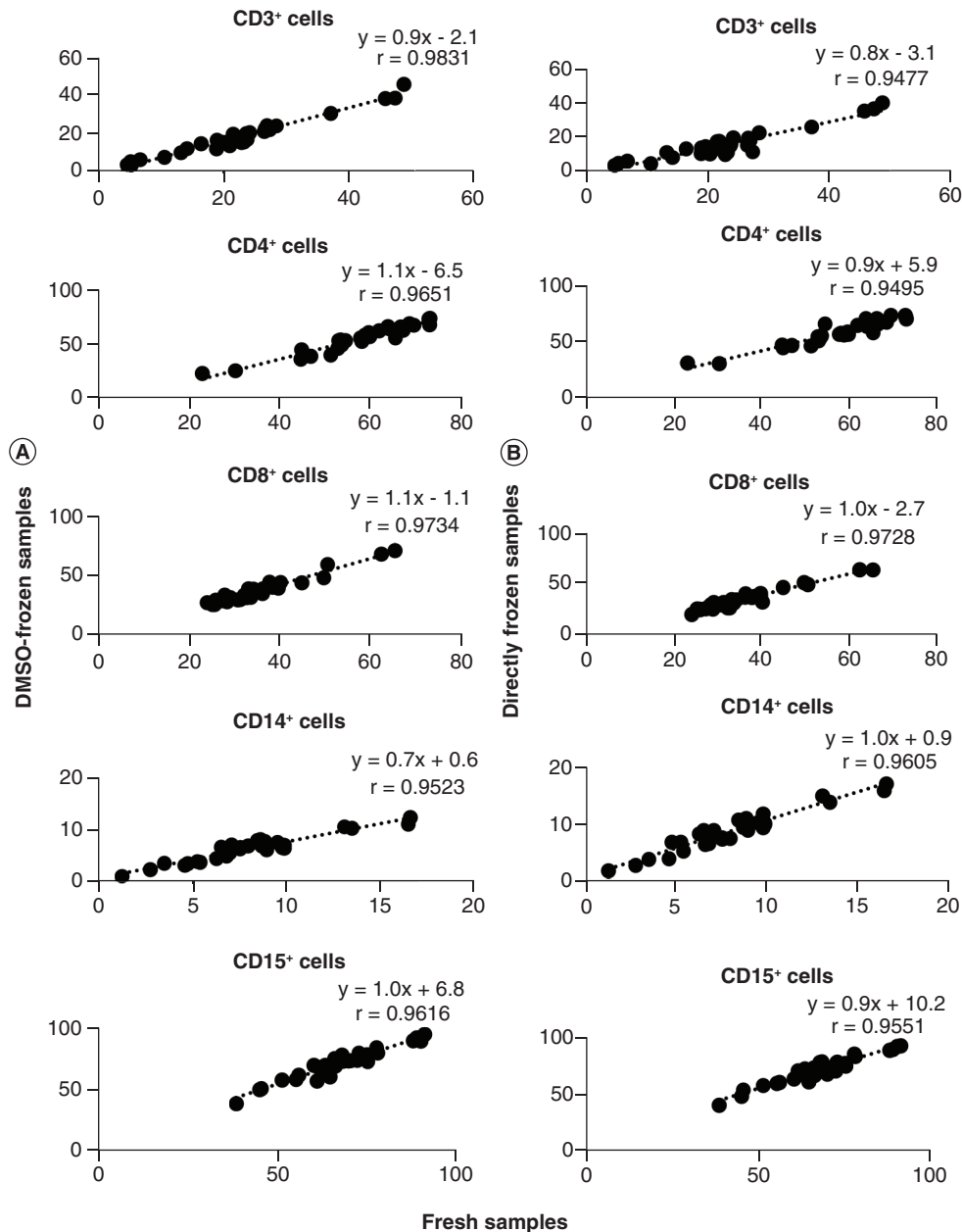


Figure 3. Percentages of common markers. Percentages of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD14⁺ and CD15⁺ cellular subsets were compared between (A) fresh and dimethylsulfoxide-frozen blood samples, and (B) fresh and directly frozen blood samples. A total of 31 samples were evaluated. Correlations were represented by the line equation and Pearson r value; 95% CIs are provided in brackets.

Table 2 shows the details of Bland–Altman parameters, including bias values, bias standard deviations and limits of agreement.

Supplementary Figure 2 & Supplementary Table 2 give Bland–Altman bias plots and parameters, respectively, for the agreement between percentages given by the DMSO-freezing technique and direct freezing technique. Therefore, Bland–Altman results indicate that percentages of common leucocyte subsets seem to have some systematic bias when measured between both kinds of frozen samples and fresh samples. However, methods maintain good agreements because percentages are always given with a bias $\leq 5\%$, except CD3, for which bias was around 7%, and very few outliers were detected.

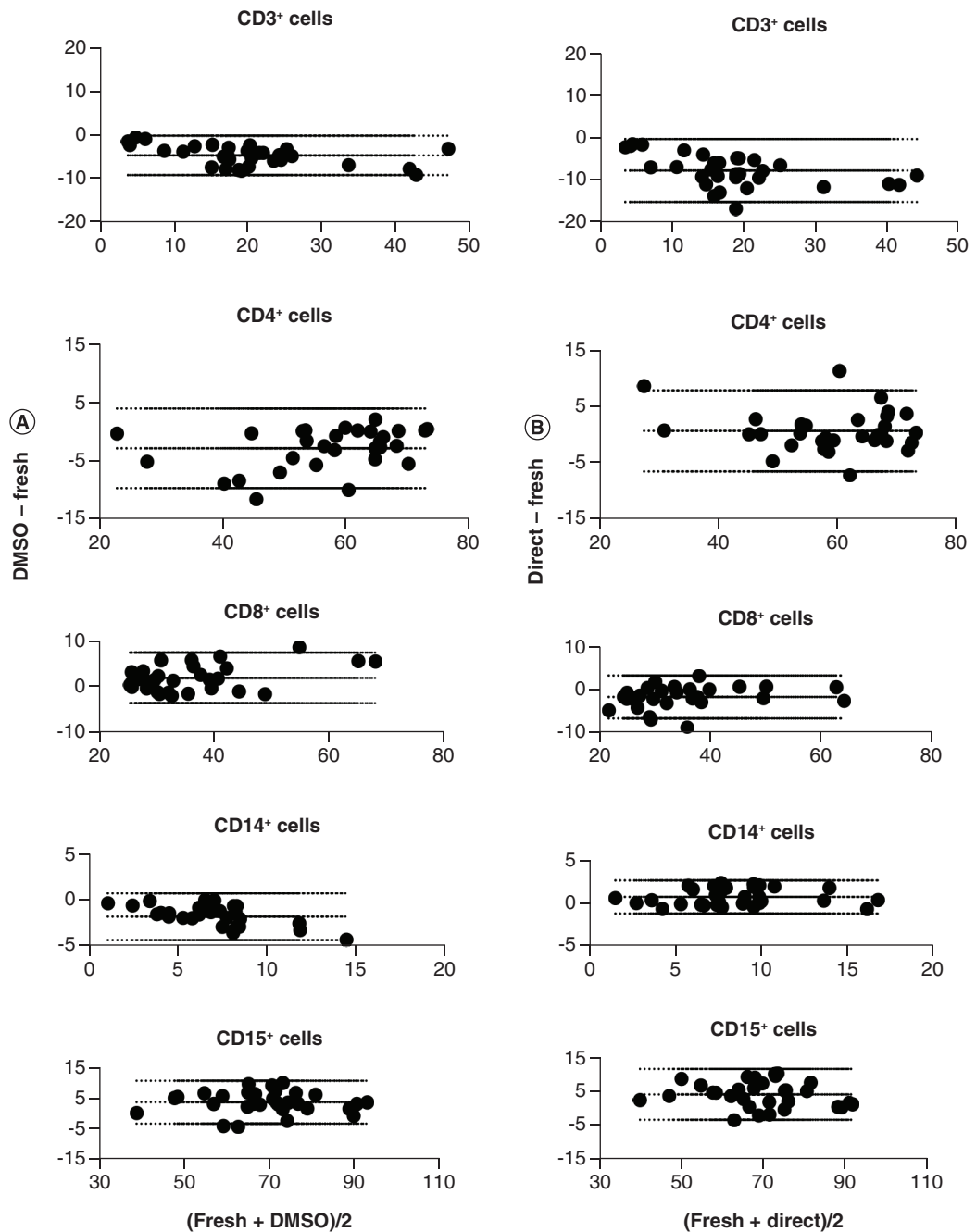


Figure 4. Bland–Altman plots for agreement of common markers. Bland–Altman plots were constructed by plotting the differences between the percentages of cells from (A) fresh versus DMSO-frozen samples, or (B) fresh versus directly frozen samples, against the mean percentage values of the two methods. Percentages analyzed are those of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD14⁺ and CD15⁺ cellular subsets. A total of 31 samples were evaluated. Middle dot line represents the mean bias value. Upper and lower dot lines represent 95% CIs of upper and lower limits of agreement, respectively.

The potential role of background staining was assessed in Supplementary Figure 3. As expected, the non-specific staining slightly increased on the negative populations (lymphocytes, or monocytes or neutrophils when applicable). Since the specific staining remained equivalent in the various conditions, a measure of the signal to noise would of course be slightly decreased.

Table 2. Bland–Altman parameters for agreement of common markers.

Parameters	Mean bias	Standard deviation of bias	95% Limits of agreement
Agreement between fresh and DMSO-frozen samples			
CD3 ⁺ cells	-4.81	2.28	[-9.28; -0.34]
CD4 ⁺ cells	-2.91	3.45	[-9.67; 3.85]
CD8 ⁺ cells	1.9	2.8	[-3.59; 7.4]
CD14 ⁺ cells	-1.81	1.3	[-4.36; 0.73]
CD15 ⁺ cells	3.65	3.53	[-3.27; 10.58]
Agreement between fresh and directly frozen samples			
CD3 ⁺ cells	-7.92	3.8	[-15.39; -0.46]
CD4 ⁺ cells	0.69	3.67	[-6.51; 7.89]
CD8 ⁺ cells	-1.72	2.55	[-6.73; 3.27]
CD14 ⁺ cells	0.7	0.98	[-1.22; 2.64]
CD15 ⁺ cells	4.09	3.79	[-3.33; 11.52]

Bland–Altman parameters, including mean bias, standard deviation of bias and 95% limits of agreement, were given for comparing percentages between (a) fresh and DMSO-frozen samples, or (b) fresh and directly frozen samples. Percentages analyzed are those of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD14⁺ and CD15⁺ cellular subsets. A total of 31 samples were evaluated.

Table 3. Bland–Altman parameters for agreement of infection-related markers.

Parameters	Mean bias	Standard deviation of bias	95% Limits of agreement
Agreement between fresh and DMSO-frozen samples			
mCD169 MFI	1.75	0.46	[0.84; 2.67]
nCD64 MFI	3.86	1.79	[0.33; 7.38]
mHLA-DR MFI	-15.53	17.5	[-49.84; 18.77]
Agreement between fresh and directly frozen samples			
mCD169 MFI	3.47	1.07	[1.37; 5.57]
nCD64 MFI	3.03	1.62	[-0.15; 6.22]
mHLA-DR MFI	-15.13	20.65	[-55.61; 25.35]

Bland–Altman parameters, including mean bias, standard deviation of bias and 95% limits of agreement, were given for comparing the levels of expression between (a) fresh and DMSO-frozen samples, or (b) fresh and directly frozen samples. Mean fluorescence intensities (MFI) analyzed are those of CD169 on monocytes (mCD169), of CD64 on neutrophils (nCD64), and of HLA-DR on monocytes (mHLA-DR). A total of 31 samples were evaluated.
DMSO: Dimethylsulfoxide.

The comparison between fresh and both kinds of frozen samples was finally made by assessing the levels of expression of CD169 on monocytes (mCD169), of CD64 on neutrophils (nCD64) and of HLA-DR on monocytes (mHLA-DR) in the same 31 samples. Examples of plots representing those biomarkers in the different samples are shown in Figure 5.

Pearson correlation coefficients for the levels of expression of these biomarkers, between fresh and DMSO-frozen samples, and between fresh and directly frozen samples, were all >0.9 (Figure 6).

As a consequence, Pearson correlation coefficients for the levels of expression of these biomarkers between DMSO and directly frozen samples were also all >0.9 (Supplementary Figure 4).

Therefore, Pearson results indicate that levels of expression of infection-related biomarkers obtained in both kinds of frozen samples are strongly correlated to those obtained in fresh samples. Bland–Altman bias plots were constructed to assess the agreement between levels of expression given by frozen techniques versus measurement of fresh samples (Figure 7). Table 3 shows the details of Bland–Altman parameters, including bias values, bias standard deviations and limits of agreement.

Supplementary Figure 5 & Supplementary Table 3 give Bland–Altman bias plots and parameters, respectively, for the agreement between levels of expression given by the DMSO freezing technique and a direct freezing technique.

Therefore, Bland–Altman results indicate that levels of expression of infection-related biomarkers seem to have, as did previously analyzed percentages, some systematic bias when measured between both kinds of frozen samples and fresh samples. However, methods maintain good agreements for mCD169 and nCD64 because their expression levels are always given with an MFI bias ≤ 5 . For HLA-DR, there is less agreement between methods because MFI is given with a mean bias that exceeds 15.

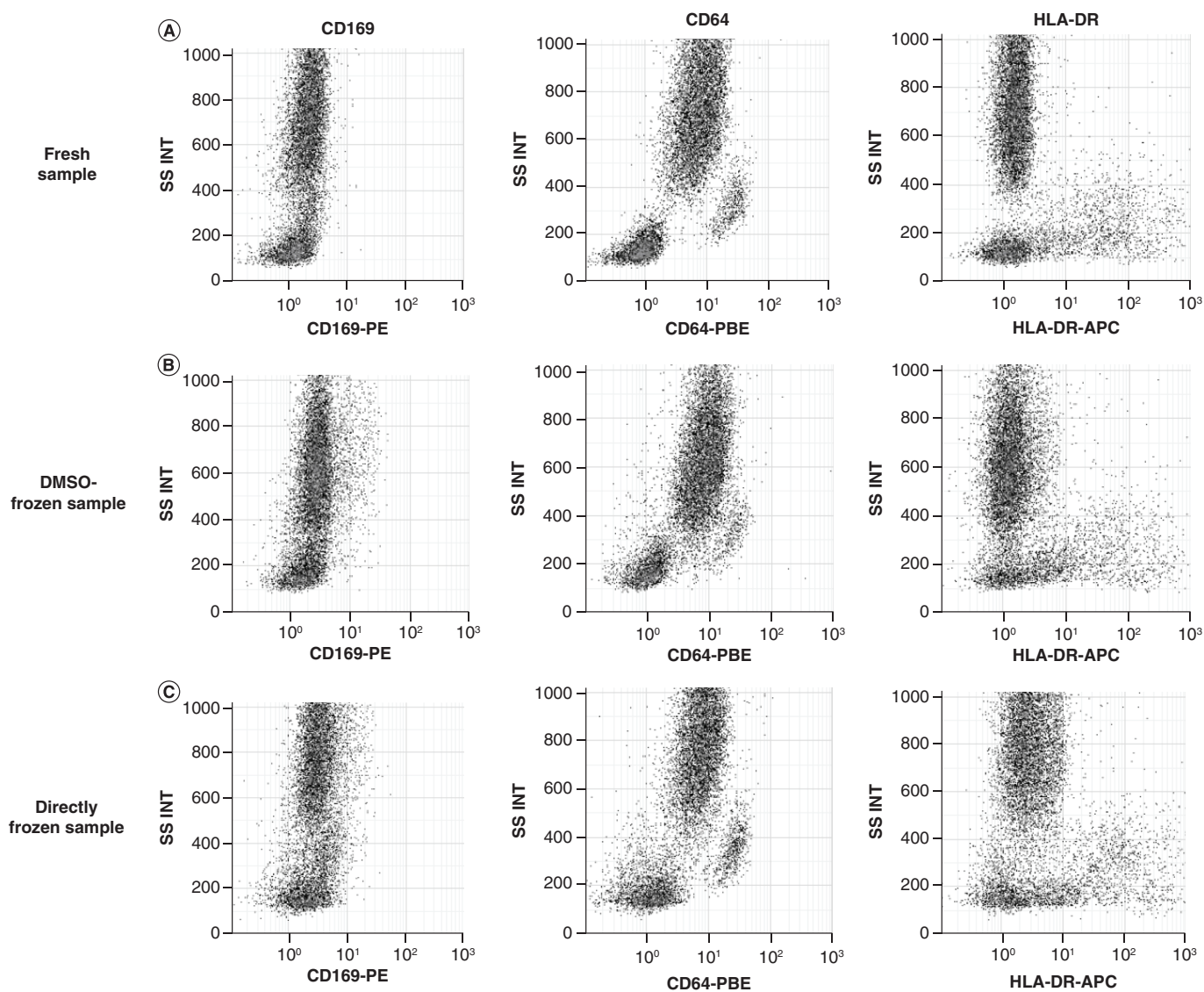


Figure 5. Analysis of infection-related markers. Plots representing CD169, CD64 and HLA-DR expressions on leucocytes are compared on one whole blood sample that was either (A) fresh, (B) DMSO frozen (SVF-DMSO) or (C) directly frozen (total freezing).

Discussion

This study reports on the direct freezing of whole blood, without adjuvants, combined with an optimized one-step flow cytometry procedure [2]. The aim of the study was to achieve a simpler and faster preparation for frozen samples, which may help to democratize testing by flow cytometry even when samples are delocalized or from biobanks (e.g., for use in multi-center or large research studies).

Some authors have already demonstrated the benefit of using frozen specimens, and have tried to optimize freezing procedures, proposing, for instance, to use DMSO and controlled-freezing containers, but requiring pipetting and trained technicians [8]. This kind of procedure was used in the study as a comparative method for what is best achieved currently in terms of freezing techniques. We observed that recovery was not affected by freezing, and that DMSO only partially improved cell viability. Therefore, we considered DMSO was useless for simple immunophenotyping applications, not requiring cell activation or proliferation. The technique assessed here enabled freezing whole blood samples in their entirety, directly and without additional adjuvants or preparation steps. This method offers the possibility of freezing samples in a -20°C freezer without serum isolation or reagents that must be pipetted into sample tubes.

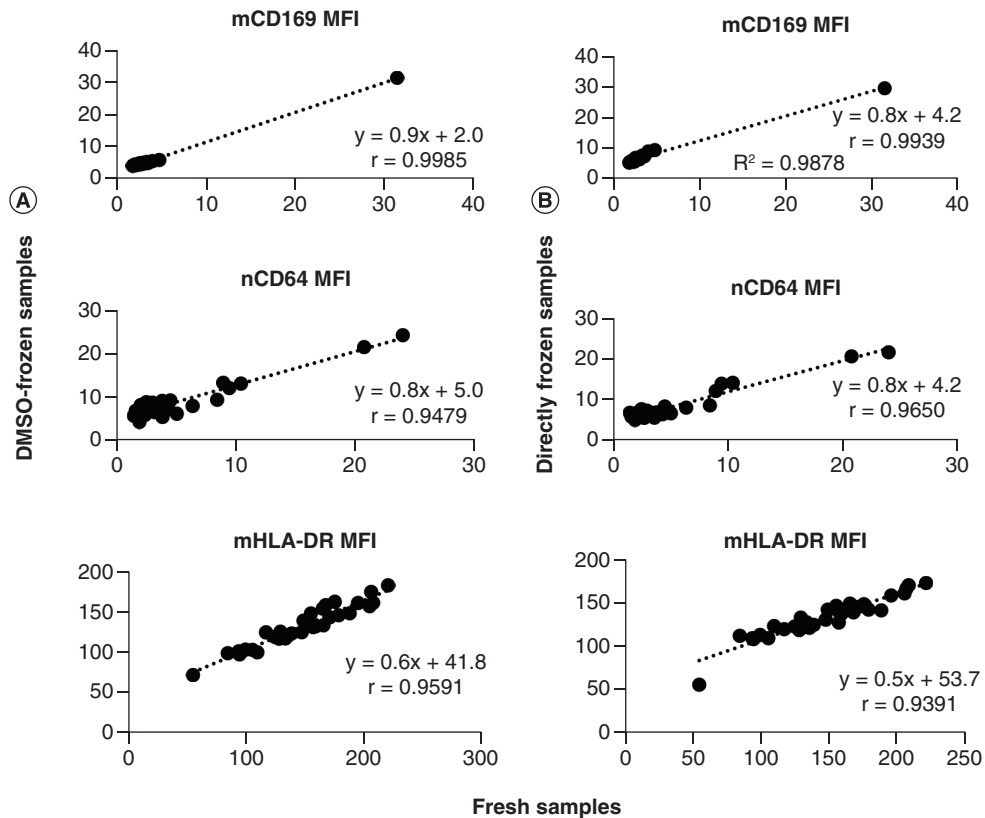


Figure 6. Expressions of infection-related markers. Mean fluorescence intensity (MFI) of CD169 on monocytes (mCD169), of CD64 on neutrophils (nCD64) and of HLA-DR on monocytes (mHLA-DR), were compared between (A) fresh and DMSO-frozen blood samples, and (B) between fresh and one-step frozen blood samples. A total of 31 samples were evaluated. Correlations were represented by the line equation and Pearson r value; 95% CIs are provided in brackets.

It could be pointed out that this method might impact cell integrity. Indeed, when samples are thawed, blood cells are mostly permeabilized because of the lack of protective adjuvants. That is why a short time (2 min) for thawing is recommended and necessary, so as not to amplify the proportion of cellular debris. In contrast, we tried to thaw cells at 37°C, but we did not see any improvement (data not shown).

However, this does not impact cellular biology, as results show that cellular proportions and biomarker expression levels in frozen samples are close to those of fresh samples. Verschoor and his team, for instance, had previously shown that frozen blood was comparable to fresh blood for the enumeration of major leucocyte cell types [9], and particularly extended these observations to distinct subsets of monocytes, T cells and NK cells [8]. They even suggested that “[frozen] peripheral blood be given greater consideration for studies in which the quantification of distinct leucocyte subsets is required,” with regard to expression and enumeration of cell-surface receptors.

Good correlations were observed between the percentages of common leucocyte subsets gated as positive by the direct freezing method, when compared with the DMSO-freezing procedure or the fresh measurement. No major bias was observed between techniques. The slightly lower percentage of lymphocytes, associated with a slightly higher percentage of neutrophils, could be explained by higher lymphocyte fragility, or by more debris contaminating the neutrophil gate. If a precise quantification of these cell percentages is required for future studies, it could be helpful to add CD45 as a gating marker. However, a viability marker such as 7-AAD or propidium iodide appears unnecessary, since it would introduce a bias in cell proportions.

The direct freezing method was evaluated with three biomarkers used for disease diagnosis, for which levels need to be precisely assessed in whole blood samples for indicating the etiology of the infection [3]: CD169 is increased on monocytes in the course of a viral infection [10], nCD64 level increases in subjects in septic conditions or acute bacterial infections [11], and diminished mHLA-DR is a reliable indicator of immunosuppression [12,13].

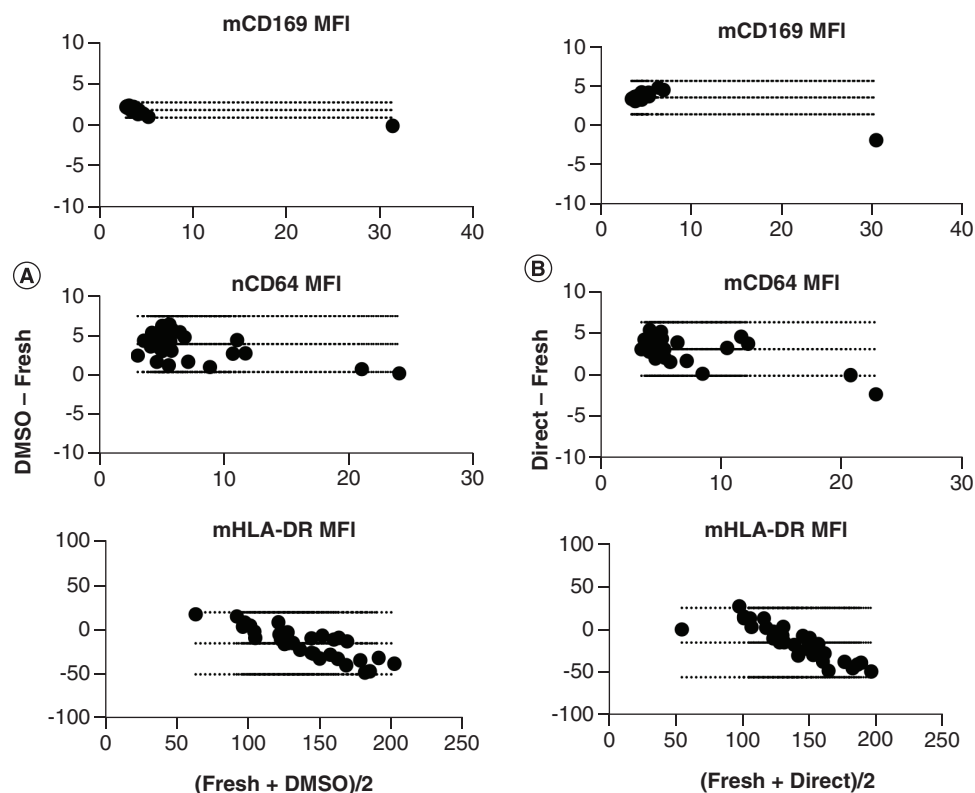


Figure 7. Bland–Altman plots for agreement of infection-related markers. Bland–Altman plots were constructed by plotting the differences between the levels of expression from (A) fresh or DMSO-frozen samples, or (B) fresh or directly frozen samples, against the mean expression values of the two methods. Mean fluorescence intensities (MFI) analyzed are those of CD169 on monocytes (mCD169), of CD64 on neutrophils (nCD64), and of HLA-DR on monocytes (mHLA-DR). A total of 31 samples were evaluated. Middle dot line represents the mean bias value. Upper and lower dot lines represent 95% CIs of upper and lower limits of agreement, respectively.

The current study demonstrated that levels of expression of mCD169 and nCD64 could be assessed in both kinds of frozen samples, as they demonstrated excellent correlation with fresh samples. A bias was detected for each of them, suggesting that a corrective factor could be applied based on whether they are measured from frozen or fresh samples. Indeed, mCD169 and nCD64 levels in directly frozen samples are given with an MFI bias of 3.47 and 3.03, respectively. In a previous report [14], these biomarkers had thresholds in fresh samples demonstrated to give infectious information when below 6.3 and 1.2, respectively. We could imagine that within frozen samples, those thresholds could be set at 9.77 ($6.3 + 3.47$) for mCD169 and 4.23 ($1.2 + 3.03$) for nCD64.

Regarding mHLA-DR, good correlations were also obtained between frozen and fresh samples. A bias was introduced (MFI bias of 15.13), which is low in comparison to the high MFI values for mHLA-DR (100–200), thus representing approximately 10% errors. Further, it seems that the bias is proportional to the MFI, suggesting a lower impact on low mHLA-DR measurements usually found in sepsis patients.

On the one hand, these biases could be the result of membrane disruption during the freezing/thawing procedure, giving access for antibodies to the intracellular biomarker stock, thus increasing the total quantity measured per cell. Also, giving access to the intracellular space obviously increases the non-specific background fluorescence due to unbound conjugates. On the other hand, the decreased signal (mHLA-DR especially) could be explained if the membranes are not only permeabilized by ice, but have lost some pieces, or if the biomarkers have suffered from degradation or aggregation due to the cold temperature.

Finally, this demonstration has been made on five common leucocyte subsets and three infection-related biomarkers; other markers should be assessed to underline the global value of the concept for different applications. Also, it cannot be ruled out that some medical conditions could impact the cell integrity and recovery. Even if some probably infected patients were included in this study, the suitability of this method will require larger validation for

each envisioned application. Overall, this first study points out that these simple, cost-effective freezing–thawing and testing methods enable recovery of most leucocytes while preserving their proportions and biomarkers.

Conclusion

In this study, an easy protocol of freezing was established that allows for whole blood sample storage at -20°C in its entirety. The method is promising for the cell subsets considered, because it saves time and effort while providing cellular proportions similar to a DMSO-freezing protocol or a fresh measurement. The proof-of-concept of measuring mCD169, nCD64 and mHLA-DR suggests the potential value of considering this direct freezing concept for testing whole blood using flow cytometry.

Summary points

- Flow cytometry is a powerful tool for immune phenotyping of whole blood.
- Flow cytometry retrospective or multi-center studies rise stability and shipping issues.
- PBMC freezing remains a complex and imperfect option for sample preservation.
- Basic immunophenotyping markers are well preserved after direct blood freezing.
- Biomarkers of infection are also analyzable after freezing.

Supplementary data

To view the supplementary data that accompany this paper please visit the journal website at: www.futuremedicine.com/doi/suppl/10.2217/fmb-2021-0034

Author contributions

PE Morange, P Bourgoïn and F Malergue contributed substantially to the conception and interpretation of the study. P Bourgoïn, I Ait Belkacem and I Arnoux contributed substantially to the acquisition and analysis of flow cytometry data, while P Bourgoïn, I Ait Belkacem and F Malergue contributed substantially to the interpretation. Each has participated in drafting the work or revising it. Each has provided final approval of the version to be published and has agreed to be accountable for all aspects of the work.

Acknowledgments

The authors would like to thank the technician team of the La Timone Hospital laboratory for their assistance in blood sampling, the ANRT for funding the PhD grants, and Beckman Coulter for giving reagents used in the study.

Financial & competing interests disclosure

F Malergue, I Ait Belkacem and P Bourgoïn are Beckman Coulter employees. They provided critical advice on setup of the assay and instruments, and in manuscript preparation. P Bourgoïn and I Ait Belkacem are recipients of CIFRE PhD grants (number 2016/1368 for P Bourgoïn and number 2018/1212 for I Ait Belkacem) from the ANRT (National Agency for Research and Technology). This study was partially supported by Beckman Coulter through donations of the research reagents used in the study and participation of the two employees mentioned above. This private company had no role in the study design, or collection and interpretation of the clinical data. Beckman Coulter and the Beckman Coulter product and service marks mentioned herein are trademarks or registered trademarks of Beckman Coulter, Inc. in the United States of America and other countries. All other trademarks are the property of their respective owners. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Ethical conduct of research

This observational study was approved by the La Timone Hospital Ethical Committee and the Committee for Protection of Persons (CPP approval no. 181160; ID-RCB approval no. 2018 A02706-49. The authors state that they have followed the principles outlined in the Declaration of Helsinki for all human experimental investigations. Routine care of the subjects was not modified; analyses were performed on anonymized blood left over, and informed consent has been obtained.

Data sharing statement

The authors certify that this manuscript reports original research data. Individual data that underlie the results reported in this article are available from the corresponding author following publication, including the study report and study protocol. Additional data are available upon reasonable request.

References

Papers of special note have been highlighted as: • of interest

1. Baumgarth N, Roederer M. A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. *J. Immunol. Methods* 243(1–2), 77–97 (2000).
2. Bourgoin P, Hayman J, Rimmelé T, Venet F, Malergue F, Monneret G. A novel one-step extracellular staining for flow cytometry: proof-of-concept on sepsis-related biomarkers. *J. Immunol. Methods* 470, 59–63 (2019).
 - **Explained a new flow cytometry method in one step.**
3. Bourgoin Pénélope, Soliveres Thomas, Ahriz Dalia *et al.* Clinical research assessment by flow cytometry of biomarkers for infectious stratification in an Emergency Department. *Biomark. Med.* 13(16), 1373–1386 (2019).
 - **Demonstrated interest of assessing CD64 and CD169 for infections.**
4. Klopperpris H, Fomsgaard A, Handley A, Ackland J, Sullivan M, Goulder P. Dimethyl sulfoxide (DMSO) exposure to human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) abolish T cell responses only in high concentrations and following cocubation for more than two h. *J. Immunol. Methods* 356(1–2), 70–78 (2010).
5. Hønge BL, Petersen MS, Olesen R, Møller BK, Erikstrup C. Optimizing recovery of frozen human peripheral blood mononuclear cells for flow cytometry. *PLoS ONE* 12(11), 1–17 (2017).
6. Pitoiset F, Cassard L, El Soufi K *et al.* Deep phenotyping of immune cell populations by optimized and standardized flow cytometry analyses: deep immunophenotyping for clinical studies. *Cytometry A* 93(8), 793–802 (2018).
7. Correia RP, Rajab A, Bento LC *et al.* A ten-color tube with dried antibody reagents for the screening of hematological malignancies. *Int. J. Lab. Hematol.* 40(2), 136–143 (2018).
8. Verschoor CP, Kohli V. Cryopreserved whole blood for the quantification of monocyte, T-cell and NK-cell subsets, and monocyte receptor expression by multi-color flow cytometry: a methodological study based on participants from the canadian longitudinal study on aging: Cryopreserved Blood for Leukocyte Subset Determination. *Cytometry A.* 93(5), 548–555 (2018).
 - **Evaluated frozen whole blood by flow cytometry.**
9. Verschoor CP, Kohli V, Balion C. A comprehensive assessment of immunophenotyping performed in cryopreserved peripheral whole blood: testing cryopreserved blood for immunophenotyping. *Cytometry B Clin. Cytom.* 94(5), 818–826 (2018).
10. van der Kuyl AC, van den Burg R, Zorgdrager F, Groot F, Berkhout B, Cornelissen M. Sialoadhesin (CD169) expression in CD14+ cells is upregulated early after HIV-1 infection and increases during disease progression. *PLoS ONE* 2(2), e257 (2007).
11. Jämsä J, Ala-Kokko T, Huotari V, Ohtonen P, Savolainen E-R, Syrjälä H. Neutrophil CD64, C-reactive protein, and procalcitonin in the identification of sepsis in the ICU – post-test probabilities. *J. Crit. Care* 43, 139–142 (2018).
12. Demaret J, Walencik A, Jacob M-C *et al.* Inter-laboratory assessment of flow cytometric monocyte HLA-DR expression in clinical samples. *Cytometry B Clin. Cytom.* 84B(1), 59–62 (2013).
13. Monneret G, Venet F. Monocyte HLA-DR in sepsis: shall we stop following the flow? *Crit. Care* 18(1), 102 (2014).
14. Bourgoin P, Soliveres T, Barbaresi A *et al.* CD169 and CD64 could help differentiate bacterial from CoVID-19 or other viral infections in the emergency department. *Cytometry A.* 99(5), 435–445 (2021).

ORIGINAL ARTICLE



CD169 and CD64 could help differentiate bacterial from CoVID-19 or other viral infections in the Emergency Department

Pénélope Bourgoin^{1,2} | Thomas Soliveres³ | Alexandra Barbaresi³ |
Anderson Loundou⁴ | Inès Ait Belkacem^{1,5} | Isabelle Arnoux⁶ | Denis Bernot⁶ |
Marie Loosveld⁶ | Pierre-Emmanuel Morange^{2,6} | Pierre Michelet^{2,3} |
Fabrice Malergue¹ | Thibaut Markarian^{2,3}

¹Department of Research and Development, Beckman Coulter Life Sciences-Immunotech, Marseille, France

²Aix Marseille University, INSERM, INRAE, Marseille, France

³Department of Emergency Medicine and Intensive Care, Timone University Hospital, APHM, Marseille, France

⁴Department of Public Health, EA3279 Self-Perceived Health Assessment Research Unit, Timone University Hospital, Aix-Marseille University, Marseille, France

⁵UMR 7280, Marseille-Luminy Immunology Center (CIML), Marseille, France

⁶Department of Hematology Laboratory, Timone University Hospital, APHM, Marseille, France

Correspondence

Fabrice Malergue, Beckman Coulter—Immunotech, 130 Avenue de Lattre de Tassigny, 13009 Marseille, France.
Email: fmalergue@beckman.com

Funding information

Association Nationale de la Recherche et de la Technologie, Grant/Award Numbers: 2018/1212, n° 2016/1368

Abstract

The identification of a bacterial, viral, or even noninfectious cause is essential in the management of febrile syndrome in the emergency department (ED), especially in epidemic contexts such as flu or CoVID-19. The aim was to assess discriminative performances of two biomarkers, CD64 on neutrophils (nCD64) and CD169 on monocytes (mCD169), using a new flow cytometry procedure, in patients presenting with fever to the ED during epidemics. Eighty five adult patients presenting with potential infection were included during the 2019 flu season in the ED of La Timone Hospital. They were divided into four diagnostic outcomes according to their clinical records: no-infection, bacterial infection, viral infection and co-infection. Seventy six patients with confirmed SARS-CoV-2 infection were also compared to 48 healthy volunteers. For the first cohort, 38 (45%) patients were diagnosed with bacterial infections, 11 (13%) with viral infections and 29 (34%) with co-infections. mCD169 was elevated in patients with viral infections, with a majority of *Flu A* virus or Respiratory Syncytial Virus, while nCD64 was elevated in subjects with bacterial infections, with a majority of *Streptococcus pneumoniae* and *Escherichia coli*. nCD64 and mCD169 showed 90% and 80% sensitivity, and 78% and 91% specificity, respectively, for identifying patients with bacterial or viral infections. When studied in a second cohort, mCD169 was elevated in 95% of patients with SARS-CoV-2 infections and remained at normal level in 100% of healthy volunteers. nCD64 and mCD169 have potential for accurately distinguishing bacterial and acute viral infections. Combined in an easy and rapid flow cytometry procedure, they constitute a potential improvement for infection management in the ED, and could even help for triage of patients during emerging epidemics.

KEYWORDS

bacterial infection, CoVID-19, emergency department, flow cytometry, viral infection

1 | INTRODUCTION

In the management of febrile syndrome, diagnostic guidance toward an infectious etiology is essential.¹ The characterization of a viral, bacterial or other infectious or noninfectious cause allows early appropriate patient management. Nevertheless, the data in the literature report the complexity of triage and diagnostic guidance.² The integration of the clinical examination is essential, but unfortunately is often not enough;³ diagnostic elements are therefore needed as quickly as possible in the emergency department (ED), especially in epidemic contexts such as flu or CoVID-19.⁴⁻⁶

Biological markers such as procalcitonin (PCT) and C-reactive protein (CRP) are commonly used in clinical practice. These markers have bacterial specificity but share a wide range of values with viral infections and do not make it possible to exclude or to confirm definitively the diagnosis.⁷⁻⁹ Their triage capacity in ED is thus regularly challenged.¹⁰ Measuring multiple specific biomarkers simultaneously, with a simple technique and rapid time-to-results, would be better compatible with the needs of triage in emergency medicine.¹¹

We developed a rapid flow cytometry assay, able to measure leucocytes biomarkers expressions within 10 min,¹² and demonstrated promising results for the triage of patients with fever at the Emergency Department,^{13,14} with CD64 on neutrophils (nCD64), increased in case of bacterial infections¹⁵, and CD169 on monocytes (mCD169), increased in case of viral infections.¹⁶ In these previous studies, one limitation was the low number of infected patients, especially those with viral diseases.

In this new study, we have thus included more patients, and focused on those with infectious symptoms during the flu season, and later added a cohort of CoVID-19 patients. The main goal was to confirm the relevance of CD64 and CD169 for discriminating between bacterial and viral infections in such epidemic contexts.

2 | METHODS

2.1 | Studied population

The study population included patients older than 18 years, if they presented to the adult ED of La Timone University Hospital in Marseille, France, with infection signs, during 2019 flu season or 2020 CoVID-19 pandemic. The inclusion criteria were the presence of fever greater than 38°C or hypothermia less than 36.5°C, and any potential respiratory (cough, sputum, and dyspnea), urinary (potential urinary infection), abdominal (pain syndrome, diarrhea), cutaneous (erysipelas), or neurological (meningitis) infectious clinical signs. The exclusion criteria were incomplete clinical files, traumatized patients or patients presenting with a known inflammatory or autoimmune disease, neoplasia, chronic infectious disease (viral, fungal, or bacterial), or antibiotic, antiviral, or immunosuppressive treatment prior to admission, and patients with extensive burns or recent surgery (less than 1 month).

Their routine care was not modified, and confidentiality was preserved at all levels. All enrolled patients provided informed consent

and no objection authorization, so that their data could be retrieved from their clinical records by a team of emergency department specialists, and could be used in the study.

This observational and noninterventional prospective study was approved by the La Timone Hospital Ethical Committee and the Committee for Protection of Persons (CPP approval no. 181160; ID-RCB approval no. 2018 A02706-49; ClinicalTrials.gov Identifier NCT03912870). Procedures followed were in accordance with the Helsinki Declaration.

2.2 | Clinical data collection

Electronic medical records were retrieved for each patient by a team of ED specialists:

- epidemiological data: sex, age, clinical history (evolutionary cancer, liver disease, congestive heart failure, cerebrovascular disease), medical institutionalization, altered mental status;
- physiological data: cardiac parameters (systolic, diastolic and average blood pressures, pulse and respiratory rates), body temperature, fever duration, vital signs and symptoms (respiratory, abdominal, neurological, urinary, cutaneous or others), and eventual oxygen-, antibiotic- or antiviral-therapy;
- clinical data: time from onset, symptoms, X-ray examination results (performed and atypical chest X-ray or ultrasound or CT scan), final diagnosis established by the ED practitioner, outcome of the ED visit (released home, conventional or critical care hospitalization), and eventually duration of the hospitalization;
- and biological data: white blood cell (WBC) and polymorphonuclear neutrophil (PMN) counts, CRP and PCT levels, biochemical measurements (urea, sodium, glucose, hematocrit, hemoglobin), and name of the identified pathogens if isolated.

WBC and PMN counts were assessed using a Sysmex XN system (Sysmex Inc., Kobe, Japan). PCT was measured using a Dosage ADVIA Centaur BRAHMS Procalcitonin system (Siemens, Munich, Germany) and CRP using Gen.3 system (COBAS, Roche, Basel, Switzerland).

Isolation of potential viruses relied on examining blood or cerebrospinal fluid samples with polymerase chain reaction (PCR) or reverse transcriptase (RT)-PCR, and serum IgG and IgM with LIAISON analyzer (DiaSorin, Saluggia, Italy). Potential bacteria were detected in blood and respiratory tract secretion (nasopharyngeal swabs, tracheo-bronchial aspirate, or bronchoalveolar lavage) cultures by a Bruker Mass Spectrometry system (Bruker Inc., Billerica, MA, USA), and in urine cultures by urinary antigen tests (for *Pneumococcus* and *Legionella*) or PCR (for *Chlamydia* and *Mycoplasma*).

2.3 | Adjudication committee

Based on all clinical and biological data, an adjudication committee classified patients from the first cohort in four groups.

Group I: Subjects for which infection was ruled out. No evidence of infection was found according to clinical symptoms and laboratory test results.

Group II: Subjects diagnosed with bacterial infections. Subjects were categorized into this group either on the basis of a positive bacterial culture result, and/or if clinical and laboratory findings such as concomitant high levels of CRP and PCT and negative viral test results strongly suggested the presence of a bacterial infection.

Group III: Subjects diagnosed as having viral infections. This group contained subjects that presented with typical clinical symptoms of infections, but negative bacteriological results and/or low PCT levels. In some cases, viral agents were found by antigen-based tests or serological assays.

Group IV: Subjects diagnosed as having both viral and bacterial infections.

The committee was not aware of the flow cytometry results.

The adjudication committee was not required for subjects included during CoVID-19 pandemic, since RT-PCR results were used as gold standard.

2.4 | Flow cytometry testing

Leftover ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)-treated blood samples were pseudonymized, and processed by flow cytometry according to a newly described one-step procedure.¹² Briefly, a multi-color panel was constituted and dried as a “glassified” layer at the bottom of a 5-ml testing tube using the DURA Innovations drying process (Beckman Coulter Inc.), with antibodies at their optimized amounts for a single test: anti-CD169-phycoerythrin (PE) (clone 7-239), anti-CD64-PacificBlue (PBE) (clone 22), anti-HLA-DR-allophycocyanin (APC) (clone Immu357) and anti-HLA-ABC-Alexa Fluor 700 (AF700) (clone B9.12.1), all custom products from Beckman Coulter Inc. (Brea, CA).

For each blood sample tested, 500 μ l of Versalyse lysing solution (Beckman Coulter Inc.) and 5 μ l of EDTA-treated blood were transferred to one dried tube. After incubation for 15 min, samples were analyzed on a three-laser, 10-color Navios flow cytometer (Beckman Coulter Inc.). As an external Quality Control, Flow-Set beads (Beckman Coulter) were used before each analytical run in order to control the variability in device performance, however no harmonization between the measured values over the study period was necessary. Analysis was performed using Kaluza Analysis Software (version 2.1; Beckman Coulter Inc.).

Leucocytes were gated using Side Scatter (SSC) and CD64 expressions, as lymphocytes (low SSC, CD64⁻), monocytes (intermediate SSC, CD64⁺) and neutrophils (high SSC), prior to the analysis of nCD64, mCD169, mHLA-DR, rHLA-ABC, and mCD64. Results were expressed as mean of fluorescence intensities (MFI). CD169 ratio (rCD169) was also calculated as the MFI ratio between monocytes and lymphocytes. CD64 staining on monocytes was used as an internal Quality Control, since the natural

CD64 expression on monocytes indicates the presence of the antibody cocktail.

For the second study, we directly used the recently launched IOTest Myeloid Activation antibody cocktail (Part Number C63854, Beckman Coulter Inc.), containing the same three markers: anti-CD169-PE (clone 7-239), anti-CD64-PBE (clone 22), anti-HLA-DR-APC (clone Immu357).

2.5 | Statistical analysis

Statistical analysis was performed using IBM SPSS Statistics version 20 (IBM SPSS Inc., Chicago, IL). Quantitative data were expressed as mean \pm SD. Qualitative variables were expressed as frequency with percent.

Comparisons of quantitative variables among the different groups were performed using Student's *t*-test or Mann-Whitney *U* test. Comparisons of percentage were performed using Khi-2 or Fisher's exact tests if conditions were missing. Comparisons of more than two groups were performed by Freeman-Halton extension of Fisher's exact test for qualitative variables and by analysis of variance or Kruskal-Wallis tests for quantitative variables.

The ability of biomarker levels to discriminate between bacterial and viral infections was investigated by means of receiver operating characteristic (ROC) curve analysis. Youden index was used to define the best threshold of biomarker indexes, that optimizes the biomarker's differentiating ability with equal weight to sensitivity and specificity. Analyses were based on area under the curve (AUC), sensitivity (true positives/positives [TP/P]), specificity (true negatives / negatives [TN/N]), positive likelihood ratio (sensitivity/[100 – specificity]) and negative likelihood ratio ([100 – sensitivity]/specificity). All values were expressed as ranges (between 0 and 100), with 95% confidence intervals. For all tests, two-sided *p* values less than 0.05 were considered statistically significant.

3 | RESULTS

3.1 | Clinical features of the patients

During the first study period, 104 patients admitted to the ED of La Timone Hospital were included. All blood samples were processed by flow cytometry, but only 85 out of the 104 subjects satisfied the inclusion criteria. Nineteen patients for whom clinical files were incomplete, and in particular for whom there was doubt about the presence of underlying or asymptomatic infections that were not sufficiently documented, were removed from the study, because it could have biased their final diagnosis and classification.

The adjudication committee classified the 85 remaining patients: 7 (8%) were defined as not-infected, 38 (45%) as bacterially infected, 11 (13%) as virally infected and 29 (34%) as presenting with both a bacterial and a viral infection (co-infection).

An overview of this study workflow is shown in Figure 1.



FIGURE 1 Overview of the study workflow. Representation of each step of the study, conducted between the Emergency Department (ED) and the Hematology Laboratory (HL) of La Timone Hospital, with final numbers of included and excluded subjects, and details about clinical kinds of symptoms

3.2 | Clinical epidemiology and biomarker levels

The final first cohort consisted of 85 patients. Their epidemiological, clinical, and biological data are presented in Table 1.

In total, 30 (35%) women and 55 (65%) men (p : 0.02) were included, with a mean age of 56 (± 25) years (p : 0.11). No significant differences between groups were observed for clinical histories and

features of the patients, except for diastolic (p : 0.03) and average (p : 0.03) blood pressures, respiratory rate (p : 0.04), and number of initiated oxygen therapy (p < 0.01). Overall, patients had a mean elevated body temperature ($38.1 \pm 1.1^\circ\text{C}$), but temperature was not significantly different between groups (p : 0.12).

A wide range of infectious symptoms was observed among groups (respiratory, abdominal, neurological, urinary, cutaneous, and

TABLE 1 Cohort study characteristics

Variable	Characteristic	No infections (n = 7)	Bacterial infections (n = 38)	Viral infections (n = 11)	Co-infections (n = 29)	p-value
Demographics						
Patient sex	Female	0 (0%)	18 (47%)	2 (18%)	10 (34%)	0.02*
	Male	7 (100%)	20 (53%)	9 (82%)	19 (66%)	
Patient age	Years	48 ± 9	56 ± 4	43 ± 7	63 ± 5	0.11
Clinical history	Medical institutionalization	0 (0%)	1 (3%)	0 (0%)	1 (4%)	0.80
	Altered mental status	0 (0%)	1 (3%)	0 (0%)	1 (4%)	0.80
	Evolutionary cancer	0 (0%)	1 (3%)	0 (0%)	0 (0%)	0.65
	Liver disease	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (4%)	0.54
	Congestive heart failure	0 (0%)	3 (8%)	0 (0%)	1 (4%)	0.46
	Cerebrovascular disease	0 (0%)	2 (5%)	0 (0%)	0 (0%)	0.35
	Constants	Systolic blood pressure (mm Hg)	149 ± 10	128 ± 4	121 ± 8	136 ± 5
	Diastolic blood pressure (mm Hg)	87 ± 6	69 ± 2	68 ± 5	72 ± 3	0.03*
	Average blood pressure (mm Hg)	108 ± 7	89 ± 3	86 ± 5	94 ± 3	0.03*
	Pulse rate (bpm)	85 ± 8	100 ± 3	108 ± 6	100 ± 4	0.17
	Respiratory rate (b)	16 ± 3	21 ± 1	18 ± 2	23 ± 1	0.04*
Oxygen therapy	Initiated	0 (0%)	4 (11%)	0 (0%)	11 (38%)	<0.01*
	Oxygen saturation (%)	97 ± 2	97 ± 1	97 ± 1	95 ± 1	0.11
Fever	Body temperature (°C)	38.6 ± 0.4	37.9 ± 0.2	38.6 ± 0.3	38.2 ± 0.2	0.12
	Duration (hours)	29 ± 11	40 ± 5	49 ± 9	43 ± 6	0.57
Physiology and symptomatology						
Clinical symptoms	Respiratory	4 (57%)	16 (42%)	8 (73%)	26 (90%)	0.01*
	Abdominal	3 (43%)	7 (18%)	3 (27%)	1 (4%)	
	Neurological	0 (0%)	8 (21%)	0 (0%)	1 (4%)	
	Urinary	0 (0%)	5 (13%)	0 (0%)	1 (4%)	
	Cutaneous	0 (0%)	1 (3%)	0 (0%)	0 (0%)	
	Other	0 (0%)	1 (3%)	0 (0%)	0 (0%)	
X-ray examinations (chest X-ray, ultrasound, CT scan)	Performed	7 (100%)	31 (82%)	5 (45%)	25 (86%)	0.02*
	Atypical	3 (43%)	22 (58%)	3 (27%)	17 (59%)	0.26
Antibiotic therapy	Initiated	4 (80%)	36 (97%)	4 (36%)	23 (85%)	<0.01*
Outcome	Released home	4 (57%)	15 (39%)	8 (73%)	5 (17%)	0.01*
	Conventional hospitalization	2 (29%)	23 (61%)	3 (27%)	22 (76%)	
	Critical care hospitalization	1 (14%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (7%)	
Hospitalization	Duration (days)	4 ± 3	5 ± 1	2 ± 2	6 ± 2	0.49
Biology and Biochemistry						
Biological Measurements	CRP (mg/mL)	12 ± 30	99 ± 13	39 ± 24	84 ± 13	0.02*
	PCT (ng/mL)	0.03 ± 1.32	0.58 ± 0.37	0.49 ± 1.32	0.76 ± 0.50	0.96
	White blood cells (G/L)	11 ± 2	13 ± 1	7 ± 2	10 ± 1	0.02*

TABLE 1 (Continued)

Variable	Characteristic	No infections (n = 7)	Bacterial infections (n = 38)	Viral infections (n = 11)	Co-infections (n = 29)	p-value
Biochemical constants	Polymorphonuclear cells (G/L)	6 ± 3	11 ± 1	5 ± 3	8 ± 2	0.11
	Urea (mmol/L)	5 ± 2	6 ± 1	5 ± 1	8 ± 1	0.09
	Sodium (mmol/L)	139 ± 2	138 ± 1	138 ± 1	138 ± 1	0.99
	Glucose (mmol/L)	6 ± 4	8 ± 2	7 ± 3	7 ± 2	0.93
	Hematocrit (%)	44 ± 2	38 ± 1	44 ± 2	41 ± 1	<0.01*
Flow cytometry	Hemoglobin (g/L)	132 ± 9	128 ± 4	149 ± 7	141 ± 4	0.03*
	nCD64	1.1 ± 0.5	2.7 ± 0.2	1.5 ± 0.3	1.9 ± 0.2	<0.01*
	mCD169	5.5 ± 3.3	5.4 ± 1.4	24.7 ± 2.7	16.6 ± 1.6	<0.01*

Note: Clinical and biological data for non-, bacterially, virally, and co-infected subjects. Values are presented either as mean ± SD or as number with percentage. Variables for which p values were less than $\alpha = 5\%$ are indicated in bold with * to indicate statistically significant differences between groups.

other). The most common clinical presentation associated with bacterial (n = 16; 42%), viral (n = 8; 73%), and co- (n = 26; 90%) infections was respiratory. As expected, based on symptoms, patients diagnosed as having bacterial or co-infections were treated more frequently with antibiotics (p < 0.01), and X-ray examinations were performed more frequently (p: 0.02). After their ED medical consultation, 32 patients (38%) could have been released home, but 53 patients (62%) were admitted to hospital specialized departments or the critical care department for longer observation. However, all patients that were kept at the hospital for observation remained for a non-significantly different duration (p: 0.49).

Finally, comparison of biochemical and biological measurements showed significant differences between groups for WBC count (p: 0.02), hematocrit (p < 0.01) and hemoglobin (p: 0.03) levels. CRP (p: 0.02) but not PCT (p: 0.96) was significantly different among groups.

Overall, 94 common pathogen species were detected (Table 2). The most frequent pathogens were *Streptococcus pneumoniae* (38%) and *Flu A virus* (26%).

In comparison to non-infected subjects (nCD64 MFI of 1.1 ± 0.5; mCD169 MFI of 5.5 ± 3.3), nCD64 level was elevated in patients with bacterial (MFI of 2.7 ± 0.2) and co-infections (MFI of 1.9 ± 0.2; p < 0.01) whereas mCD169 level was increased in patients with viral (MFI of 24.7 ± 2.7) and co-infections (MFI of 16.6 ± 1.6; p < 0.01). Example of flow cytometry results is shown in Figure S1. Biomarker levels in the different groups of patients are shown in Figure 2.

3.3 | Biomarker ROC analysis

ROC analysis of both biomarkers was made for evaluating their performance to identify the bacterial or viral etiology of an infection (Figure 3). Ability to discriminate bacterial infections was determined on patients presenting with bacterial infections only plus bacterial co-infections (Group II + Group IV) in comparison to patients without bacterial infections (Group I + Group III). Ability to discriminate viral infections was determined on patients presenting with viral infections

TABLE 2 Identification of pathogens in the cohort

Pathogen identified	Number isolated (n = 94)
Respiratory	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	36 (38%)
<i>Flu A virus</i>	24 (26%)
<i>Human Respiratory Syncytial Virus</i>	5 (6%)
<i>Rhinovirus</i>	3 (3%)
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	1 (1%)
<i>Legionella</i>	1 (1%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1 (1%)
<i>Streptococcus oralis</i>	1 (1%)
<i>Acinetobacter iwoffi</i>	1 (1%)
<i>Coxiella Burnetti</i>	1 (1%)
Urinary	
<i>Escherichia coli</i>	8 (9%)
<i>Cytomegalovirus</i>	2 (2%)
<i>Chlamydia</i>	1 (1%)
<i>Proteus mirabilis</i>	1 (1%)
Gastrointestinal	
<i>Enterococcus faecalis</i>	1 (1%)
<i>Norovirus</i>	1 (1%)
<i>Campylobacter jejuni</i>	1 (1%)
<i>Yersinia</i>	1 (1%)
<i>Shigella</i>	1 (1%)
<i>Salmonella</i>	1 (1%)
Other Gram Negative Bacillus	1 (1%)
Cutaneous	
<i>Morexella osloensis</i>	1 (1%)

Note: Name and number (percentage in brackets) of isolated bacteria and viruses in the whole cohort.

only plus viral co-infections (Group III + Group IV) in comparison to patients without viral infections (Group I + Group II).

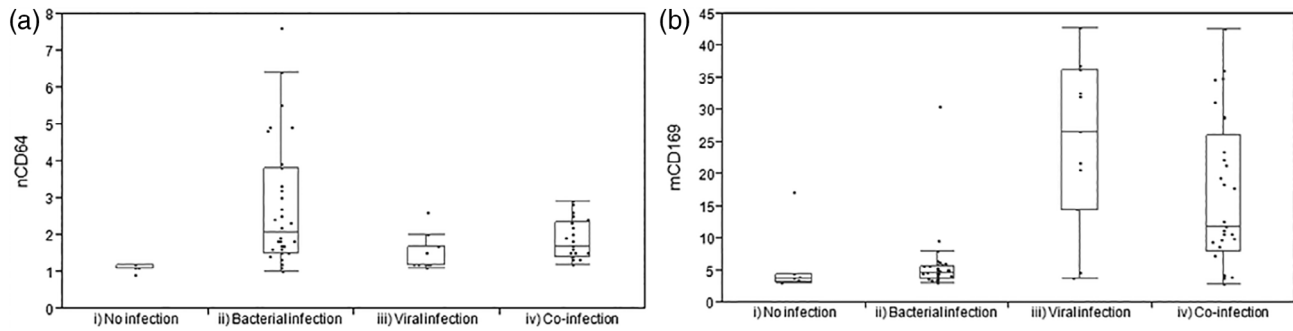


FIGURE 2 Biomarker levels for the four groups of patients. (A) nCD64 and (B) mCD169 levels of expression in patients with (i) no infection (control group), (ii) bacterial infection, (iii) viral infection, or (iv) co-infection

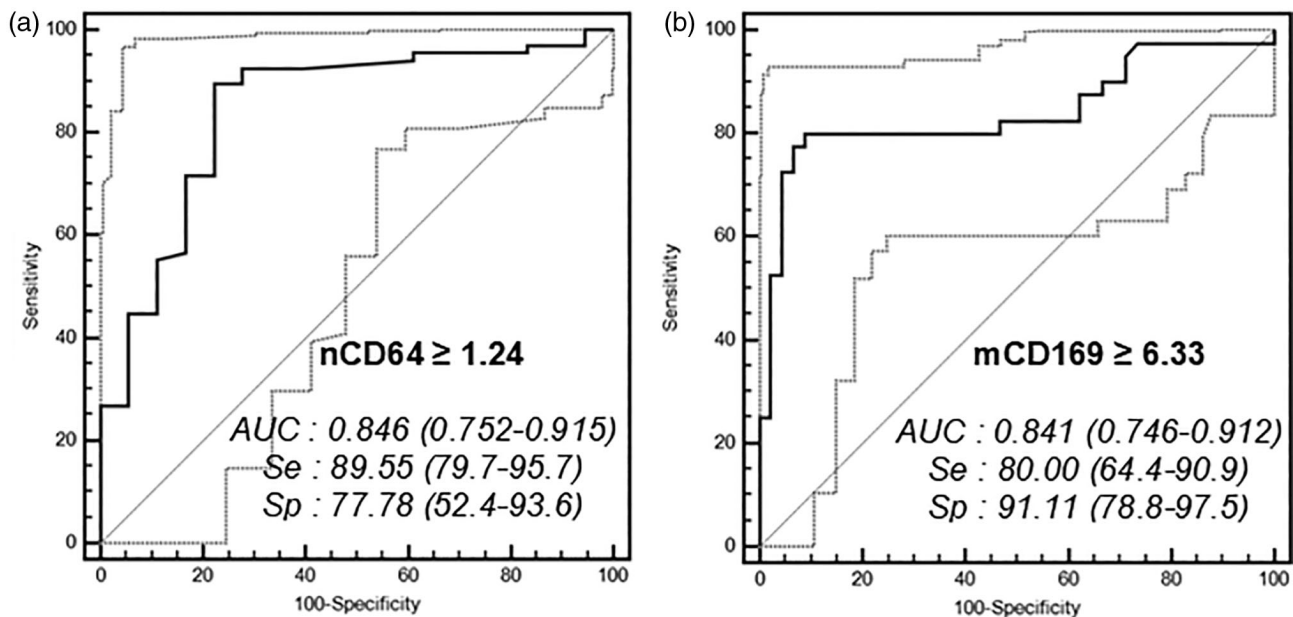


FIGURE 3 ROC analysis. ROC curves for the discrimination of bacterial infections with (A) nCD64 and of viral infections with (B) mCD169. Optimal thresholds for each biomarker are indicated with calculated values of specificity (Sp) and sensitivity (Se). Area under the curve (AUC) and 95% confidence interval are also given for each ROC analysis. Confidence interval curves are shown as light gray dotted lines

Using a cutoff point of greater than or equal to 1.24 for patients with bacterial infections, the results indicated that the nCD64 MFI showed a sensitivity of 90% (80–96%), specificity of 78% (52–94%), positive likelihood ratio of 4.03 (1.7–9.6), and negative likelihood ratio of 0.13 (0.06–0.3). The area under the curve was of 0.85 (0.75–0.92).

Using a cutoff point of greater than or equal to 6.33 for patients with viral infections, the results showed that the mCD169 MFI exhibited a sensitivity of 80% (64–91%), specificity of 91% (79–98%), positive likelihood ratio of 9.00 (3.5–23.2), and negative likelihood ratio of 0.22 (0.1–0.4). The area under the curve was of 0.84 (0.75–0.91).

3.4 | Biomarkers during CoVID-19 pandemic

In order to demonstrate the relevance of both biomarkers to discriminate patients in the Emergency Department in an epidemic

context, 76 additional SARS-CoV-2 RT-PCR positive samples were analyzed.

A total of 39 (51%) women and 37 (49%) men, with a mean age of 60 (± 18) years and mean PCR level of 24.9 (± 5.9) cycles, were included consecutively over a 3-day period and compared to 48 healthy blood bank donors (Figure 4). Patients with CoVID-19 reported symptoms for an average of 5.5 (± 4.4) days. They suffered from representative comorbidities of CoVID-19: high blood pressure ($n = 31$; 41%), cardiovascular diseases ($n = 28$; 37%), organ failure ($n = 25$; 33%), obesity ($n = 18$; 24%), diabetes ($n = 16$; 21%), asthma ($n = 10$; 13%), respiratory disorders ($n = 9$; 12%), progressive cancer ($n = 8$; 11%), smoking ($n = 7$; 9%), neurological disorders ($n = 6$; 8%), chronic obstructive pulmonary disease ($n = 5$; 7%), and autoimmune diseases ($n = 2$; 3%).

Patients with SARS-CoV-2 infections had a significantly higher mCD169 (MFI of 24.6 ± 12.2 ; $p < 0.01$) and rCD169 (ratio of 16.5

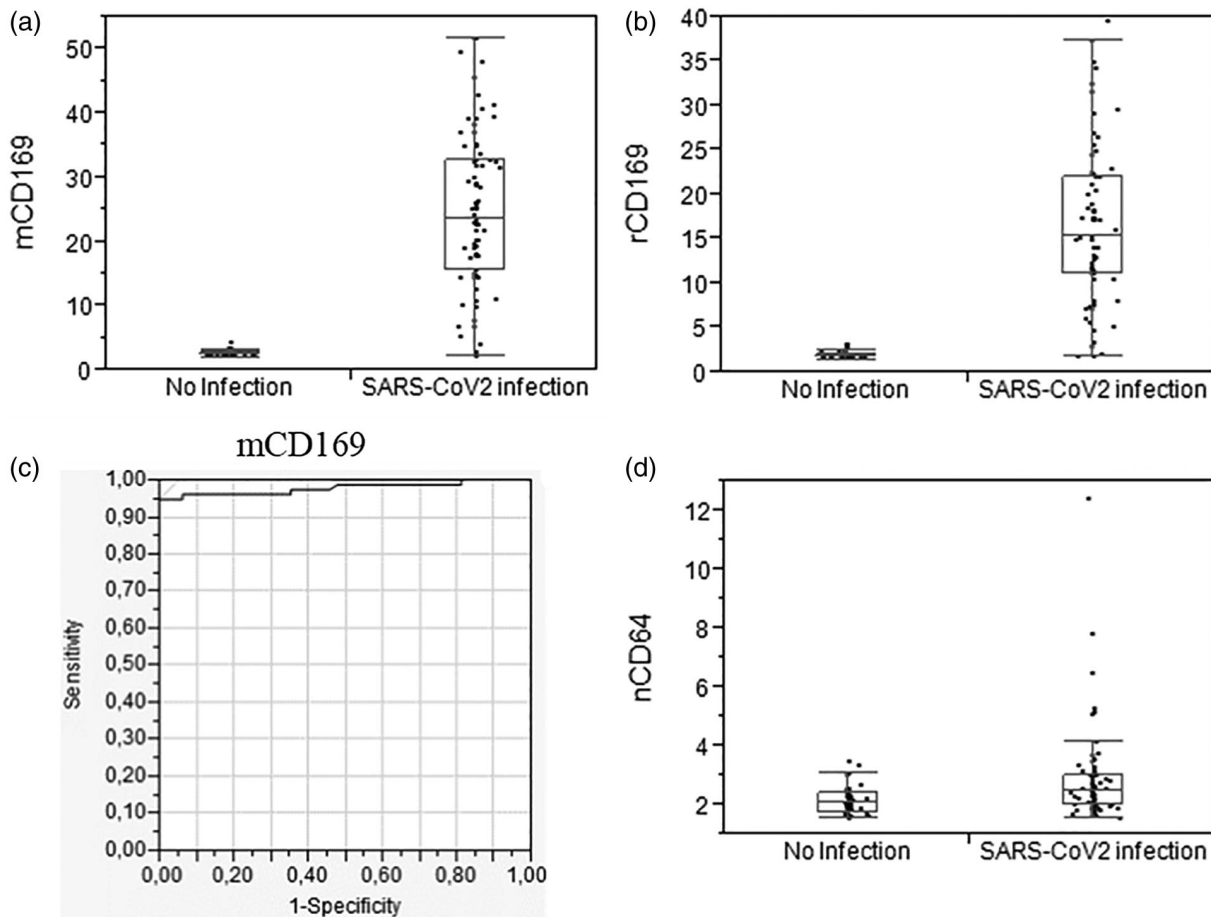


FIGURE 4 Biomarker levels and ROC analysis for SARS-CoV-2 infections. mCD169 (A) level, (B) ratio, and (C) ROC analysis for patients with SARS-CoV-2 infections, in comparison to healthy volunteers. (D) nCD64 level for the same patients

± 9.0 ; $p < 0.01$) levels than healthy volunteers (mCD169 MFI of 2.6 ± 0.5 ; rCD169 ratio of 1.9 ± 0.4). ROC analysis showed that mCD169 MFI exhibited sensitivity of 95% and specificity of 100%, when using a cutoff point of greater than or equal to 5.34 for patients with CoVID-19 infections. The area under the curve was of 0.98.

As expected for a viral infection, nCD64 level was rarely increased.

4 | DISCUSSION

This study aimed to investigate the value of nCD64 and mCD169 biomarkers in a population of patients with febrile symptoms in a clinical context of the ED, using a new procedure of flow cytometry. Assessment of their levels, in non-infected, bacterially-infected, virally-infected or co-infected subjects, during flu or CoVID-19 epidemics, demonstrated, within this study, their relevance for identifying etiology of infections.

In this new study, the first part included a total of 85 subjects, divided into four diagnostic outcomes: not-, bacterially-, virally- or co-infected subjects. Among these groups, each outcome was always represented by more than 10 subjects. Moreover, almost all

cases were confirmed by a bacterial or viral isolate in biological samples (22 different pathogens found among 94 isolates). As patients were included during flu season, the most frequent pathogens were respiratory: *S. pneumoniae*, *Flu A* virus, and *Human Respiratory Syncytial Virus*. These pathogens are commonly expected during this period, as has been reported.⁵ The second part of the study presented a total of 124 patients, including 76 subjects with confirmed SARS-CoV-2 infections by RT-PCR and 48 healthy volunteers.

CD64 on neutrophils and CD169 on monocytes were the two main biomarkers assessed in the study by flow cytometry for discriminating between bacterial versus viral infections. Expressions of these two biomarkers have been shown to be directly induced, within hours, by interferons produced by the body in response to pathogen detection.¹⁴ Ability of nCD64 to discriminate between bacterial and non-bacterial infections has been largely demonstrated for years,¹⁷ whereas mCD169 increase after infection by viruses has only been described recently. mCD169 seems to be a general biomarker of acute viral infections since it has been found in patients with HIV,^{16,18,19} EBV,²⁰ RSV,²¹ CMV,²² dengue,^{23,24} Zika,²⁵ noroviruses,²⁶ Lassa, and Marburg.²⁷ Here, high levels of mCD169 have been observed for the first time for *Flu A* virus.

High levels of sensitivity and specificity were found in the study for both biomarkers. Interestingly, nCD64 showed a better sensitivity of 90% than specificity of 78%, whereas mCD169 showed a better specificity of 91% than sensitivity of 80%. These results further demonstrate their valuable use for infection etiology guidance in ED settings for patient triage. Indeed, a biomarker used for bacterial infection identification in ED needs to be as sensitive as possible to detect the majority of cases, demonstrating at least 90% sensitivity, as any missing case could delay patient from receiving appropriate antibiotic therapy, and thus increase their risk of developing sepsis and progression to death. Conversely, a viral marker in ED has to be very specific to ensure the etiology, with at least 90% specificity, as it allows the practitioner to discharge the patient, as well as avoiding the empirical use of antimicrobial drugs in case they are not required.²⁸

The global health issue of overuse of antibiotics has been illustrated in this study: the epidemiological data showed that an antibiotic therapy was initiated in 67 out of 85 patients. Examining the whole cohort, 36 out of 38 subjects with bacterial infections, and 23 out of 29 co-infected with bacteria and viruses, appropriately received antibiotics. Conversely, 4 out of the 11 subjects virally infected only, and 4 out of 7 not-infected subjects, received antibiotics, cases where antibiotics are ineffective, or even worse, might be dangerous.²⁹ As a consequence of their usefulness for determining etiology, both biomarkers could be incorporated as part of the overall clinical management of patients with fever, and used for evaluation of antibiotic therapy initiation, duration and end.³⁰

When studied in a second cohort of CoVID-19 patients, mCD169 was found elevated in 95% of patients with SARS-CoV-2 infections and remained at normal level in 100% of healthy volunteers. The biomarker levels in both groups were equivalent to those obtained during the flu period (mCD169 mean MFI around 25 for infected patients and around four for healthy donors). ROC analysis also confirmed similar performances (100% specificity and 95% sensitivity using a similar threshold around six). These results thus reinforced mCD169 value for patient triage in Emergency Department during epidemics.

Of the four CD169 negative but RT-PCR positive patients, two had been symptomatic for more than 10 days and had a very low RT-PCR result (cycle thresholds at 30 and 32), compatible with the disappearance of the disease. The other two patients presented to the Emergency Department for unrelated reasons, were asymptomatic for CoVID-19, and had a very low RT-PCR result (cycle thresholds at 32 and 34). The RT-PCR results are therefore questionable.

As expected in these virally infected patients, CD64 on neutrophils level remained low. A few patients had an increased level that could indicate a bacterial co-infection or could also be related to the severity of the disease, as it has been described an interferon-gamma release during the inflammation phase.³¹

This combination of biomarker is thus promising for the triage of patients at the Emergency Department in the routine and also during current epidemics such as flu or CoVID-19, and could probably be directly applied to any new emergent infectious disease.

Other promising biomarkers had been included in the flow cytometry panels, and thus analyzed concomitantly: HLA-DR on

monocytes, CD64 on monocytes, and HLA-ABC ratio of monocytes/neutrophils in the first part of the study.¹³ They showed weak performances to identify bacterial or viral infections in these cohorts (Figure S2).

Finally, one major issue remaining is how to measure the biomarkers in ED clinical practice. The ED environment is complex and dynamic, and thus requires technologies tailored specifically for prevention, diagnosis, and outcome of infection, to enhance patient safety in emergency care. A new solution was demonstrated by assessing the levels of expression of the markers using an innovative, 15-min, one-step method of flow cytometry.¹² This procedure may meet the minimum characteristics required for a bacterial versus viral bedside test, as targeted by Dittrich team¹¹: (1) the use of a capillary blood drop could be potentially used as only 5 μ l are necessary, although EDTA blood samples were used here; (2) reagent storage and laboratory procedures are carried out at room temperature; and (3) all steps for testing the samples are combined into one step, with no specific material or training needed. In summary, this assay yields results in less than 15 min from initial blood collection, with discriminative power greater than other currently existing tests. In this study, we used a regular flow cytometer in the hematology laboratory; of course, we envision for future applications at the point-of-need the use of a benchtop flow cytometer, with automatized standardization and analysis, allowing a 24/7 access to non-expert personals.

The study has other limitations. First, patients were enrolled only within one ED from one hospital, and their number remained limited. Thus, even if a good representation of the most common infections was achieved, it is not sufficient to provide a complete validation of biomarkers and the calculated specificity and sensitivity must be considered as preliminary. In future studies, it might be preferred to extend the study to other ED from other hospitals. Secondly, biomarkers seemed to be useful for infected patients, but their kinetics are not well known. It is important to understand their delay of onset after infection and their sequential evolution in blood circulation. Future research should thus focus on measuring these biomarkers on sequential samples from same subjects, and evaluating their prognostic value, both for bacterial versus viral infection diagnosis and for therapy duration.

5 | CONCLUSION

In summary, CD64 and CD169 were confirmed to be biomarkers of interest to predict bacterial versus viral infection causes of fever. Flow cytometry is currently the universally applied method for identifying cell surface markers, but in this context, its availability remains limited in emergency settings. As part of a global effort to reduce inappropriate antibiotic use, this study makes available the measurement of infection-related biomarkers using a new flow cytometry procedure, promisingly applicable at the point-of-care. This association of infection related biomarkers and flow cytometry is promising to facilitate an easy, rapid and robust discrimination of bacterial versus viral

infections and thus the successful care of patients with potential infection presenting to the Emergency Department.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the technician team from the La Timone University Hospital Hematology Laboratory for their assistance in blood testing, the ANRT for funding the PhD grants, and Beckman Coulter for giving reagents used in the study.

Pénélope Bourgoïn and Inès Ait Belkacem are recipient of CIFRE PhD grants (respectively n°2016/1368 and n°2018/1212) from the ANRT (National Agency for Research and Technology). This study was partially supported by Beckman Coulter through donations of the research reagents used in the study and participation of the two employees mentioned above. This private company had no role in the study design, or collection and interpretation of the clinical data. Beckman Coulter and the Beckman Coulter product and service marks mentioned herein are trademarks or registered trademarks of Beckman Coulter, Inc. in the United States of America and other countries. All other trademarks are the property of their respective owners.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Penelope Bourgoïn: Conceptualization; data curation; formal analysis; funding acquisition; investigation; methodology; software; validation; writing-original draft; writing-review & editing. **Thomas Soliveres:** Data curation; formal analysis; investigation; writing-review & editing. **Alexandra Barbaresi:** Data curation; formal analysis; investigation; writing-review & editing. **Anderson Loundou:** Data curation; formal analysis; investigation; writing-review & editing. **Inès Ait Belkacem:** Data curation; formal analysis; investigation; writing-review & editing. **Isabelle Arnoux:** Conceptualization; data curation; methodology; project administration; supervision; validation; writing-review & editing. **Denis Bernot:** Data curation; formal analysis; investigation; writing-review & editing. **Marie Loosveld:** Methodology; project administration; validation; writing-review & editing. **Pierre-Emmanuel Morange:** Conceptualization; project administration; resources; supervision; validation; writing-review & editing. **Pierre Michelet:** Conceptualization; methodology; project administration; resources; supervision; validation; writing-review & editing. **Fabrice Malergue:** Conceptualization; data curation; formal analysis; investigation; methodology; project administration; supervision; validation; writing-original draft; writing-review & editing. **Thibaut Markarian:** Conceptualization; data curation; formal analysis; investigation; methodology; project administration; resources; validation; writing-original draft; writing-review & editing.

CONFLICT OF INTEREST

Fabrice Malergue, Inès Ait Belkacem and Pénélope Bourgoïn are Beckman Coulter employees.

ETHICS STATEMENT

The authors state that they have followed the principles outlined in the Declaration of Helsinki for all human experimental investigations.

Routine care of the subjects was not modified; analyses were performed on anonymized blood left over, and all data collected in the study were part of routine clinical practice and retrieved from subject records. Results of the study had no influence on subjects' management.

This observational and noninterventional prospective study was approved by the La Timone Hospital Ethical Committee and the Committee for Protection of Persons (CPP approval no. 181160; ID-RCB approval no. 2018 A02706-49; ClinicalTrials.gov Identifier NCT03912870).

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The authors certify that this manuscript reports original clinical research data. Individual data that underlie the results reported in this article are available from the corresponding author following publication, including the study report and study protocol. Additional data are available upon reasonable request.

ORCID

Fabrice Malergue  <https://orcid.org/0000-0003-1322-1390>

REFERENCES

1. Ray P, Badarou-Acossi G, Viallon A, Boutoille D, Arthaud M, Trystram D, et al. Accuracy of the cerebrospinal fluid results to differentiate bacterial from non bacterial meningitis, in case of negative gram-stained smear. *Am J Emerg Med.* 2007;25:179–84.
2. Kutz A, Florin J, Hausfater P, Amin D, Amin A, Hautitz S, et al. Predictors for delayed emergency department care in medical patients with acute infections – an international prospective observational study. *PLoS ONE.* 2016;11:e0155363.
3. Hausfater P, Juillien G, Madonna-Py B, Haroche J, Bernard M, Riou B. Serum procalcitonin measurement as diagnostic and prognostic marker in febrile adult patients presenting to the emergency department. *Crit Care.* 2007;11:R60.
4. Ray P, Birolleau S, Lefort Y, Becquemin M-H, Beigelman C, Isnard R, et al. Acute respiratory failure in the elderly: etiology, emergency diagnosis and prognosis. *Crit Care.* 2006;10:R82.
5. Cuquemelle E, Soulis F, Villers D, Roche-Campo F, Ara Somohano C, Fartoukh M, et al. Can procalcitonin help identify associated bacterial infection in patients with severe influenza pneumonia? A multicentre study. *Intensive Care Med.* 2011;37:796–800.
6. Younes N, Al-Sadeq DW, AL-Jighefee H, Younes S, Al-Jamal O, Daas HI, et al. Challenges in laboratory diagnosis of the novel coronavirus SARS-CoV-2. *Viruses.* 2020;12:1–27. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7354519/>. Accessed October 27, 2020.
7. Tang BM, Eslick GD, Craig JC, McLean AS. Accuracy of procalcitonin for sepsis diagnosis in critically ill patients: systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2007;7:210–7.
8. Uzzan B, Cohen R, Nicolas P, Cuherat M, Perret G-Y. Procalcitonin as a diagnostic test for sepsis in critically ill adults and after surgery or trauma: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care Med.* 2006;34:1996–2003.
9. Nijman RG, Vergouwe Y, Thompson M, van Veen M, van Meurs AHJ, van der Lei J, et al. Clinical prediction model to aid emergency doctors managing febrile children at risk of serious bacterial infections: diagnostic study. *BMJ.* 2013;346:f1706–6.
10. Le Bel J, Chenevier-Gobeaux C, Blanc F-X, Benjoar M, Ficko C, Ray P, et al. Diagnostic accuracy of C-reactive protein and procalcitonin in suspected community-acquired pneumonia adults visiting emergency

- department and having a systematic thoracic CT scan. *Crit Care*. 2015;19:366.
11. Dittrich S, Tadesse BT, Moussy F, Chua A, Zorzet A, Tängdén T, et al. Target product profile for a diagnostic assay to differentiate between bacterial and non-bacterial infections and reduce antimicrobial overuse in resource-limited settings: an expert consensus. *PLoS One*. 2016;11:e0161721.
 12. Bourgoin P, Hayman J, Rimmelé T, Venet F, Malergue F, Monneret G. A novel one-step extracellular staining for flow cytometry: proof-of-concept on sepsis-related biomarkers. *J Immunol Methods*. 2019; 470:59–63.
 13. Bourgoin P, Lediagon G, Arnoux I, Bernot D, Morange P-E, Michelet P, et al. Flow cytometry evaluation of infection-related biomarkers in febrile subjects in the emergency department. *Future Microbiol*. 2020;15:189–201.
 14. Bourgoin P, Biéché G, Ait Belkacem I, Morange P-E, Malergue F. Role of the interferons in CD64 and CD169 expressions in whole blood: relevance in the balance between viral- or bacterial-oriented immune responses. *Immun Inflamm Dis*. 2020;8:106–23.
 15. Jämsä J, Ala-Kokko T, Huotari V, Ohtonen P, Savolainen E-R, Syrjälä H. Neutrophil CD64, C-reactive protein, and procalcitonin in the identification of sepsis in the ICU—Post-test probabilities. *J Crit Care*. 2018;43:139–42.
 16. van der Kuyl AC, van den Burg R, Zorgdrager F, Groot F, Berkhout B, Cornelissen M. Sialoadhesin (CD169) expression in CD14+ cells is upregulated early after HIV-1 infection and increases during disease progression. *PLoS ONE*. 2007;2:e257.
 17. Xiong S-D, Pu L-F, Wang H-P, Hu L-H, Ding Y-Y, Li M-M, et al. Neutrophil CD64 index as a superior biomarker for early diagnosis of infection in febrile patients in the hematology department. *Clin Chem Lab Med*. 2017;55:82–90.
 18. Kim W-K, McGary CM, Holder GE, Filipowicz AR, Kim MM, Beydoun HA, et al. Increased expression of CD169 on blood monocytes and its regulation by virus and CD8 T cells in macaque models of HIV infection and AIDS. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2015;31:696–706.
 19. Rempel H, Calosing C, Sun B, Pulliam L. Sialoadhesin expressed on IFN-induced monocytes binds HIV-1 and enhances infectivity. *PLoS One*. 2008;3:1–9.
 20. Farina A, Peruzzi G, Lacconi V, Lenna S, Quarta S, Rosato E, et al. Epstein-Barr virus lytic infection promotes activation of Toll-like receptor 8 innate immune response in systemic sclerosis monocytes. *Arthritis Res Ther*. 2017;19. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5331713/>. Accessed December 2, 2019:39.
 21. Jans J, Unger WWJ, Vissers M, Ahout IML, Schreurs I, Wickenhagen A, et al. Siglec-1 inhibits RSV-induced interferon gamma production by adult T cells in contrast to newborn T cells. *Eur J Immunol*. 2018;48:621–31.
 22. Theobald SJ, Khailaie S, Meyer-Hermann M, Volk V, Olbrich H, Danisch S, et al. Signatures of T and B cell development, functional responses and PD-1 Upregulation after HCMV latent infections and reactivations in nod.Rag.Gamma mice humanized with cord blood CD34+ cells. *Front Immunol*. 2018;9:1–21. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6262073/>. Accessed December 2, 2019.
 23. Green AM, Harris E. Monocyte-plasmablast crosstalk during dengue. *Cell Host Microbe*. 2014;16:7–9.
 24. Kwissa M, Nakaya HI, Onlamoon N, Wrammert J, Villinger F, Perng GC, et al. Dengue virus infection induces expansion of a CD14+CD16+ monocyte population that stimulates plasmablast differentiation. *Cell Host Microbe*. 2014;16:115–27.
 25. Hirsch AJ, Smith JL, Haese NN, Broeckel RM, Parkins CJ, Kreklywich C, et al. Zika virus infection of rhesus macaques leads to viral persistence in multiple tissues. *PLoS Pathog*. 2017;13: e1006219.
 26. Cutler AJ, Oliveira J, Ferreira RC, Challis B, Walker NM, Caddy S, et al. Capturing the systemic immune signature of a norovirus infection: an n-of-1 case study within a clinical trial. *Wellcome Open Res*. 2017;2. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5531165/>. Accessed December 2, 2019:28.
 27. Caballero IS, Yen JY, Hensley LE, Honko AN, Goff AJ, Lassa CJH. Marburg viruses elicit distinct host transcriptional responses early after infection. *BMC Genomics*. 2014;15. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4232721/>. Accessed December 2, 2019:960.
 28. Liang SY, Theodoro DL, Schuur JD, Marschall J. Infection prevention in the emergency department. *Ann Emerg Med*. 2014;64:299–313.
 29. Ventola CL. The antibiotic resistance crisis. *P T*. 2015;40:277–83.
 30. Tang Z, Qin D, Tao M, Lv K, Chen S, Zhu X, et al. Examining the utility of the CD64 index compared with other conventional indices for early diagnosis of neonatal infection. *Sci Rep*. 2018;8:1–7.
 31. Gadotti AC, de Castro Deus M, Telles JP, Wind R, Goes M, Garcia Charello Ossoski R, et al. IFN- γ is an independent risk factor associated with mortality in patients with moderate and severe COVID-19 infection. *Virus Res*. 2020;289:198171.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Bourgoin P, Soliveres T, Barbaresi A, et al. CD169 and CD64 could help differentiate bacterial from CoVID-19 or other viral infections in the Emergency Department. *Cytometry*. 2021;99:435–445. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.24314>

An ultra-sensitive, ultra-fast whole blood monocyte CD169 assay for COVID-19 screening

Moïse Michel^{1,2*#}, Fabrice Malergue^{3*}, Inès Ait Belkacem³, Pénélope Bourgoïn³, Pierre-Emmanuel Morange⁴, Isabelle Arnoux⁴, Tewfik Miloud³, Matthieu Million^{1,2}, Hervé Tissot-Dupont², Jean-Louis Mege^{1,2}, Jean-Marc Busnel³, Joana Vitte^{1,2}

1 Aix-Marseille Univ, IRD, APHM, MEPHI, Marseille, France

2 IHU Méditerranée Infection, Marseille, France

3 Beckman Coulter, Marseille, France

4 C2VN Aix Marseille Univ INSERM, INRAE, APHM Hôpitaux Universitaires de Marseille, Hôpital Timone, Service d'hématologie, Marseille, France

** MM and FM contributed equally to the paper*

Corresponding author:

Dr. Moïse Michel

Unité d'immuno-allergologie

IHU Méditerranée Infection

19-21 boulevard Jean Moulin

13005 Marseille, France

moise0michel@gmail.com

Phone : +33413732051

Number of words: 3,350 / 4,000

Number of figures: 3

Number of tables: 1

Conflict of interest: TM, JMB, IAB, PB and FM are employees of Beckman Coulter Life Sciences. JV has received speaker and consultancy fees from Meda Pharma, Mylan, Sanofi, Thermo Fisher, Beckman Coulter, outside this work. The other authors declare no conflict of interest related to this work.

Abstract:

CoVID-19 is an unprecedented epidemic, globally challenging health systems, societies, and economy. Its diagnosis relies on molecular methods, with drawbacks revealed by current use as mass screening. Monocyte CD169 upregulation has been reported as a marker of viral infections, we evaluated a flow cytometry three-color rapid assay of whole blood monocyte CD169 for CoVID-19 screening.

Outpatients (n=177) with confirmed CoVID-19 infection, comprising 80 early-stage (≤ 14 days after symptom onset), 71 late-stage (≥ 15 days), and 26 asymptomatic patients received whole blood CD169 testing in parallel with SARS-CoV-2 RT-PCR. Upregulation of monocyte CD169 without polymorphonuclear neutrophil CD64 changes was the primary endpoint. Sensitivity was 98% and 100% in early-stage and asymptomatic patients respectively, specificity was 50% and 84%. Rapid whole blood monocyte CD169 evaluation was highly sensitive when compared with RT-PCR, especially in early-stage, asymptomatic patients whose RT-PCR tests were not yet positive.

Diagnostic accuracy, easy finger prick sampling and minimal time-to-result (15-30 minutes) rank whole blood monocyte CD169 upregulation as a potential screening and diagnostic support for CoVID-19.

Secondary endpoints were neutrophil CD64 upregulation as a marker of bacterial infections and monocyte HLA-DR downregulation as a surrogate of immune fitness, both assisting with adequate and rapid management of non-CoVID cases.

Number of words: 199 / 200

1 **Introduction**

2 Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), causing coronavirus disease 2019 (CoVID-
3 19) is a historic global epidemic that continues to spread one year after having emerged (1). Its control
4 requires targeted protection, distancing, and isolation. Aiming at selective isolation of subjects with a
5 confirmed infection, a policy of massive diagnostic testing has been put in place in many countries. Ideally,
6 this should allow any person to receive a prompt and straightforward answer at the time of symptom
7 onset or contact tracing. This diagnosis is essentially based on molecular (reverse transcriptase-
8 polymerase chain reaction (RT-PCR)) tests that detect viral RNA in a sample taken from the back of the
9 nose or throat. Despite being the gold standard, RT-PCR has limitations. Firstly, the sensitivity is not
10 optimal (2), mainly due to sampling quality and to the delay between contamination and colonization of
11 the upper ear, nose, and throat area. Patients may receive a false negative result putting those around
12 them at risk. Secondly, although RT-PCR is a fairly fast technique (1 to a few hours), laboratory saturation
13 due to massive screening policies is leading to significant delays in sampling, processing, and result
14 delivery, which may directly jeopardize distancing policies or unnecessarily hinder social and professional
15 activity. Thirdly, deep nasal swabbing is unpleasant for the patient and potentially dangerous for the
16 sampler. Finally, RT-PCR remains quite expensive. As a result and while massive testing is a required pillar
17 for the fight against the pandemic, considerable efforts are made in search of efficient diagnostic aid
18 solutions for mass testing strategies.

19 Antigenic tests of viral proteins are cheaper than RT-PCR, faster, and some can be performed on salivary
20 samples that are easier to access and allow testing at home. However, their sensitivity is low, especially
21 when using saliva instead of a nasal swab (3, 4). On the other hand, serological tests do not inform on
22 actual carriage of the virus, are positive at least one week post-infection and lack sensitivity (5).

23 In this context, harnessing immune markers of leukocyte activation is a promising tool. Indeed, leukocytes
24 detect and rapidly respond to infection with secreted and surface activation molecules. We and others
25 have previously reported that acute viral infections induce the appearance of CD169 (Siglec-1,
26 sialoadhesin) at the surface of blood monocytes (6, 7). Monocyte CD169 expression is upregulated by type
27 1 interferons (8), produced by locally attacked tissues, and is found in all circulating blood monocytes,
28 allowing its detection in minimal blood volumes such as a drop of blood at the fingertip. CD169
29 upregulation has been found in patients with HIV (9), EBV (10), RSV (11), CMV (12), Dengue (13, 14), Zika
30 (15), noroviruses (16), Lassa and Marburg (17). Transcriptomic and mass cytometry studies have identified
31 CD169 as a relevant biomarker for CoVID-19 (18, 19). The first evaluation by flow cytometry on patients
32 not only confirmed CD169 as a SARS-CoV-2 infection marker, but also showed that its expression was
33 much higher than for any other virus tested so far (20, 21).

34 Having developed a rapid (15 min) and affordable assay to measure monocyte CD169 upregulation in a
35 few microliters of blood (22), we set out to assess its diagnostic efficacy in a large cohort of CoVID-19-
36 confirmed patients, with SARS-CoV-2 RT-PCR as the reference method. This assay evaluated in parallel
37 two other immune markers: upregulation of CD64 on polymorphonuclear neutrophils, which is widely
38 used as an indicator of bacterial infection (23), and expression of HLA-DR on monocytes, which reflects
39 the general state of the immune system (24): increased when activated by a pathogen (viral or bacterial),
40 and decreased if the immune system is "exhausted" by a severe infection (e.g. sepsis).

41 Results and Discussion

42 On the basis of the clinical and laboratory results, the 177 RT-PCR-confirmed SARS-CoV-2 patients were
43 sorted into 3 groups: patients who presented at an early stage of the disease (less than 14 days after
44 symptoms onset, n=80, group 1), those at a later stage of the disease (with a median of 19 days after
45 symptoms onset (range 14-48), n=71, group 2), and asymptomatic patients (n=26, group 3). In each group,
46 patients were further separated according to the concomitant RT-PCR results (**Figure 1**).

47 CD169 expression was significantly higher in groups 1 and 3 as compared to group 2, with a median index
48 of 17 (range 2.1-46.0, interquartile range IQR 4-31) and 2.8 (range 1.7-43.0, IQR 2.3-18.8) versus 2.3 (range
49 1.7-20.0, IQR 2.1-2.6), $p < 0.001$. Using the previously established threshold of 3.5 for CD169 index (20), we
50 observed that 23/25 (92%) healthy controls samples obtained from the blood bank were negative, with 2
51 outliers.

52 In the first group of CoVID-19 patients (early stage), the CD169 index was higher than the 3.5 threshold in
53 80% of patients (64/80) (**Figure 1A**), while concomitant RT-PCR detected the virus (new cases), or
54 confirmed it (re-tested cases), in 65% of patients (52/80). Among the 16 CD169-negative early-stage
55 patients, 15 also had a negative concomitant RT-PCR. Sensitivity was 98%, with one patient exhibited a
56 CD169 index below the threshold but a positive nasopharyngeal RT-PCR in the swab. Review of laboratory
57 data for this patient showed very low and decreasing RNA quantities (cycle threshold (Ct) at 34.5 and 33.5,
58 respectively 24 and 48 hours earlier), suggesting a near complete viral clearance. In line with this
59 observation, the 15 other CD169 negative samples had been collected 6 to 14 days after the onset of
60 symptoms, and the corresponding RT-PCR were also negative. Thus, sensitivity of monocyte CD169 was
61 98% when compared to RT-PCR.

62 In the second group (late stage), CD169 and RT-PCR were positive in only 7% of patients (5/71), in which
63 the RT-PCR were negative (**Figure 1B**), indicating that CD169 expression returns to baseline levels upon
64 viral clearance.

65 In the third group (asymptomatic cases), significant CD169 upregulation was detected in 46% of patients
66 (12/26), at levels similar to those of group 1 comprising recent infections (**Figure 1C**), while concomitant
67 RT-PCR was positive in 35% of patients (9/26). All nine PCR positive cases were detected unambiguously.
68 It is remarkable that almost half of asymptomatic patients, who made up 15% of the study cohort,
69 expressed CD169 at the same level as patients experiencing symptoms. Indeed, the area under the curve
70 (AUC) and overall performances, as displayed in **Figure 1D**, were similar for groups 1 and 3 (AUC at 0.93
71 and 0.95; sensitivity at 98 and 100 %; specificity at 50 and 82 %; positive predictive value (PPV) at 78 and
72 75 %; negative predictive value (NPV) at 93 and 100%, respectively for group 1 and 3) while CD169 index
73 did not display good performance for patient with late stage disease (AUC at 0.58).

74 These findings suggest that despite the absence of symptoms, a systemic response orchestrating infection
75 control takes place, rather than a purely local control of the infection (resistant tissue and/or tissue
76 immunity).

77 There was only a weak correlation between CD169 level and RT-PCR Ct (**Figure 2**). Still, the few CD169
78 negative patients were found among the weakest RT-PCR Ct.

79 Neutrophil CD64 expression, a marker of bacterial infections, was unchanged in 75% of the cases and
80 weakly upregulated in 25% of the cases (45/177), showing no significant differences between groups (23,
81 27, and 31% respectively). Within this cohort of outpatients presenting with mild disease, HLA-DR was
82 expressed at normal or slightly increased levels, an expected finding as opposed to the decrease usually
83 observed in severe cases(25). (**Figure 3**).

84 The sensitivity of monocyte CD169 upregulation was almost equivalent to RT-PCR for early-stage patients
85 and asymptomatic patients. There was a high percentage (80%) of positive CD169 results in early-stage
86 patients, peaking at 98.5% during the first week. As exemplified by these cases, false negative RT-PCR has
87 a frequent occurrence, in agreement with the commonly described false negative rates ranging from 10
88 to 30%(5).

89 Considering the main screening target, *i.e.*, recent symptomatic cases (within 7 days) with a positive RT-
90 PCR the same day (n=49) or less than 48 h prior to or following CD169 assessment (n=54), 98.5% were
91 identified through monocyte CD169 upregulation, with an unambiguous median index of 22.

92 Monocyte CD169 upregulation as a specific marker of viral infection was previously shown to outperform
93 routine biomarkers (C-reactive protein, leukocyte counts, etc.). Indeed, CD169 elevation is restricted to
94 acute viral infection(20). Virological identification of the culprit species, *i.e.* SARS-CoV-2 RT-PCR, remains
95 necessary. Data obtained in the present study demonstrate that a testing strategy leveraging monocyte
96 CD169 upregulation as a triage test could be designed. Taking into account the sensitivity of the assay and
97 the current positivity rate of RT-PCR tests, ranging from 1 to 10%, a CD169-based screening could help
98 prioritize true positives by a factor of 10 to 100, thereby opening the perspective to decrease the pressure
99 currently observed on the health system.

100 Further advantages of monocyte CD169 assay are: 1. Better sensitivity that reduces or avoids false
101 negative results. 2. Finger prick or venous blood sampling (easier, less painful, less dangerous, and without
102 risk of failure). 3. A rapid result (15 minutes) allowing an immediate response to the consultation. 4.
103 Affordable reagents and lighter logistics. 5. Not using a closed system, as the assay is supported by most
104 flow cytometers equipping clinical laboratories.

105 Screening for monocyte CD169 upregulation could alleviate the load on specialized RT-PCR services and
106 reduce overall costs, while making the sample collection step easier for the greatest number of people.

107 One can even consider solutions where tests are performed at home and then sent to central laboratories
108 by mail or carrier, since this antibody cocktail can be unitized and dried in tubes in a ready to use format
109 stable at room temperature (Duraclone technology®, Beckman-Coulter Life Sciences).

110 From a more fundamental standpoint, considering the close relationship between type I interferon based
111 signaling and monocyte CD169 expression, the latter marker could be employed as a surrogate for this
112 cytokine family. If so, in the light of recent publications(26, 27) demonstrating the critical role of type I
113 interferons in viral infections in general and in CoVID-19 in particular, rapid assessment of monocyte
114 CD169 upregulation could help stratify patients and identify those at higher risk of developing more severe
115 forms of COVID-19.

116 Combined detection of monocyte CD169 for viral infections, neutrophil CD64 for bacterial infections, and
117 monocyte HLA-DR for immune status allows the referral of non-CoVID-19 cases to an adequate and rapid
118 management. Moreover, the variety of neutrophil CD64 and monocyte HLA-DR levels observed in CoVID-
119 19 patients may help identify patients at risk for developing more severe disease. This hypothesis would
120 deserve a larger and longitudinal study.

121 The main strengths of this study are its outpatient design, its large sample size and the confirmation of
122 SARS-CoV-2 infection with multiple RT-PCR. However, performing the comparison in real screening
123 settings (finger pricks instead of venous blood) would provide further confirmation on the performance
124 of the proposed assay. Prospective studies fulfilling this criterion and including further categories of
125 patients (pediatric, comorbidities) are now required to fully assess the capabilities and possible
126 limitations of this assay.

127 **Methods**

128 *Samples:* This non-interventional study was conducted in the immunology laboratory of the
129 IHU Méditerranée Infection (Assistance Publique – Hôpitaux de Marseille, Marseille, France) on leftover
130 samples from 177 consecutive patients aged 16 or older with RT-PCR-confirmed SARS-CoV-2 infection (at
131 least one positive SARS-CoV-2 RT-PCR in nasopharyngeal swabs or tracheal aspiration).

132 Blood samples used in the flow cytometry study were obtained from patients being either first
133 presentations, patients re-tested after a positive test in another laboratory, or positive patients re-tested
134 during the clinical follow-up of the infection. Each patient was tested in parallel with a “concomitant RT-
135 PCR” on the same day. Demographic, clinical and laboratory data including date of onset of SARS-CoV-2-
136 related symptoms were collected for each patient retrospectively from electronic medical records.
137 Samples of healthy blood donors (HBD) group served as controls (Convention N°7828, “Etablissement
138 Français du Sang”, Marseille, France)

139 The study was approved by the institutional ethics and GDPR committee, with the reference number
140 PJ4BQH. According to French law, the patients were informed and retained the right to oppose the use of
141 their anonymized medical data for research purposes, but formal consent was not required for this non-
142 interventional study.

143

144 *Flow cytometry*

145 All antibodies and reagents were from Beckman-Coulter Life Sciences (Marseille, France). Leftover EDTA-
146 anticoagulated samples were maintained at room temperature for a maximum of 24 hours prior to flow
147 cytometry investigations. The 3 specific antibodies were pre-mixed in a ready-to-use cocktail (prototype
148 of the IOTest Myeloid Activation CD169-PE/HLA-DR-APC/CD64-PacBlue Antibody Cocktail, Beckman
149 Coulter Life Sciences). The cocktail was then pre-mixed with 0.5 mL of Versalyse RBC lysing solution, and
150 10 µL of blood were added in the reaction tube. The mixture was finally mixed manually. After 10 minutes

151 incubation at room temperature, the samples were analyzed 1 minute on a routine 3 laser Navios flow
152 cytometer from Beckman Coulter Life Sciences (Miami, USA).

153

154 *Data analysis and statistics*

155 Flow cytometry data files were analyzed using the Kaluza software, version 2.1 (Beckman Coulter Life
156 Sciences). Leukocytes were gated using Side Scatter (SSC) and CD64 expression as lymphocytes (low SSC
157 CD64-), monocytes (intermediate SSC CD64+), and neutrophils (high SSC), prior to the analysis of CD169,
158 CD64 and HLA-DR level of expression. The CD169 index was calculated as the ratio of CD169 expression
159 on monocyte vs CD169 expression on lymphocyte (background) signal. Similarly, the CD64 index was
160 calculated as the ratio of neutrophil versus lymphocyte signal. Data were exported to JMP 14.2.0 software
161 (SAS) for statistical analysis. Mean index values of each group were compared via Student's or Kruskal-
162 Wallis tests as appropriate. A two-sided p-value < 0.05 was considered statistically significant.

163 **Author contributions:** JV, TM and PEM designed the study. MoM, IAB and FM conducted experiments and
164 acquired data. MaM and HTD supervised clinical procedures. MoM collected and analyzed demographic,
165 clinical and laboratory data. PB and FM provided antibody panels and PEM and IA the flow cytometry
166 platform. MoM, FM, and JMB analyzed experimental data. FM, MoM, JMB, and JV wrote the manuscript.
167 JLM revised the manuscript for important intellectual content. All authors read and approved the final
168 manuscript.

169 **References**

- 170 1. Zhu N et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.*
171 2020;382(8):727–733.
- 172 2. Woloshin S, Patel N, Kesselheim AS. False Negative Tests for SARS-CoV-2 Infection — Challenges and
173 Implications. *N. Engl. J. Med.* 2020;383(6):e38.
- 174 3. Freeman B et al. Validation of a SARS-CoV-2 spike protein ELISA for use in contact investigations and
175 serosurveillance [Internet]. *bioRxiv* [published online ahead of print: April 25, 2020];
176 doi:10.1101/2020.04.24.057323
- 177 4. Han P, Ivanovski S. Saliva—Friend and Foe in the COVID-19 Outbreak [Internet]. *Diagnostics*
178 2020;10(5). doi:10.3390/diagnostics10050290
- 179 5. Miller TE et al. Clinical sensitivity and interpretation of PCR and serological COVID-19 diagnostics for
180 patients presenting to the hospital. *FASEB J.* 2020;fj.202001700RR.
- 181 6. Bourgoin P et al. Clinical research assessment by flow cytometry of biomarkers for infectious
182 stratification in an Emergency Department. *Biomark. Med.* 2019;13(16):1373–1386.
- 183 7. Bourgoin P et al. Flow cytometry evaluation of infection-related biomarkers in febrile subjects in the
184 emergency department. *Future Microbiol.* 2020;15:189–201.
- 185 8. Bourgoin P, Biéché G, Ait Belkacem I, Morange P, Malergue F. Role of the interferons in CD64 and
186 CD169 expressions in whole blood: Relevance in the balance between viral- or bacterial-oriented
187 immune responses. *Immun. Inflamm. Dis.* 2020;8(1):106–123.
- 188 9. van der Kuyl AC et al. Sialoadhesin (CD169) expression in CD14+ cells is upregulated early after HIV-1
189 infection and increases during disease progression. *PLoS One* 2007;2(2):e257.
- 190 10. Farina A et al. Epstein-Barr virus lytic infection promotes activation of Toll-like receptor 8 innate
191 immune response in systemic sclerosis monocytes. *Arthritis Res. Ther.* 2017;19(1):39.
- 192 11. Jans J et al. Siglec-1 inhibits RSV-induced interferon gamma production by adult T cells in contrast to
193 newborn T cells. *Eur. J. Immunol.* 2018;48(4):621–631.

- 194 12. Theobald SJ et al. Signatures of T and B Cell Development, Functional Responses and PD-1
195 Upregulation After HCMV Latent Infections and Reactivations in Nod.Rag.Gamma Mice Humanized With
196 Cord Blood CD34+ Cells. *Front. Immunol.* 2018;9:2734.
- 197 13. Green AM, Harris E. Monocyte-Plasmablast Crosstalk during Dengue. *Cell Host Microbe*
198 2014;16(1):7–9.
- 199 14. Kwissa M et al. Dengue Virus Infection Induces Expansion of a CD14+CD16+ Monocyte Population
200 that Stimulates Plasmablast Differentiation. *Cell Host Microbe* 2014;16(1):115–127.
- 201 15. Hirsch AJ et al. Zika Virus infection of rhesus macaques leads to viral persistence in multiple tissues.
202 *PLOS Pathog.* 2017;13(3):e1006219.
- 203 16. Cutler AJ et al. Capturing the systemic immune signature of a norovirus infection: an n-of-1 case
204 study within a clinical trial. *Wellcome Open Res.* 2017;2:28.
- 205 17. Caballero IS et al. Lassa and Marburg viruses elicit distinct host transcriptional responses early after
206 infection. *BMC Genomics* 2014;15(1):960.
- 207 18. Aschenbrenner AC et al. Disease severity-specific neutrophil signatures in blood transcriptomes
208 stratify COVID-19 patients. *medRxiv* 2020;2020.07.07.20148395.
- 209 19. Chevrier S et al. A distinct innate immune signature marks progression from mild to severe COVID-
210 19. *bioRxiv* 2020;2020.08.04.236315.
- 211 20. Bedin A-S et al. Monocyte CD169 expression as a biomarker in the early diagnosis of COVID-19.
212 *medRxiv* 2020;2020.06.28.20141556.
- 213 21. Vetter P et al. Daily viral kinetics and innate and adaptive immune responses assessment in COVID-
214 19: a case series. *medRxiv* 2020;2020.07.02.20143271.
- 215 22. Bourgoin P et al. A novel one-step extracellular staining for flow cytometry: Proof-of-concept on
216 sepsis-related biomarkers. *J. Immunol. Methods* 2019;470:59–63.
- 217 23. Li S et al. Neutrophil CD64 expression as a biomarker in the early diagnosis of bacterial infection: a
218 meta-analysis. *Int. J. Infect. Dis.* 2013;17(1):e12–e23.

- 219 24. Venet F, Lukaszewicz A-C, Payen D, Hotchkiss R, Monneret G. Monitoring the immune response in
220 sepsis: a rational approach to administration of immunoadjuvant therapies. *Curr. Opin. Immunol.*
221 2013;25(4):477–483.
- 222 25. Vitte J et al. A granulocytic signature identifies COVID-19 and its severity [Internet]. *J. Infect. Dis.*
223 doi:10.1093/infdis/jiaa591
- 224 26. Bastard P et al. Auto-antibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19.
225 *Science* [published online ahead of print: September 24, 2020]; doi:10.1126/science.abd4585
- 226 27. Lee JS et al. Immunophenotyping of COVID-19 and influenza highlights the role of type I interferons
227 in development of severe COVID-19. *Sci. Immunol.* 2020;5(49). doi:10.1126/sciimmunol.abd1554
- 228

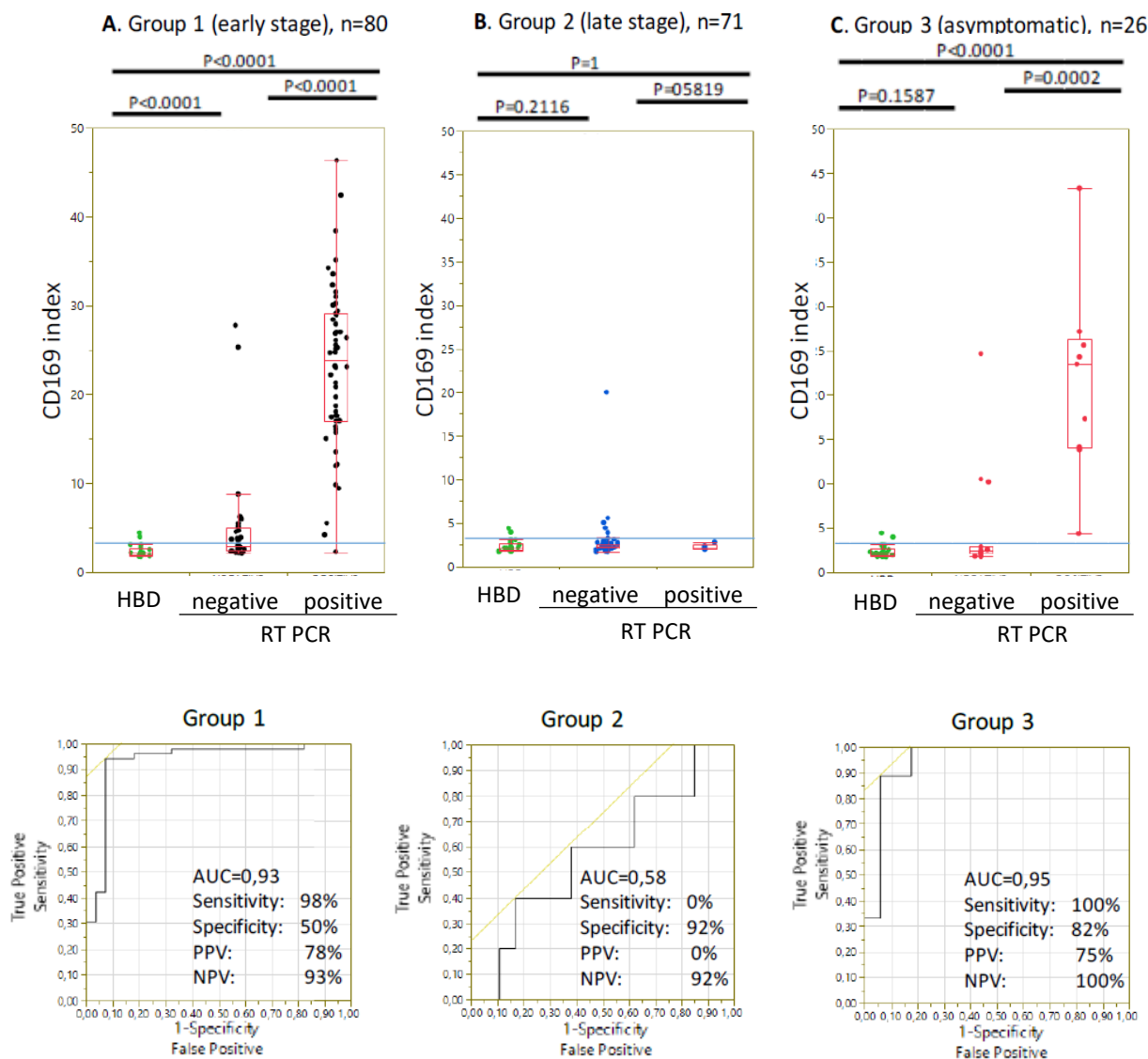


Figure 1. Expression of monocyte CD169 in CoVID-19 patients according to disease stage and SARS-CoV-2 RT-PCR results, compared to healthy blood donors.

Box plots summarizing the level of CD169 index (ratio of monocyte vs lymphocyte signals) in Healthy Blood Donors (HBD, n=25, green dots) vs CoVID-19 patients at an early stage (A, black dots), late stage (B, blue dots), or asymptomatic (C, red dots). The blue line indicates the positivity threshold (3.5). Box-and-whisker plots come from the first to the third quartile and are cut by the median; segments at the end are extreme values. These 3 CoVID-19 groups are further split according to the concomitant RT-PCR results. ROC curves are calculated for each (D), then sensitivity, specificity, PPV, and NPV at the 3.5 threshold value.

AUC: Area Under the Curve; HBD: healthy blood donors; PPV: positive predictive value; NPV: negative predictive value

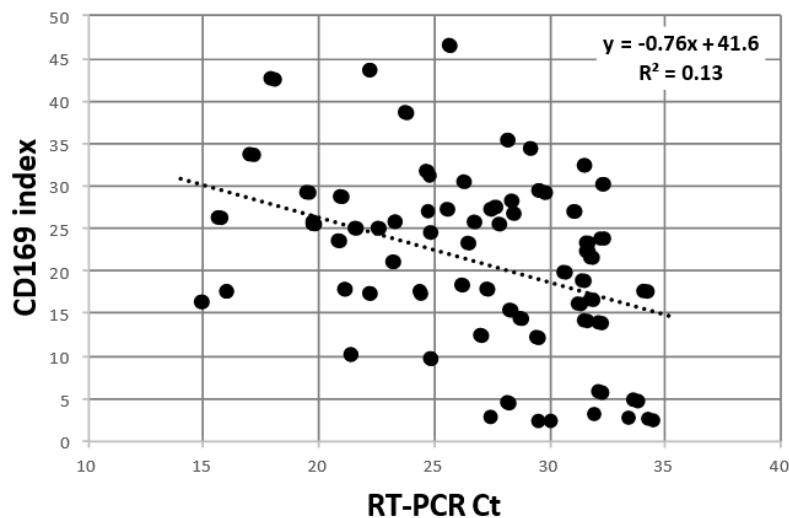


Figure 2. Correlation plot between concomitant SARS-CoV-2 RT-PCR Ct and CD169 index.

Upregulation of monocyte CD169, expressed as CD169 index of monocyte-to-lymphocyte CD169 expression, was inversely correlated with SARS-CoV-2 Ct, itself inversely correlated with the patient's viral load.

Ct, cycle threshold.

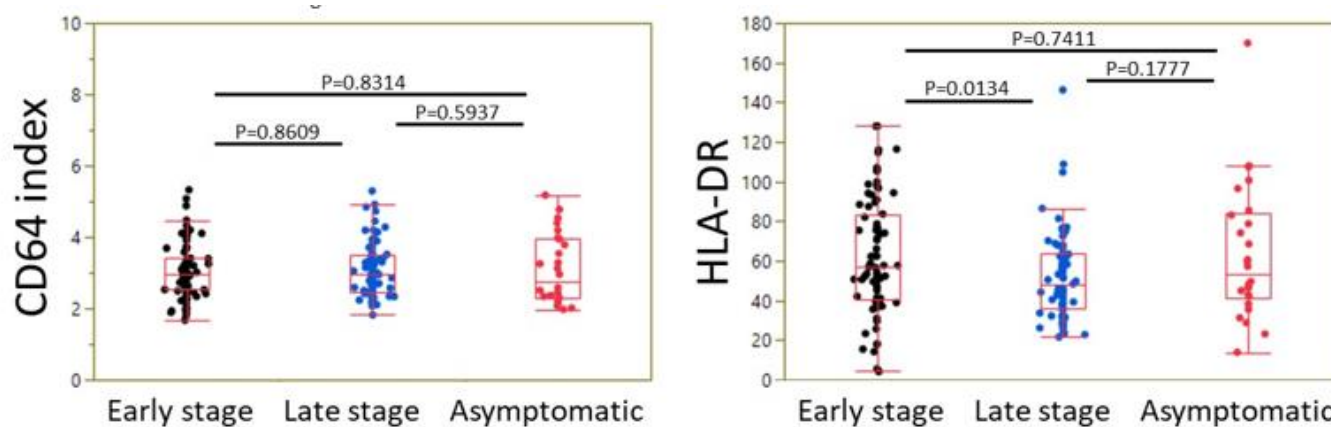


Figure 3. Expression of neutrophil CD64 and monocyte HLA-DR in COVID-19 patients as a function of disease stage.

Box plots summarizing the level of CD64 index (ratio of neutrophil vs lymphocyte signals) (A) and HLA-DR signal on monocytes (B) in COVID-19 patients at an early stage, at a late stage, or asymptomatic, are shown. Box-and-whisker plots come from the first to the third quartile and are cut by the median; segments at the end are extreme values.

Table 1. Demography of the study cohort.







Early stage is defined as the 14 first days from symptom onset; late stage is defined as 15 days or later after symptom onset. Data are presented as median and 5th-95 th percentiles.

NA, not applicable; Nb: Number

	Early stage	Late stage	Asymptomatic	Total	p-value
n	80	71	26	177	
Age	45.8 (19.4 – 81.9)	45.0 (22.3 – 68.7)	45.0 (20.5 – 61.3)	45.3 (20.5 – 69.6)	0.98
M/F gender ratio	0.82	0.61	1.89	0.82	0.056
Time from symptom onset	6 (2 – 14)	20 (15 – 37)	NA	16 (3 – 35)	10^{-17}
Nb of SARS-CoV-2 RT-PCR positive	52 (65 %)	5 (7.04 %)	9 (34.62 %)	76 (42.94 %)	10^{-12}
SARS-CoV-2 RT-PCR Ct value	27.25 (17.60 – 32.39)	30.20 (28.02 – 33.38)	27.70 (18.58 – 33.30)	27.65 (17.33 – 33.40)	0.21

Article

High CD169 Monocyte/Lymphocyte Ratio Reflects Immunophenotype Disruption and Oxygen Need in COVID-19 Patients

Antonella Minutolo ¹, Vita Petrone ^{1,†}, Marialaura Fanelli ^{1,†}, Marco Iannetta ^{2,3}, Martina Giudice ¹, Ines Ait Belkacem ^{4,5}, Marta Zordan ^{2,3}, Pietro Vitale ³, Guido Rasi ¹, Paola Sinibaldi-Vallebona ^{1,6}, Loredana Sarmati ^{2,3}, Massimo Andreoni ^{2,3}, Fabrice Malergue ⁵, Emanuela Balestrieri ¹, Sandro Grelli ^{1,7} and Claudia Matteucci ^{1,*}

- ¹ Department of Experimental Medicine, University of Rome Tor Vergata, 00133 Rome, Italy; antonella.minutolo@uniroma2.it (A.M.); vita.petrone01@gmail.com (V.P.); fanellimarialaura@gmail.com (M.F.); giudicemartina94@gmail.com (M.G.); guidorasi@hotmail.com (G.R.); sinibaldi-vallebona@med.uniroma2.it (P.S.-V.); balestrieri@med.uniroma2.it (E.B.); grelli@med.uniroma2.it (S.G.)
- ² Department of Systems Medicine, University of Rome Tor Vergata, 00133 Rome, Italy; marco.iannetta@uniroma2.it (M.I.); marta.zordan91@gmail.com (M.Z.); sarmati@med.uniroma2.it (L.S.); andreoni@uniroma2.it (M.A.)
- ³ Infectious Diseases Clinic, Policlinic of Tor Vergata, 00133 Rome, Italy; pietro_vitale@outlook.it
- ⁴ CNRS, INSERM, CIML, Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, Aix Marseille Université, 13009 Marseille, France; itbelkacem@beckman.com
- ⁵ Department of Research and Development, Beckman Coulter Life Sciences-Immunotech, 13009 Marseille, France; fmalergue@beckman.com
- ⁶ Institute of Translational Pharmacology, National Research Council, 00133 Rome, Italy
- ⁷ Virology Unit, Policlinic of Tor Vergata, 00133 Rome, Italy
- * Correspondence: matteucci@med.uniroma2.it
- † Equally contribute.



Citation: Minutolo, A.; Petrone, V.; Fanelli, M.; Iannetta, M.; Giudice, M.; Ait Belkacem, I.; Zordan, M.; Vitale, P.; Rasi, G.; Sinibaldi-Vallebona, P.; et al. High CD169 Monocyte/Lymphocyte Ratio Reflects Immunophenotype Disruption and Oxygen Need in COVID-19 Patients. *Pathogens* **2021**, *10*, 1639. <https://doi.org/10.10121639>

Academic Editors: Hinh Ly and Lawrence S. Young

Received: 18 September 2021
Accepted: 15 December 2021
Published: 18 December 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Background: Sialoadhesin (CD169) has been found to be overexpressed in the blood of COVID-19 patients and identified as a biomarker in early disease. We analyzed CD169 in the blood cells of COVID-19 patients to assess its role as a predictive marker of disease progression and clinical outcomes. Methods: The ratio of the median fluorescence intensity of CD169 between monocytes and lymphocytes (CD169 RMFI) was analyzed by flow cytometry in blood samples of COVID-19 patients (COV) and healthy donors (HDs) and correlated with immunophenotyping, inflammatory markers, cytokine mRNA expression, pulmonary involvement, and disease progression. Results: CD169 RMFI was high in COV but not in HDs, and it correlated with CD8 T-cell senescence and exhaustion markers, as well as with B-cell maturation and differentiation in COV. CD169 RMFI correlated with blood cytokine mRNA levels, inflammatory markers, and pneumonia severity in patients who were untreated at sampling, and was associated with the respiratory outcome throughout hospitalization. Finally, we also report the first evidence of the specific ability of the spike protein of SARS-CoV-2 to trigger CD169 RMFI in a dose-dependent manner in parallel with IL-6 and IL-10 gene transcription in HD PBMCs stimulated in vitro. Conclusion: CD169 is induced by the spike protein and should be considered as an early biomarker for evaluating immune dysfunction and respiratory outcomes in COVID-19 patients.

Keywords: cytokine storm; COVID-19; CD169; inflammation; respiratory outcome; T-cell exhaustion; COVID-19 therapy

1. Introduction

Coronavirus disease-19 (COVID-19), caused by severe acute respiratory coronavirus-2 (SARS-CoV-2), has led to a global pandemic characterized by high morbidity and mortality.

As a consequence of derailed cellular and humoral immune-response activation, numerous individuals develop persistent inflammation associated with a cytokine storm and diffuse organ involvement, mainly associated with severe disease, including acute respiratory distress syndrome (ARDS) [1]. Currently, there are generally accepted clinical guidelines for monitoring infected patients, criteria for hospitalization, several available treatments, and critical-care protocols that have proven effective in reducing mortality [2–4], but the heterogeneity of the disease amplifies the need to identify early biomarkers to predict disease progression and guide personalized interventions.

In response to SARS-CoV-2 infection, host cells immediately produce cytokines, including type I interferon (IFN-I), which, in addition to showing antiviral activity, induces the expression of genes involved in limiting the viral spread. After antiviral cytokines are released, sialoadhesin (CD169, also known as SIGLEC-1) is induced and expressed on the surfaces of myeloid lineage cells, such as dendritic cells and monocytes [5,6]. In particular, the two-fold upregulation of CD169 in monocytes (mCD169) exposed to IFN α in vitro has been observed [7].

Previous studies have demonstrated an important role of CD169/SIGLEC-1 in different viral infections, including those from Ebola virus and human immunodeficiency virus (HIV) [8–11]. Recently, it was suggested that SARS-CoV-2 infects macrophages, particularly CD169-positive macrophages residing in the spleen and lymph nodes, and that this peculiar macrophage cell subpopulation plays a central role in mediating SARS-CoV-2 translocation [12]. Moreover, increased expression of CD169 has been observed in monocytes from COVID-19 patients. In observational studies conducted during the COVID-19 outbreak in France, mCD169 expression, as well as the median fluorescence intensity of CD169 between monocytes and lymphocytes (CD169 RMFI), were also associated with the SARS-CoV-2 infection in patients at hospital admission, underlining its importance as an early infection biomarker [13–16].

To further investigate CD169 as a contributing factor in SARS-CoV-2 infection and COVID-19 disease, CD169 RMFI was evaluated in COVID-19 patients hospitalized in the Policlinic of Tor Vergata in Rome and correlated with their inflammatory and immunological statuses, as well as respiratory outcomes.

2. Results

2.1. Flow Cytometry Analysis of CD169 Expression in COVID-19 Patients and Healthy Donors

Sixty-eight (68) hospitalized patients who tested positive for SARS-CoV-2 RNA (COV) were screened for CD169 expression using flow cytometry and compared to 57 healthy donors (HDs). The MFI of CD169 was not significantly changed in lymphocytes, whereas it increased in monocytes from COVID patients compared with healthy donors ($p = 0.010$) (Supplementary Figure S1A and Table 1). The ratio of the MFI of CD169 between monocytes and lymphocytes (CD169 RMFI) was calculated as described in the Methods section and also referred to in previously published studies [13,15]. Figure 1A shows the distribution of CD169 RMFI in the HD and COV groups, demonstrating CD169 RMFI is higher in patients with COVID compared to HDs, and this difference is statistically significant (Table 1, $p < 0.001$). The accuracy with which CD169 RMFI and CD169 MFI in monocytes (mCD169) could distinguish the COVID-19 patients from HDs was studied via the receiver operating characteristic curve (ROC curve). With a cut-off of 3.01, CD169 RMFI showed an AUC = 0.925 ($p < 0.001$), a sensitivity of 97%, and a specificity of 92%. With a cut-off of 6163, mCD169 MFI showed an AUC = 1, with a $p = 0.023$ (Supplementary Figure S1, Supplementary Table S1), a sensitivity of 100%, but with a lower specificity (83%) when compared to CD169 RMFI).

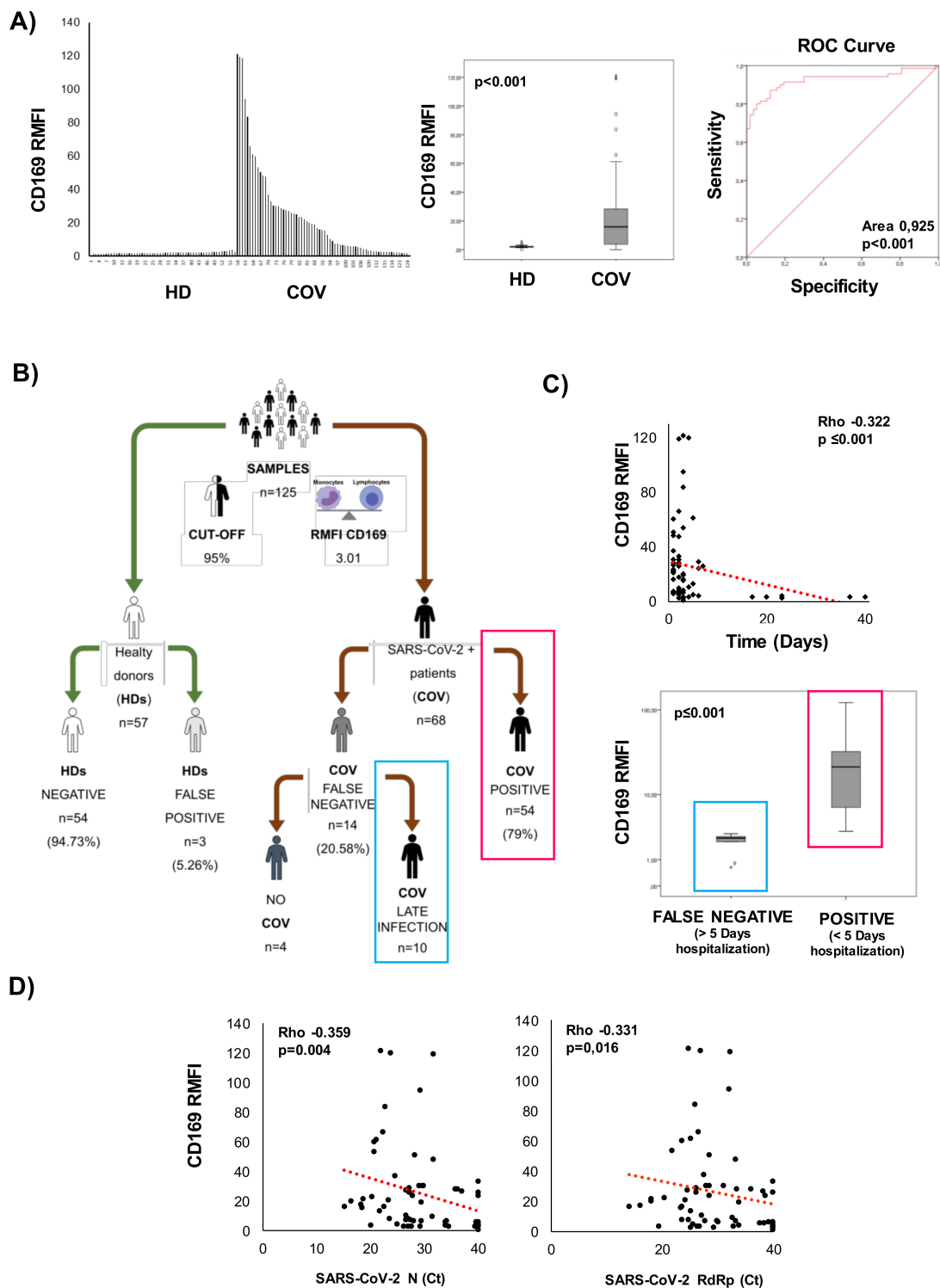


Figure 1. CD169 analysis by flow cytometry to discriminate COVID-19 patients. The ratio of the MFI of CD169 between monocytes and lymphocytes (RMFI) was used in the screening study as described in the Methods section and in Figure S2. (A) CD169 RMFI values in enrolled healthy donors ($n = 57$) and COVID-19 patients ($n = 68$); box plot of the analyzed population; ROC curve for mCD169 MFI and CD169 RMFI; the area under the ROC curve (AUC) is indicated. (B) Workflow of the screening carried out on CD169 expression in collaboration with Policlinic of Tor Vergata of Rome Foundation. (C) Relationship between days of hospitalization and CD169 expression in patients hospitalized for less than 5 days and for more than 5 days before sampling. (D) Scatter plot of SARS-CoV-2 N and RdRp genes detected in swab samples and represented as cycle threshold (Ct). A non-parametric Mann–Whitney test was used to compare groups, and Pearson’s correlation coefficient was calculated. Values were considered statistically significant when $p \leq 0.050$.

Table 1. Median values, interquartile ranges, and non-parametric Kruskal–Wallis and Bonferroni’s corrections of CD169 MFI in lymphocytes, monocytes, and the Ratio of CD169 MFI according to flow cytometry, in healthy donors and in COVID-19 patients.

		COV			HD		
		CD169 MFI Lymphocytes	CD169 MFI Monocytes	CD169 Ratio	CD169 MFI Lymphocytes	CD169 MFI Monocytes	CD169 Ratio
N		64	64	64	57	57	57
Median		3261.85	* 44,190.10	*** 16.65	3037.90	4353.80	2.01
IQR	25	2043.83	18,005.93	5.28	2559.60	1567.80	1.76
	50	3261.85	44,190.10	16.65	3037.90	4353.80	2.01
	75	5185.43	89,203.18	30.12	4498.90	5222.00	2.30

* and *** Significant differences according to non-parametric Kruskal–Wallis and Bonferroni’s correction vs. HD; Values were considered statistically significant when $p \leq 0.050$; interquartile range (IQR).

As shown in Figure 1B, 94.73% of the HD samples were confirmed negative. Among COV, 79% of the patients ($n = 68$) were positive for CD169 RMFI, and 20.58% ($n = 14$) were found to have CD169 RMFIs below the cut-off. Pearson’s correlation coefficient analysis revealed an inverse correlation between the days of hospitalization and CD169 RMFI value, confirming the relevance of RMFI CD169 measurement in the early phases of the infection (more than 10 days, compared to 4 days in the positive group; $p < 0.001$, Figure 1C). Of the 14 false-negative samples, 10 were from patients who had been hospitalized for more than 5 days before testing. The remaining four patients presented symptoms consistent with COVID-19 at the time of nasopharyngeal swab testing, but were not confirmed as SARS-CoV-2 positive after the diagnosis of SARS-CoV-2 infection by real-time PCR. The 14 false-negative samples were excluded from the study. Moreover, the CD169 RMFI in COV was inversely correlated with the mRNA levels for the Nucleoprotein (N) and RNA-dependent-RNA polymerase (RdRp) SARS-CoV-2 genes (Figure 1D).

2.2. Demographics and Clinical Classification of COVID-19 Patients

We analyzed the clinical statuses at enrollment and the respiratory outcomes of 54 COVID-19 patients who were hospitalized at the Policlinic of Tor Vergata between May and October 2020 (Table 2 (a) and (b)).

Table 2. Classification of COVID-19 patients at enrollment.

(a) Demographics, clinical status at enrollment and treatment				
		Paucisymptomatic *	Symptomatic **	Total
	Number	19	35	54
	Age (Mean \pm SD)	59 \pm 13	61 \pm 17	60 \pm 15
	Sex (M/F)	12/7	29/6	41/13
	Hospitalization (Days) ⁺	3.5 \pm 2	6 \pm 10	4.54 \pm 7.54
Pneumonia	None ***	5	7	12
	P	5	11	16
	MiP	6	0	6
	BiP	6	17	23
Comorbidities	None	5	4	10
	Obesity	2	6	8
	Diabetes	3	6	9
	Cardiovascular	10	9	19
	Others ****	9	6	15
Mortality	No treatment	0	6	6
	Treatment	14	17	31
	(Antiviral and Corticosteroid)	2	18	23

Table 2. Cont.

(b) Hematology (1) and biochemistry (2) at enrollment, and respiratory outcomes (3)		
(1) Hematology	Paucisymptomatic	Symptomatic
Red blood cells (4.40–6.00) $10^6/\mu\text{L}$	4.32 ± 0.07	4.76 ± 0.43
Hemoglobin (13.00–18.00) g/dL	13 ± 1.36	13.68 ± 2.10
White blood cells (4.30–10.80) $10^5/\mu\text{L}$	3.21 ± 1.43	7.15 ± 1.28
Neutrophils Abs count % (40–75)	2.65 ± 1.25 56.6 ± 17	5.83 ± 2.55 78.89 ± 1.83⁺⁺
Lymphocytes Abs count % (20–45)	2.05 ± 0.23 26.03 ± 10.00	0.07 ± 0.57 14.59 ± 2⁺⁺
Monocytes Abs count % (3.4–11)	0.38 ± 0.18 8.96 ± 5.7	0.43 ± 0.40 6.12 ± 2.6
Eosinophils Abs count % (0–7)	0.08 ± 0.13 2.1 ± 3.7	0.013 ± 0.3 1.0 ± 3.60
Basophils Abs count % (0–1.5)	0.015 ± 0.01 0.35 ± 0.2	0.014 ± 0.01 0.19 ± 0.07
(2) biochemistry	Paucisymptomatic	Symptomatic
Fibrinogen (200–400) mg/dL	460 ± 171	527 ± 1.3⁺⁺
Antithrombin III % (75–128)	100 ± 3	101 ± 19
D-dimers (0–500) ng/mL	745 ± 633	1133 ± 91⁺⁺
Glucose (70–100) mg/dL	101 ± 32	119 ± 51
BUN (15–40) mg/dL	41 ± 28	65 ± 40⁺⁺
AST (5–34) U/L	27 ± 11	44 ± 46
ALT (0–55) U/L	24 ± 17	107 ± 63⁺⁺
LDH (125–220) U/L	234 ± 71	438 ± 21⁺⁺
C-reactive protein (CRP) (0–5) mg/L	25 ± 22	49 ± 49⁺⁺
Lipase (8–78) U/L	55 ± 47	110 ± 64⁺⁺
Amylase (25–125) U/L	70 ± 32	110 ± 53 ⁺⁺
(3) Respiratory outcome⁺⁺⁺	Paucisymptomatic	Symptomatic
None [∞]	27	0
NC/VMK	0	12
NIV/C-PAP/OTI	0	15

* Defined as paucisymptomatic (PS), including at least one COVID-19-related symptom, such as cough or fever, and not showing signs of pneumonia on physical examination. ** Defined as symptomatic: Mild ($n = 13$), Moderate ($n = 12$), and Severe ($n = 10$), as described in the text. * Days between start of hospitalization and enrollment in the study. *** None = no pneumonia, P = no interstitial pneumonia, MiP = monolateral or minimal interstitial pneumonia, BiP = bilateral interstitial pneumonia, **** other comorbidities or habits: solid organ replacement, gastrointestinal, smoking. Numbers in bold: values of analysis outside the reference ranges. One-sample *t*-tests were performed. ⁺⁺ Mann–Whitney U test paucisymptomatic vs. symptomatic; $p \leq 0.01$. Respiratory outcome ⁺⁺⁺ (the maximum need for oxygen throughout the duration of hospitalization). [∞] None = no oxygen support, NC/VMK = nasal cannula/venturi mask, NIV/C-PAP = non-invasive ventilation, or OTI = invasive ventilation.

The cohort of patients was divided into two groups, paucisymptomatic (PS) and symptomatic, according to their clinical features on hospital admission or study enrollment for those already hospitalized because of pre-existing diseases. Among the patients, 19 were symptomatic with few clinical manifestations, including at least one COVID-19-related symptom, such as a cough or fever, but not showing signs of pneumonia on physical examination, and therefore defined as paucisymptomatic (PS). Four PS patients showed no symptoms related to COVID-19 and were therefore referred for testing because they were already hospitalized for pre-existing medical conditions; in the PS group, a chest CT scan performed during hospital admission revealed minimal pneumonia in six out of 19 individuals and bilateral interstitial pneumonia (BiP) in six individuals. None of them needed oxygen support at any time during hospitalization.

Of the enrolled subjects in the symptomatic group ($n = 35$), 13 were considered mild (Mild), with typical symptoms of COVID-19 and clinical evidence of pneumonia on physical

examination, without showing shortness of breath or dyspnea on enrollment; 12 were considered moderate (Mod), with typical symptoms of COVID-19 and clinical evidence of pneumonia on physical examination, shortness of breath or dyspnea on enrollment, and a saturation of oxygen $\geq 94\%$ in room air; and 10 were considered severe (Sev), with typical symptoms of COVID-19 and clinical evidence of pneumonia on physical examination, shortness of breath or dyspnea on enrollment, and a saturation of oxygen $< 94\%$ in room air, or a ratio of arterial partial pressure of oxygen to fraction of inspired oxygen ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) < 300 mm Hg or respiratory frequency > 30 breaths/min.

Overall, among the 54 COVID-19 patients enrolled, 29 showed radiological signs of SARS-CoV-2-related pneumonia, defined as monolateral interstitial pneumonia (MiP) in six cases and bilateral (BiP) in 23 cases.

Concerning comorbidities, 44/54 patients showed the presence of at least one pre-existing chronic disease, with cardiovascular conditions being the most common comorbidity present (19/54).

At the time of sampling for the CD169 analysis, the mean number of days of hospitalization was 4.54 ± 7.54 ; most patients were hospitalized for 1–10 days ($n = 46$), six patients were hospitalized for 10–20 days, and two were hospitalized for more than 20 days.

Of the enrolled patients, 23 had been treated with antiviral and corticosteroid therapies, and six died (mortality rate: 8.8%).

The patients in the symptomatic group showed a reduction in the percentage of lymphocytes and higher levels of neutrophils at the time of sampling (Table 2 (b)). Considering inflammatory markers and other parameters of coagulation, the levels of D-dimers, C-reactive protein (CRP), fibrinogen, blood urea nitrogen (BUN), aspartate transaminase (AST) or glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), alanine transaminase (ALT), lactate dehydrogenase (LDH), and lipase were all outside the reference ranges and statistically significantly different with respect to the PS group.

Finally, all the COVID-19 patients were evaluated for respiratory outcomes according to the maximum respiratory support received during the hospitalization period. Based on this classification, we divided the patients into two groups: the first group comprised 27/54 patients who did not need oxygen therapy (No OX), who were all PS. The other 27/54 patients received oxygen (OX) in different ways: 12/54 were supported by a nasal cannula (NC) or venturi masks (VMKs), and 15/54 were supported by non-invasive ventilation (NIV), continuous positive airway pressure (C-PAP), and orotracheal intubation (OTI) for invasive mechanical ventilation.

Healthy donors were matched with COVID-19 patients for age and sex: the cohort included 54 COVID-19 patients (median age: $60+/-15$; 41 males and 13 females) and 57 healthy donors (median age: $59+/-12$; 40 males and 17 females); all the clinical parameters analyzed in the HDs were within the normal reference ranges.

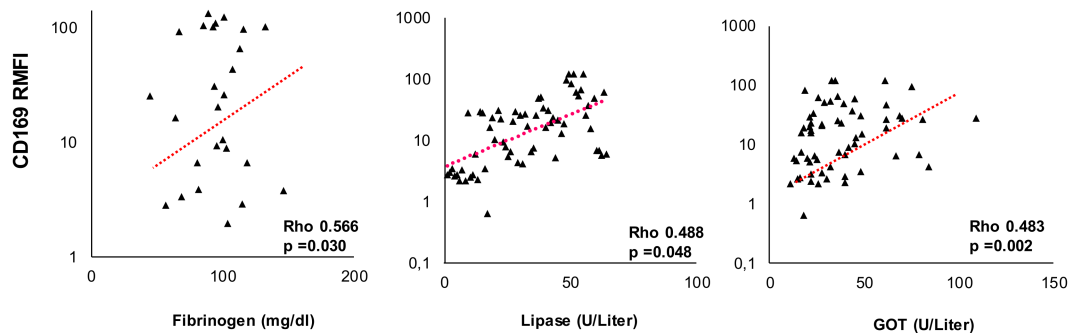
2.3. CD169 RMFI Correlates with Biochemical Parameters of Disease Severity and Is Associated with Pneumonia Statuses of COVID-19 Patients

We evaluated the association of CD169 RMFI with laboratory markers and clinical severity in true-positive COV within 5 days of hospitalization ($n = 54$). The CD169 RMFI in COV patients was positively correlated with some biochemical parameters associated with COVID-19 severity, such as fibrinogen, lipase, and GOT (Figure 2A). The analysis of the mCD169 MFI revealed no significant correlation with the same parameters (Table S2). No other correlations were observed between CD169 expression and inflammatory biomarkers at sampling.

To analyze the association between CD169 RMFI and pneumonia status, the COV group was divided according to chest computed tomography (CT) images at the time of hospitalization and sampling: no pneumonia and non-interstitial pneumonia (None+P, $n = 28$), monolateral or minimal interstitial pneumonia (MiP, $n = 6$), and bilateral or severe pneumonia (BiP, $n = 23$). As shown in Figure 2B, a significantly higher CD169 RMFI was observed in the group with bilateral interstitial pneumonia when compared to monolateral pneumonia ($p = 0.018$) or compared to the None+P group ($p = 0.031$). Although

an increased expression of CD169 was observed in the most severe forms of pneumonia, mCD169 MFI was not significant in discriminating the severity of the lung condition ($p = ns$, Supplementary Figure S1B).

A) Biochemical Biomarkers



B) Pneumonia

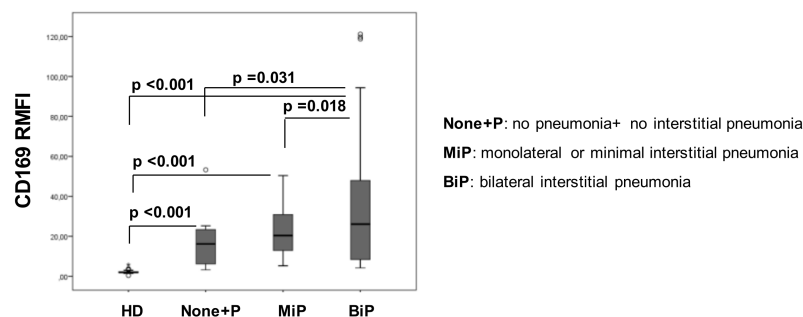


Figure 2. Elevated CD169 RMFI correlates with inflammatory markers and is associated with pneumonia status in COVID-19 patients. Scatter plot of (A) biochemical markers (X-axis) and CD169 RMFI (Y-axis) in COVID-19 patients. Among all the biochemical markers examined (Table 2 (b)), fibrinogen, lipase, and GOT correlated with CD169. (B) Patients were stratified into three groups based on pulmonary status and compared to HDs ($n = 57$): no pneumonia and non-interstitial pneumonia (None+P, $n = 28$), monolateral or minimal interstitial pneumonia (MiP, $n = 6$), and bilateral or severe pneumonia (BiP, $n = 23$). CD169 RMFI is represented as a box plot of all groups examined, and statistical differences are shown. Non-parametric Kruskal–Wallis tests and Bonferroni’s corrections were used to compare groups, and pairwise associations between continuous variables were tested through Pearson’s correlation coefficients. Values were considered statistically significant when $p \leq 0.050$.

2.4. CD169 RMFI Correlates with the Expression of Pro-Inflammatory Cytokines in COVID-19 Patients and Is Altered by Therapy

To evaluate the effect of therapy on CD169 expression, patients were stratified based on the drug treatment received (antiviral and corticosteroids, herein referred to as treated or not (untreated)). The group of patients under antiviral and corticosteroid therapy at the time of sampling (treated COV) showed significantly lower expression of CD169 than untreated COV ($p = 0.033$) (Figure 3A, Table 3). No significant differences based on drug treatment were observed when analyzing the CD169 MFI on monocytes (Supplementary Figure S1C). The expression of a selected group of cytokines was also analyzed in the blood samples of COV patients and HDs by qRT-PCR (Figure 3B, Table 3). IL-6, IL-10, IFN- γ , and TNF- α expressions were significantly higher in untreated COV patients than in HDs, while in treated patients, IL-6 and IL-10 had significantly lower values than those of untreated patients ($p = 0.012$ and $p = 0.001$). Moreover, Pearson’s analysis revealed a positive correlation of CD169 RMFI with IL-6 (Rho = 0.415, $p = 0.015$) and with IL-10 (Rho = 0.488, $p < 0.001$) in untreated COV, while an inverse correlation with IL-6 was observed

in treated COV (Rho = 0.506, $p < 0.001$). No significant correlation of CD169 RMFI with TNF- α or IFN- γ expression levels was observed (Figure 3C).

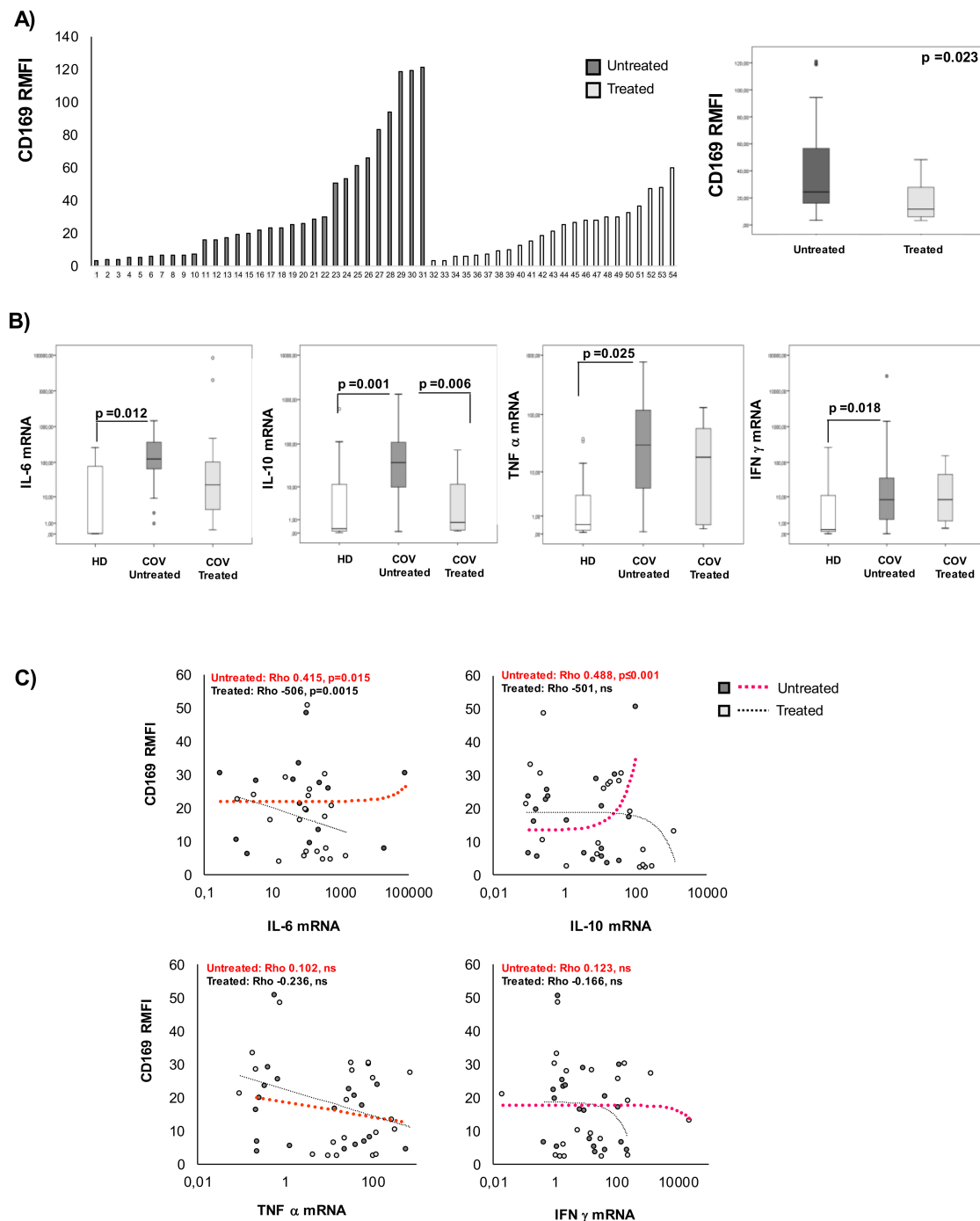


Figure 3. CD169 RMFI correlated with IL-6 and IL-10 in untreated COVID-19 patients. Patients were stratified into two groups based on treatment with antiviral and corticosteroids at sampling (COV-treated, $n = 25$; COV-untreated, $n = 19$) and are represented in ascending order of CD169 RFMI (left panel) (A) and median \pm SD of CD169 RMFI in treated vs. untreated COV patients is represented as a box plot, and the statistical difference is shown (right panel). (B) IL-6, IL-10, IFN- γ , and TNF- α mRNA expression levels in HD (white), COV-untreated (gray), and COV-treated (light gray) are represented as box plots, and statistical differences are shown. (C) Scatter plots of cytokine expression (X-axis: IL-6, TNF- α , IL-10, and IFN- γ) according to real-time qRT-PCR and CD169 RMFI in COV-untreated (gray dots) and COV-treated (light-gray dots) at sampling (X-axis). Non-parametric Kruskal–Wallis tests and Bonferroni’s corrections were used to compare groups; Pearson’s correlation coefficients and Benjamini Hochberg FDR corrections were used. Values were considered statistically significant when $p \leq 0.050$.

Table 3. Median values, interquartile ranges, and non-parametric Kruskal–Wallis and Bonferroni’s corrections of CD169 RMFI according to flow cytometry, as well as cytokine mRNA expression in healthy donors and in untreated/treated COVID-19 patients.

HD		CD169 RMFI	IL-6	IL-10	IFN- γ	TNF- α
<i>n</i>		57	19	19	19	19
Median		1.92	0.04	0.26	0.32	0.45
IQR	25	1.58	0.03	0.10	0.18	0.16
	50	1.92	0.04	0.26	0.32	0.45
	75	2.31	81.12	12.18	12.38	3.57
UNTREATED		CD169 RMFI	IL-6	IL-10	IFN- γ	TNF- α
<i>n</i>		31	25	25	25	25
Median		32.28	25.39	37.71	8.09	29.90
IQR	25	6.67	4.61	9.40	1.46	4.63
	50	22.28	25.39	37.71	8.09	29.90
	75	57.21	184.28	116.95	79.86	121.76
TREATED		CD169 RMFI	IL-6	IL-10	IFN- γ	TNF- α
<i>n</i>		23	19	19	19	19
Median		23.30 **	11.68	0.78 **	8.19	19.05
IQR	25	9.94	5.517	0.15	1.31	0.41
	50	23.30	11.68	0.780	8.19	19.05
	75	33.99	36.92	11.57	45.84	59.82

Numbers in bold indicate significant differences according to non-parametric Kruskal–Wallis and Bonferroni’s corrections vs. HDs; ** untreated vs. treated patients. Values were considered statistically significant when $p \leq 0.050$; interquartile range (IQR).

2.5. CD169 RMFI Correlated with the Expression of T-lymphocyte-Differentiation and Senescence/Exhaustion Markers in Untreated and Treated COVID-19 Patients

The analysis of the T-lymphocyte cell phenotype demonstrated a significant difference in important markers of T-cell differentiation and exhaustion in COV-treated or untreated patients compared to HDs (Table 4).

Table 4. Median values, interquartile ranges, and non-parametric Kruskal–Wallis and Bonferroni’s corrections of the percentages of T-cell subsets in healthy donors and in untreated/treated COVID-19 patients according to flow cytometry.

(a) T-Cell Phenotype (% of Cells)								
HD		LYMPHO	MONO	NEUTRO	CD3	CD4	CD8	CD8CD4
<i>n</i>		57	57	57	57	57	57	57
Median		22.85	5.69	46.46	72.42	61.20	32.89	0.96
IQR	25	15.03	4.72	29.28	52.76	56.54	25.16	0.42
	50	22.85	5.69	46.46	72.42	61.20	32.89	0.96
	75	29.11	7.53	61.69	80.07	64.69	37.08	1.69
Untreated		LYMPHO	MONO	NEUTRO	CD3	CD4	CD8	CD8CD4
<i>n</i>		31	31	31	31	31	31	31
Median		12.64	4.34	62.41	59.85	51.02	29.50	0.84
IQR	25	8.86	2.86	45.70	50.39	42.80	21.95	0.32
	50	12.64	4.34	62.41	59.85	51.02	29.50	0.84
	75	16.87	6.68	73.17	76.42	65.86	37.72	2.14
Treated		LYMPHO	MONO	NEUTRO	CD3	CD4	CD8	CD8CD4
<i>n</i>		23	23	23	23	23	23	23
Median		10.86	6.20	64.09	56.52	57.22	26.67	1.05
IQR	25	5.89	4.77	50.54	50.93	44.78	23.43	0.56
	50	10.86	6.20	64.09	56.52	57.22	26.67	1.05
	75	18.02	8.87	78.25	68.43	69.25	33.72	2.76

Table 4. Cont.

(b) Differentiation Markers in CD4+ T Cells (%)								
HD		CD4CM	CD4NAIVE	CD4EM	CD4TEM	CD4CD57	CD4PD1	CD4PD1CD57
<i>n</i>		57	57	57	57	57	57	57
Median		50.14	38.19	50.14	0.46	3.56	1.95	0.33
IQR	25	35.85	30.17	35.85	0.24	1.66	1.15	0.13
	50	50.14	38.19	50.14	0.46	3.56	1.95	0.33
	75	62.95	48.30	62.95	0.63	7.50	4.70	0.79
Untreated		CD4CM	CD4NAIVE	CD4EM	CD4TEM	CD4CD57	CD4PD1	CD4PD1CD57
<i>n</i>		31	31	31	31	31	31	31
Median		47.58	31.30	8.46	0.63	3.65	10.87	0.96
SD		17.54	14.67	12.35	4.08	6.66	17.28	2.92
IQR	25	40.37	24.00	2.53	0.18	1.41	4.68	0.38
	50	47.58	31.30	8.46	0.63	3.65	10.87	0.96
	75	67.33	41.62	16.68	2.30	7.23	23.83	1.52
Treated		CD4CM	CD4NAIVE	CD4EM	CD4TEM	CD4CD57	CD4PD1	CD4PD1CD57
<i>n</i>		23	23	23	23	23	23	23
Median		49.89	35.94	5.74	1.73	2.66	8.39	0.55
IQR	25	33.85	26.88	3.28	0.24	1.54	0.17	0.22
	50	49.89	35.94	5.74	1.73	2.66	8.39	0.55
	75	62.11	46.10	17.77	4.62	10.18	21.07	1.77
(c) Differentiation, Senescence and Exhaustion Markers in CD8+ T Cells (%)								
HD		CD8CM	CD8NAIVE	CD8EM	CD8TEM	CD8CD57	CD8PD1	CD8PD1CD57
<i>n</i>		57	57	57	57	57	57	57
Median		27.94	46.79	10.55	5.43	1.92	3.04	0.54
IQR	25	7.30	29.34	3.17	2.67	1.58	0.72	0.29
	50	27.94	46.79	10.55	5.43	1.92	3.04	0.54
	75	45.62	56.07	33.25	14.51	2.31	12.87	6.98
untreated		CD8CM	CD8NAIVE	CD8EM	CD8TEM	CD8CD57	CD8PD1	CD8PD1CD57
<i>n</i>		31	31	31	31	31	31	31
Median		13.32	30.99	27.73	17.01	30.26	5.30	2.48
IQR	25	4.84	15.26	13.38	9.04	15.04	2.59	1.35
	50	13.32	30.99	27.73	17.01	30.26	5.30	2.48
	75	15.85	52.94	47.60	31.18	51.47	10.26	6.13
treated		CD8CM	CD8NAIVE	CD8EM	CD8TEM	CD8CD57	CD8PD1	CD8PD1CD57
<i>n</i>		23	23	23	23	23	23	23
Median		19.00 **	28.55	26.47	15.84	32.83 **	1.53	1.98
IQR	25	5.02	16.58	12.49	9.16	24.23	0.00	0.00
	50	19.00	28.55	26.47	15.84	32.83	1.53	1.98
	75	35.00	43.95	55.51	24.50	51.39	11.03	15.47

Numbers in **bold** indicate significant differences according to non-parametric Kruskal–Wallis and Bonferroni's corrections vs. HDs; ** untreated vs. treated. Values were considered statistically significant when $p \leq 0.050$; interquartile range (IQR).

Among CD4+ T cells, a decrease in the effector memory (EM) subset and an increase in the terminal effector memory (TEM) subset were observed in both treated and untreated COV compared to HDs, and a significant increase in CD4+ cells expressing markers of exhaustion (PD1+) was detected only in treated patients. Among CD8+ T cells from COVID-19 patients, a decrease in the central memory (CM) subset was significant in the untreated group in comparison to HDs, while in the treated group, the observed decrease was not statistically significant. The increase in EM and TEM subsets was present in both patient groups. The percentage of CD57+-positive cells increased significantly in COV

patients compared to HDs, as well as in treated compared to untreated COVID-19. Furthermore, there is a significant decrease in CD8 NAIVE cells in both untreated and treated patients.

The expression of CD169 was closely related to immunological modifications, especially in untreated patients. Pearson's analysis revealed a significant correlation between specific markers of CD8+ T-cell differentiation and exhaustion and CD169 RMFI, as illustrated in Figure 4 and Table 5.

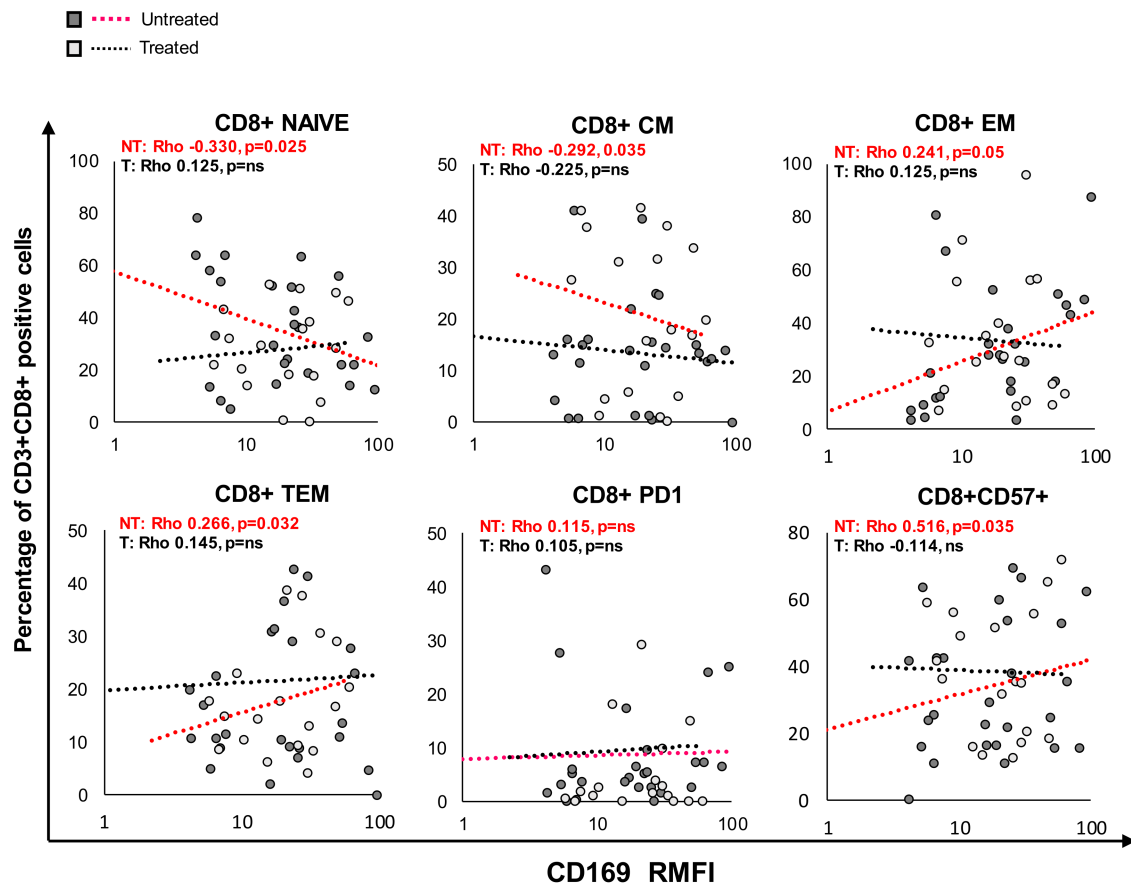


Figure 4. CD169 RMFI correlated with the expression of differentiation and senescence/exhaustion markers in CD8 T cells from COVID-19 patients. Patients were stratified into two groups based on treatment at sampling with antiviral + corticosteroids (treated COVID-19, $n = 23$; untreated COVID-19, $n = 31$). Scatter plot of CD169 RMFI (X-axis) and the expression of markers of differentiation and senescence/exhaustion in CD3+CD8+ T cells (Y-axis) in COVID-19 patients. The gating strategy to analyze markers related to differentiation, activation status, senescence, and exhaustion in T cells was provided by Beckman Coulter (Duraclone): specifically, NAIVE (CCR7+CD45RA+CD28+CD27+), central memory (CM: CCR7+CD45RA+CD28+CD27+/-), effector memory (EM: CCR7+CD45RA-CD28+/-CD27+/-), terminal effector memory (TEM: CCR7+CD45RA+CD28-CD27+/-), PD1+ exhausted, and CD57+ senescent T cells. Pearson's correlations and Benjamini Hochberg FDR corrections were calculated. Values were considered statistically significant when $p \leq 0.050$.

Among CD3+CD8+ T cells from untreated COVID-19, CD169 RMFI was associated with a decrease in NAIVE cells ($p = 0.038$) and positively correlated with EM ($p = 0.016$). In treated COVID-19, CD3+CD8+ CM cells negatively correlated with CD169 RMFI ($p = 0.050$), while a positive correlation with TEM cells was observed ($p = 0.012$). Finally, the analysis also revealed that CD169 RMFI positively correlated with the CD57+ senescence marker in CD3+CD8+ T cells in untreated COVID-19. No significant correlation was found between mCD169 MFI and the expression of T-cell markers analyzed (Table S2).

Table 5. Pearson’s correlation between CD169 RMFI and T-cell differentiation and senescence/exhaustion markers in untreated and treated COVID-19 patients.

	Untreated		Treated	
	CD4	CD8	CD4	CD8
NAIVE	ns	−0.330. <i>p</i> = 0.005	ns	ns
CM	0.241. <i>p</i> = 0.044	−0.292. <i>p</i> = 0.014	ns	ns
EM	ns	0.241. <i>p</i> = 0.044	ns	ns
TEM	ns	0.266. <i>p</i> = 0.026	ns	ns
Senescent (CD57+)	ns	0.516. <i>p</i> = 0.014	ns	ns
PD1+	ns	ns	ns	ns
Exhausted (CD57 +PD1+)	ns	ns	ns	ns

Negative coefficient, $p \leq 0.050$ = green; Positive coefficient, $p \leq 0.050$ = red; No difference, $p \leq 0.050$ = gray.

2.6. CD169 RMFI Correlated with the Expression of Differentiation and Maturation Markers in B Cells from COVID-19 Patients

The analysis of the B-lymphocyte cell phenotype revealed a significant difference in markers of B-cell differentiation and maturation in the COV group relative to the HD group (Table 6). Among COV patients, in CD45+CD19+ B cells, the percentage of positive marginal B cells and NAIVE B cells significantly decreased in parallel with a decrease in the numbers of switched memory cells and non-switched B cells, and a significant increase in plasmablasts.

Table 6. Median values, interquartile ranges, and non-parametric Kruskal–Wallis and Bonferroni’s corrections of the percentages of B-cell subsets in healthy donors and in untreated/treated COVID-19 patients.

Healthy Donors	Marginal	Naïve B	Unswitched	Switched Memory	Plasmablast	
<i>n</i>	57	57	57	57	57	
Median	14.09	53.36	37.97	33.33	14.66	
IQR	25	19.32	15.83	21.07	8.88	
	50	14.09	39.58	30.97	33.33	14.66
	75	19.33	60.63	43.75	51.17	30.28
Untreated COV	Marginal	Naïve B	Unswitched	Switched Memory	Plasmablast	
<i>n</i>	31	31	31	31	31	
Median	6.24	43.16	* 33.78	23.33	17.86	
IQR	25	2.39	16.21	22.16	10.27	
	50	6.24	43.16	31.78	33.33	17.86
	75	13.28	63.08	55.44	45.13	25.84
Treated COV	Marginal	Naïve B	Unswitched	Switched Memory	Plasmablast	
<i>n</i>	23	23	23	23	23	
Median	4.58	47.20	31.49	26.22	20.67	
IQR	25	1.44	16.00	14.90	8.66	
	50	4.58	67.20	34.92	29.22	20.67
	75	10.49	78.80	47.64	36.38	32.23

Numbers in bold: significant differences according to non-parametric Kruskal–Wallis and Bonferroni’s corrections vs. HDs; * Untreated vs. treated. Values were considered statistically significant when $p \leq 0.050$; interquartile range (IQR).

Pearson’s analysis revealed a significant correlation between markers of differentiation and maturation in B cells and CD169 RMFI, as illustrated in Figure 5 and Table 7. In particular, among CD45+CD19+ B cells (Figure 5A), the expression of CD169 was associated

with an increase in marginal B cells ($p = 0.025$) and NAIVE B cells ($p = 0.032$) in untreated COV, while in the treated group, no correlation was observed. Switched B cells and plasmablasts negatively correlated with CD169 RMFI ($p = 0.025$ and 0.010 , respectively) in untreated COV as well as in treated COV patients. Moreover, a significant inverse correlation between the specific SARS-CoV-2 IgG analyzed in sera and the RMFI of CD169 was observed in both patient groups (Figure 5B). No significant correlations were found between mCD169 MFI and the expression of B-cell markers analyzed (Table S2).

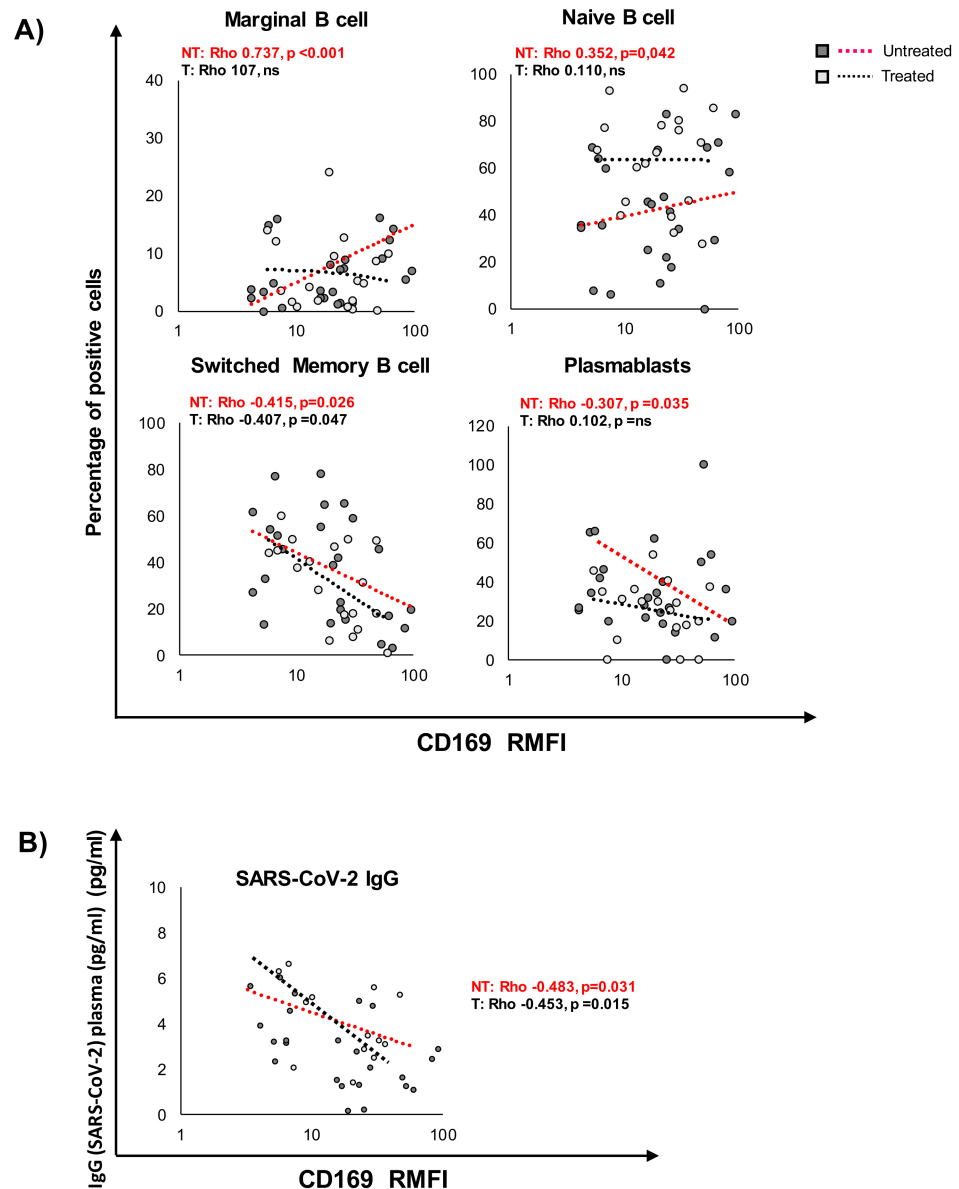


Figure 5. CD169 RMFI correlates with the expression of differentiation and maturation markers in B cells from COVID-19 patients and with SARS-CoV-2 IgG. Scatter plot of CD169 RMFI (X-axis) and the expression of markers of differentiation and maturation (A) in CD19 B cells of COVID-19 patients. The gating strategy to analyze markers related to differentiation, activation status, senescence, and exhaustion in T cells: specifically, NAIVE (CD45+CD19+CD27-IgD+), marginal (CD45+CD19+CD27+IgD+), unswitched memory (CD45+CD19+CD27+CD38-IgD+IgM+), switched memory (CD45+CD19+CD27+CD38-IgD-IgM-), and plasmablasts (CD45+CD19+CD27+CD38+IgD-IgM-). (B) IgG specific for SARS-CoV-2 detected in sera of COV patients at least one week after sampling. Pearson's correlations and Benjamini Hochberg FDR corrections were calculated. Values were considered statistically significant when $p \leq 0.050$.

Table 7. Pearson's correlation between CD169 RMFI and B-cell differentiation markers in untreated and treated COVID-19 patients.

	Untreated	Treated
	CD19	CD19
Marginal NAIVE	0.737. $p < 0.001$	ns
Unswitched	0.352. $p = 0.032$	ns
Switched memory	ns	ns
Plasmablasts	−0.415. $p = 0.016$	−0.407. $p = 0.041$
	−0.307. $p = 0.025$	ns

CD169 RMFI

Negative coefficient, $p \leq 0.050$ = green; Positive coefficient, $p \leq 0.050$ = red; No difference, $p \leq 0.050$ = gray.

2.7. CD169 RMFI Reflects the Severity Score and Respiratory Outcome of COVID-19 Patients during Hospitalization in Relation to Treatment at Sampling

We then evaluated the CD169 RMFI in relation to the clinical score and its predictive value for oxygen need during hospitalization. As shown in Figure 6A and Table 8, at all clinical scores, patients showed higher CD169 RMFI than HDs. In untreated patients, CD169 RMFI was found to be significantly higher in symptomatic patients than asymptomatic subjects ($p < 0.008$, Table 8). Notably, treated patients with diverse disease scores showed no significant differences in CD169 RMFI, but they were significantly different from HDs ($p = 0.042$). Regarding pneumonia status, CD169 RMFI was markedly increased in untreated patients with bilateral interstitial pneumonia (BiP) compared to patients without pneumonia or no interstitial pneumonia ($p = 0.045$), and to patients showing monolateral or minimal interstitial pneumonia (MiP) ($p = 0.035$). No significant differences in CD169 RMFI were detected when comparing groups of patients with diverse radiological findings, but they were still significant after comparing BiP with HDs ($p = 0.015$; Figure 6B).

Table 8. Median values, interquartile ranges, and non-parametric Kruskal–Wallis and Bonferroni's corrections of CD169 RMFI in healthy donors categorized according to clinical status (a) and pulmonary involvement (b).

		(a) Clinical Status						
		UNTREATED			TREATED			
		HD	PS	SYMPTOMATIC	PS	SYMPTOMATIC		
<i>n</i>		57	11	20	1	22		
Median		2.00	17.00	27.50	33.00	* 20.00		
IQR	25	2.00	6.00	6.25	33.00	7.00		
	50	2.00	17.00	27.50	33.00	20.00		
	75	2.00	23.00	79.50	33.00	30.00		
		(b) Pulmonary Involvement						
		UNTREATED				TREATED		
		HD	PS	MiP	BiP	PS	MiP	BiP
<i>n</i>		57	7	8	16	1	4	18
Median		2.01	23.35	17.81	$\infty, *$ 27.97	27.74	4.67	23.30
IQR	25	1.76	15.88	5.55	6.13	27.74	3.26	9.94
	50	2.01	23.35	17.81	27.97	27.74	4.67	23.30
	75	2.30	25.27	26.66	91.66	27.74	26.24	31.93

Numbers in bold indicate significant differences according to non-parametric Kruskal–Wallis and Bonferroni's corrections vs. HDs; * in untreated BiP vs. MiP; ∞ in untreated BiP vs. NONE+P; Values were considered statistically significant when $p \leq 0.050$; interquartile range (IQR).

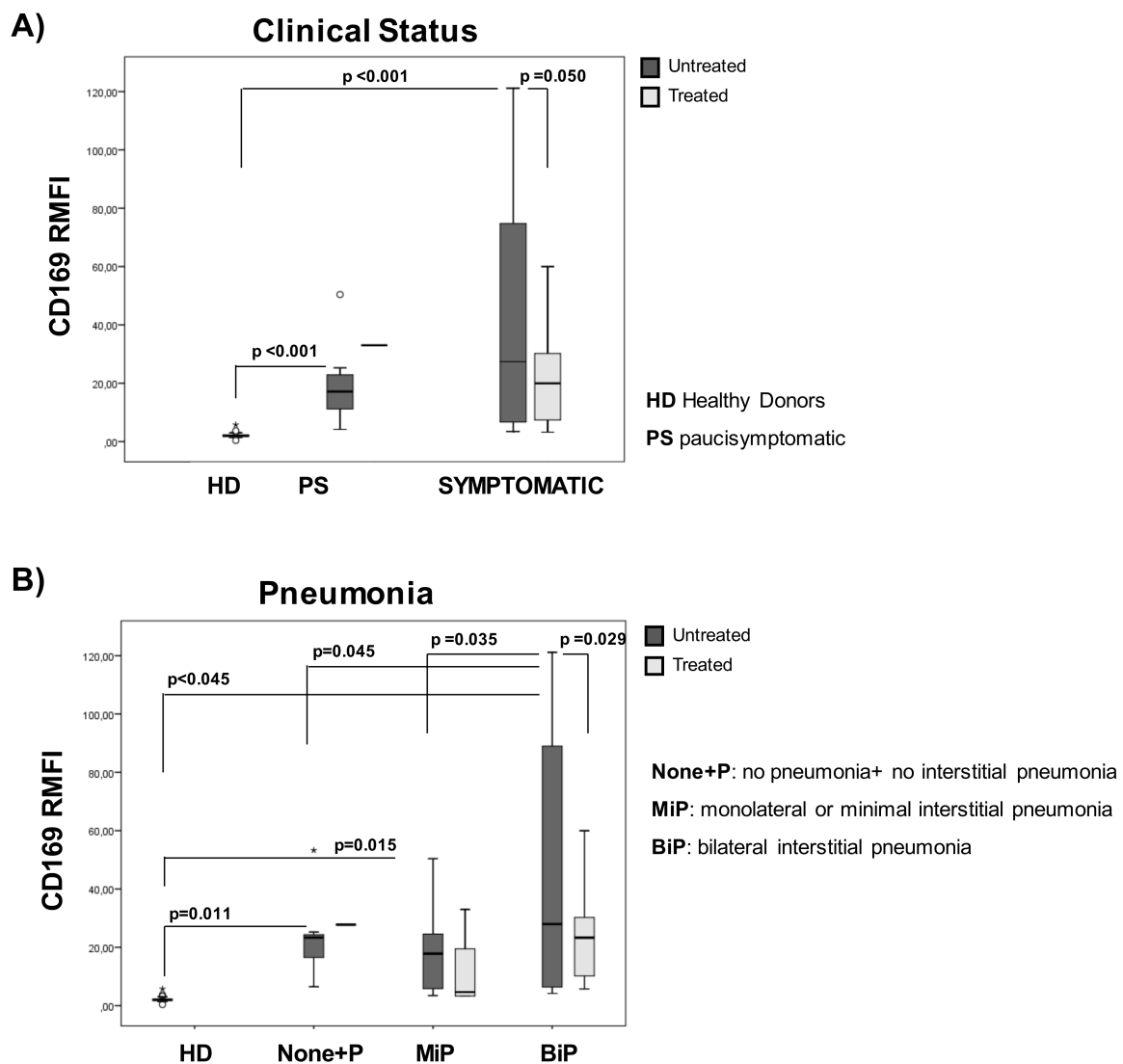


Figure 6. CD169 RMFI's association with the severity of the disease and pulmonary involvement depends on the treatment at the time of sampling. COVID-19 patients ($n = 54$) were stratified into two groups according to their clinical statuses: paucisymptomatic ($n = 19$) and symptomatic ($n = 35$; mild, $n = 13$; moderate, $n = 12$; and severe, $n = 18$) (A). Patients were also stratified into 3 groups based on pulmonary status (B), as previously described (Figure 2B). CD169 RMFI is represented as box plots (gray box plots: patients positive for SARS-CoV-2 not treated at sampling ($n = 31$); light-gray box plots: patients ($n = 23$) treated with antiviral and corticosteroids at sampling; statistical differences are shown). Non-parametric Kruskal–Wallis tests and Bonferroni's corrections were used to compare groups, and values were considered statistically significant when $p \leq 0.050$.

To evaluate the predictive value for oxygen need during hospitalization, COVID-19 patients were divided into two categories representing the respiratory outcomes: no oxygen support needed (None) or oxygen support (OX). As shown in Figure 7A and Table 9, CD169 RMFI was found to be significantly higher in the OX group than the None group ($p = 0.001$) only in patients who were untreated at sampling, while no differences were observed in treated patients. Moreover, statistically significant differences in the percentage of senescent CD8+ cells between treated and untreated patients within the OX and None groups were observed (Figure 7B). In addition, significant increases in the transcriptional levels of IL-6 ($p = 0.050$) and IL-10 ($p = 0.017$) were found across respiratory categories in the untreated group (Figure 7C,D). The accuracy of CD169 RMFI in predicting the respiratory outcome in untreated or treated COVID-19 patients was studied by means of the receiver operating characteristic curve (ROC curve) to identify patients requiring respira-

tory support (Figure 7E). With a cut-off of 48.31 for the untreated group, the sensitivity and specificity at the optimal operating point were 89% and 80%, respectively, with an area under the ROC curve (AUC) of 0.879 ($p < 0.001$), indicating that it is more specific than the other markers analyzed (Table 10).

Table 9. Median values, interquartile ranges, and non-parametric Kruskal–Wallis and Bonferroni’s corrections of the percentages of CD8CD57 cells, CD169 RMFI, IL-6 and IL-10 in untreated/treated COVID-19 patients according to oxygen need.

	None				OX			
UNTREATED	CD8CD57	CD169	IL6	IL10	CD8CD57	CD169	IL6	IL10
<i>n</i>	20	20	20	20	11	11	11	11
Median	16.04	21.32	94.40	0.33	52.58	26.07	125.95	11.51
IQR	25	13.33	8.81	23.51	0.11	35.65	5.88	8.92
	50	16.04	21.32	94.44	0.33	52.58	26.07	125.95
	75	36.56	44.99	152.76	7.23	63.71	94.35	515.66
TREATED	CD8CD57	CD169	IL6	IL10	CD8CD57	CD169	IL6	IL10
<i>n</i>	6	6	6	6	17	17	17	17
Median	23.53	24.39	** 3.82	20.77	** 32.83	*** 18.90	87.927	* 7.52
IQR	25	3.00	5.30	2.62	00.37	25.87	8.2872	6.60
	50	23.53	24.39	3.82	200.77	32.83	18.90	87.92
	75	29.27	211.91	4.25	52.39	33.61	469.59	10.84

Numbers in bold define significant differences according to non-parametric Kruskal–Wallis and Bonferroni’s corrections Oxygen needs (OX) vs. None; $p < 0.01$ **, $p < 0.001$ *** untreated vs. treated group. Values were considered statistically significant when $p \leq 0.050$; interquartile range (IQR).

Table 10. ROC curve for CD169 RMFI, IL-6, and IL-10 mRNA, and CD8+CD57+ in untreated or treated COV with respect to oxygen support. The area under the ROC curve (AUC) is indicated, as is the sensitivity and specificity of the marker analyzed. *** $p < 0.001$ in oxygen support vs. none.

OX vs. None	Untreated			Treated		
	AUC	Sensitivity (%)	Specificity (%)	AUC	Sensitivity (%)	Specificity (%)
CD169 RMFI	0.879 ***	89	80	0.656	45	33
IL-6	0.659	52	68	0.574	48	51
IL-10	0.623	53	69	0.632	51	54
CD8+CD57+	0.540	65	45	0.375	31	38

2.8. SARS-CoV-2 Spike Protein Stimulation Enhanced RMFI CD169 in PBMCs from Healthy Donors

To clarify whether CD169 was directly activated by SARS-CoV-2, PBMCs from seven healthy donors were stimulated in vitro for 24 h with increasing concentrations of the spike protein. The viral protein induced the expression of the activation marker HLA-DR in monocytes and CD169 RMFI in a concentration-dependent manner (Figure 8A). In addition, the expression of IL-6 and IL-10 was significantly higher after spike stimulation (Figure 8B). Pearson’s analysis showed a positive correlation between CD169 RMFI and IL-6 and IL-10 expression, confirming the data observed above in COV untreated patients (Figure 8C).

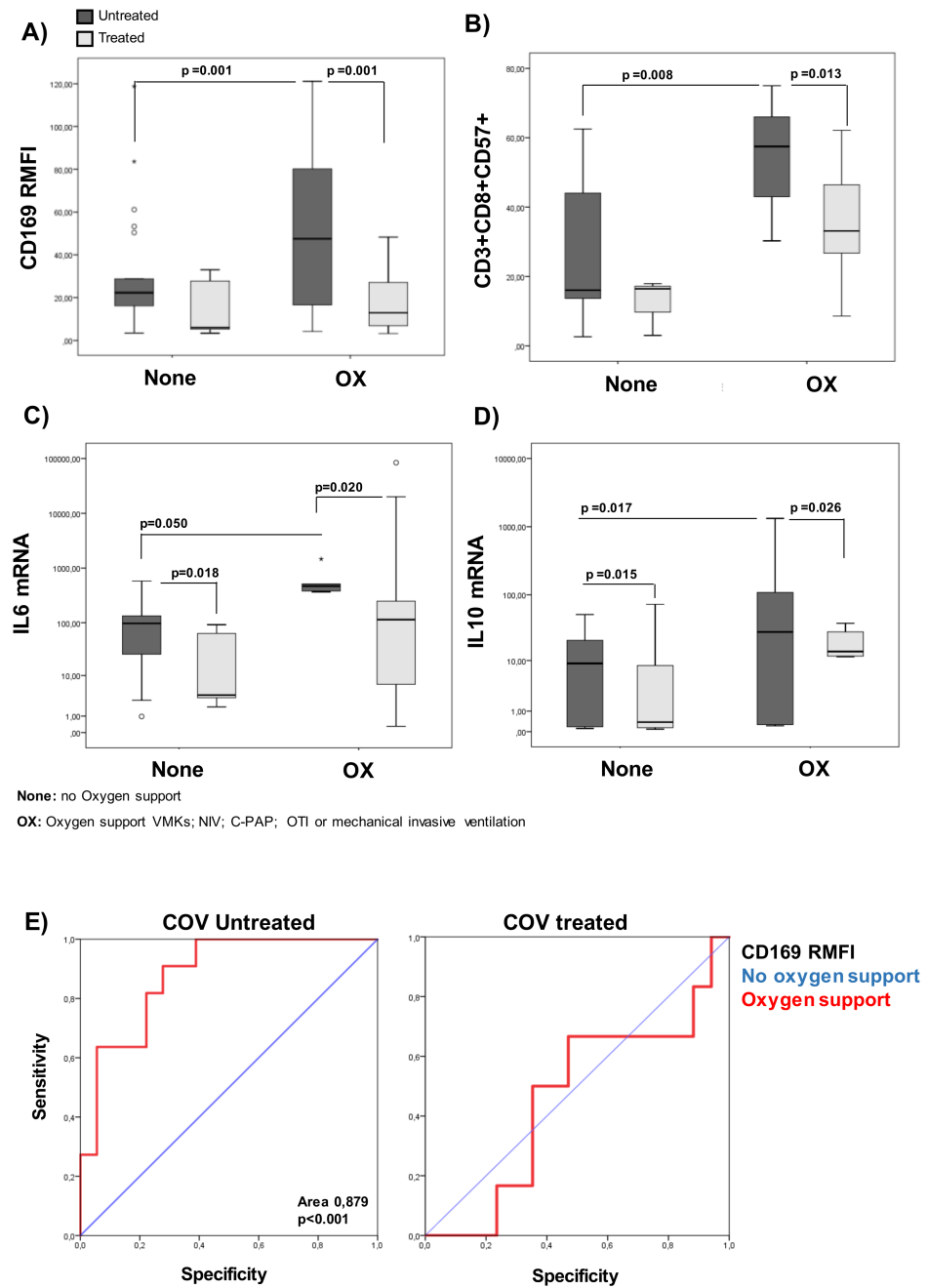


Figure 7. CD169 RMFI reflects respiratory outcomes of untreated COVID-19 patients. COVID-19 patients ($n = 54$) were stratified according to respiratory needs during hospitalization: no oxygen support needed (None; $n = 27$; 20 untreated and 6 treated) and oxygen support (OX; $n = 27$; 11 untreated and 17 treated). (A) CD169 RMFI is represented as box plots (gray box plots: patients positive for SARS-CoV-2 and not treated at sampling; light-gray box plots: patients treated with antiviral and corticosteroids at sampling). The statistical differences are shown. (B) The percentages of CD8 senescent cells for different treatments. (C) The levels of IL-6 for different treatment groups. (D) The levels of IL-10 expression (mRNA) for different treatment groups. (E) ROC curve for CD169 RMFI in untreated or treated COV with respect to oxygen support. The area under the ROC curve (AUC) is indicated. Non-parametric Kruskal–Wallis tests and Bonferroni’s corrections were used to compare groups, and values were considered statistically significant when $p \leq 0.050$.

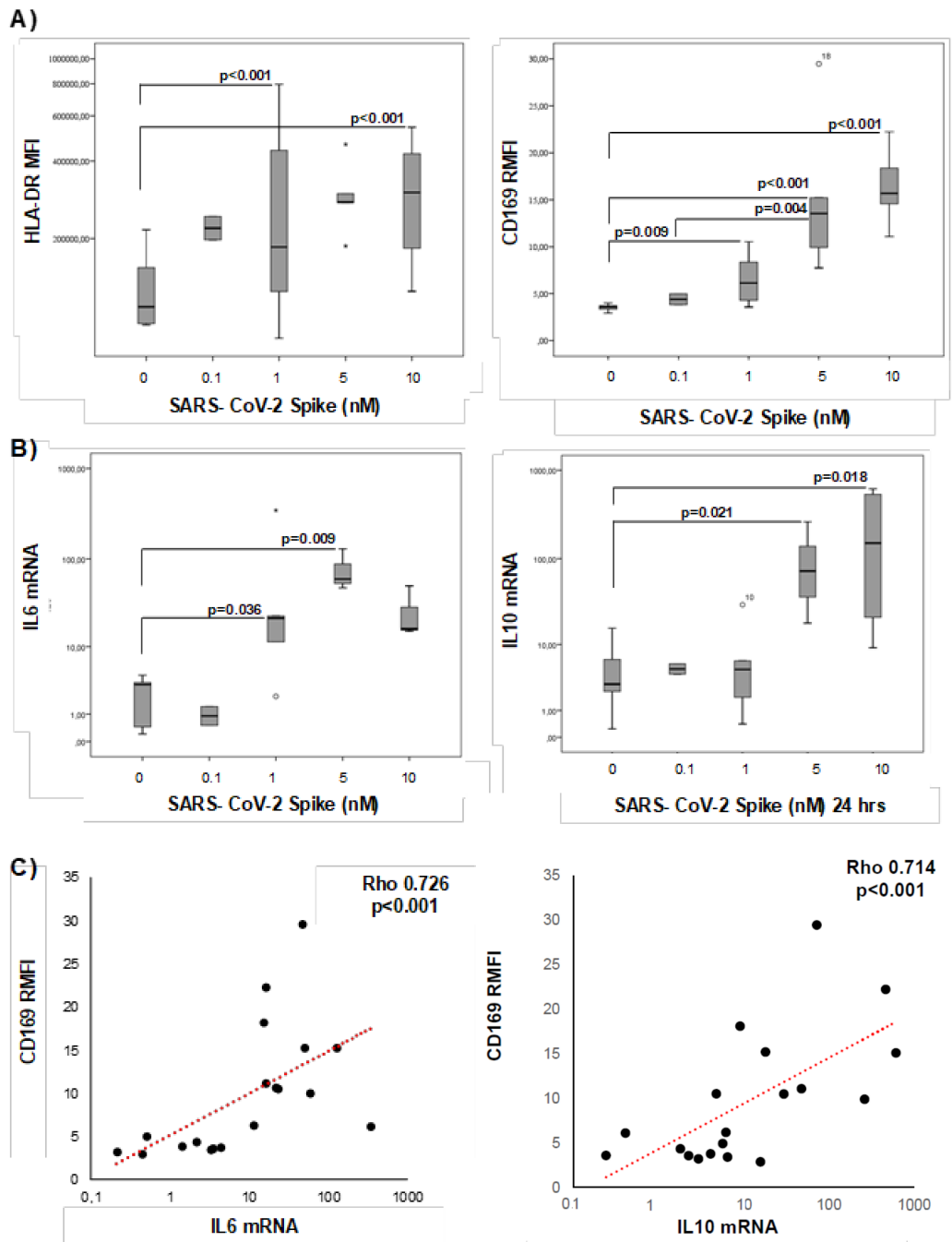


Figure 8. In vitro stimulation of PBMCs from healthy donors with SARS-CoV-2 induces CD169 RMFIs and correlates with the expression of IL-6 and IL-10. HLA-DR MFI and CD169 RMFI in PBMCs from healthy donors stimulated in vitro with different concentrations (range: 0-10 nM) of spike protein for 24 h are represented as box plots; statistical differences are shown (A). IL-6 and IL-10 mRNA expression in the same samples are represented as box plots (B). Scatter plot of IL-6 and IL-10 mRNA expression (X-axis) and CD169 RMFI (Y-axis) in COVID-19 patients (C). Non-parametric Kruskal–Wallis tests and Bonferroni’s corrections were used to compare groups. Pearson’s correlation was used to assess the relationship between the two continuous variables. Values were considered statistically significant when $p \leq 0.050$.

3. Discussion

The role of CD169+ macrophages in immune regulation and human diseases has been widely reported [5]. In viral infections, CD169+ macrophages residing in lymphoid organs are the first cells that bind incoming pathogens and act as guardians to prevent their

further spread. Circulating monocytes reflect the systemic immune response to infectious agents. In SARS-CoV-2 infection, myeloid cells have been described as responsible for the pathophysiology of the disease by contributing to local tissue damage and acting as potential producers of cytokines that lead to the hyper-inflammatory state observed in severe COVID-19 [17–20]. Indeed, it was shown that CD169 expression was strongly increased on circulating monocytes from COVID-19 patients compared to those from healthy donors or patients with bacterial sepsis. Increased CD169 expression was also associated with an increase in other activation markers, including CD64, CD68, and CD38 [12]. Moreover, CD169+ monocytes were present in high numbers in the early stages of the disease and in the group with milder cases, where the monocyte compartment consisted almost exclusively of CD169 clusters [21,22].

In accordance with recent work [13–16], the analysis that we carried out on whole blood taken from COVID-19 patients at the time of admission showed high levels of CD169 RMFI, which correlated with the SARS-CoV-2 RNA expression detected in swabs.

When compared to HDs, the expression of CD169 in COVID-19 patients mainly depends on the high CD169 expression in monocytes, while in lymphocytes no significant differences were found in COV compared to healthy donors. Since the MFI is a very variable value with a high standard deviation in the cohort, the use of intra-patient ratio obtained a higher statistical significance ($p < 0.001$) and high specificity. Moreover, in the clinical routine, it is easier to measure this fluorescence ratio (independent of cytometer settings) rather than cell numbers or mean fluorescence (requiring precise pipetting of venous blood and calibration beads). By analysis of the CD169 monocytes/lymphocytes RMFI, we found a higher ratio in COVID-19 with respect to HD in correlation with the complexity of the immune system dysfunction, inflammatory markers, and clinical aspects, that cannot be found using the MFI alone. The use of the RMFI value increases the robustness of the analysis, repeatability, reproducibility, and accommodates the potential variability of the laser power and detector sensitivity.

In some cases (10/68 patients), the RMFI of CD169 was comparable to healthy donors (false negatives). Of these patients, 10 were hospitalized for more than 5 days, confirming the decrease of the CD169 RMFI during the time post-infection, suggesting the importance of the early analysis of the CD169 marker. These false-negative samples were excluded from the study.

Interestingly, CD169 RMFI was strongly associated with various clinical and biological parameters and reflected not only the patient's status at admission, but also the progression of the disease.

Notably, a positive correlation of CD169 RMFI with the levels of several pro-inflammatory mediators predictive of severe COVID-19, such as fibrinogen, lipase, and GOT, and the associated cytokine storm [23–25], was found in our patient cohort.

Moreover, we also demonstrated that the modulation of CD169 depended on the drugs used for the management of patients, highlighting the need to account for treatments when using CD169 RMFI to monitor COVID-19 patients. Interestingly, we found that CD169 RMFI was strongly correlated with IL-6 and IL-10 mRNA levels, which are known to be associated with poor outcomes [26,27]. CD169+ macrophages play a central role in mediating SARS-CoV-2 translocation in the spleen and lymph nodes, and thus contribute to viral replication and spread, as well as the resulting cytokine storm [11–28].

The imbalance in the levels of immune activation and immune suppression is crucial in the loss of host defense against SARS-CoV-2 infection [29–31], and changes in the expression of some immune cells are considered to be predictors of severity/mortality in COVID-19 patients [32]. Accordingly, we analyzed the association between CD169 expression in the early phase of SARS-CoV-2 infection and the T- and B-cell immune responses. CD169 RMFI was closely correlated with changes in differentiation markers in CD8+ T cells from COV patients, particularly in untreated patients, and inversely correlated with the expression of CM and EM cells. In fact, in CD8+ T cells, CD169 RMFI was associated with a decrease in NAIVE cells and an increase in EM cells. Notably, CD169 RMFI correlated positively

with the percentages of CD8+ CD57+ senescent lymphocytes. It has been demonstrated that CD169+ macrophages that present in tumor tissue are correlated with CD57+CD8+ T-cell or NK-cell infiltration [33]. The CD57 marker has been used to assess functional immunodeficiency in several diseases, suggesting that positive cells do not proliferate, despite the preserved ability to secrete cytokines after activation [34]. COVID-19 patients have increased numbers of CD8+ T cells expressing CD57, which is considered a key marker of senescence and is associated with both human aging and chronic infections; CD57 expression was also recently described as having an association with other endogenous markers [35,36]. We also found an association of CD169 RMFI with PD1 expression, a molecule crucial for the induction and maintenance of peripheral tolerance and T-cell stability and integrity. Indeed, the PD1/PD-L1 axis mediates potent inhibitory signals to block the proliferation and function of T-effector cells, inhibiting antiviral immunity [37].

CD169 RMFI correlated with changes in CD8 and B-lymphocyte immunophenotypes and with some of the inflammatory markers. The analysis did not confirm correlations with the CD4 subset, highlighting the link with CD8 senescence and exhaustion phenotypes, which are specific immune dysfunctions of COVID-19. CD169 RMFI was inversely correlated with the presence of specific SARS-CoV-2 IgG in serum [12,13]. As a novelty of this study, by characterizing the B-cell compartment, we demonstrated that CD169 RMFI in untreated patients correlated directly with the percentage of NAIVE and marginal B cells, while it correlated inversely with plasmablasts and switched B cells in all patients. These results reinforce the spatial-temporal dynamics of CD169+ macrophage activation and B-cell responses in driving antibody production. Moreover, alterations in the B-cell compartment due to SARS-CoV-2 infection may be indicative of the effort of the immune system to counterbalance lymphopenia by increasing transient B cells and plasmablasts [38,39].

Interestingly, a recent paper also demonstrated the importance of CD169 in SARS-CoV-2 infection, since it mediates antigen-presenting cells (APCs) and target cells trans-infection [40], underlining the importance of the analysis of CD169 at early stage. Furthermore, here, we report the first evidence that a specific feature of the spike protein is its ability to trigger CD169 RMFI *in vitro* in a dose-dependent manner in parallel with enhanced IL-6 and IL-10 gene transcription in PBMCs.

Our data demonstrate that CD169 RMFI is a valuable early marker associated with SARS-CoV-2 infection and COVID-19 severity, but it is not reliable in patients who have received treatments. CD169 expression is recognized as a sensitive biomarker for other diseases, such as multiple sclerosis, in which CD169 cells promote neuro-inflammation [40,41], and systemic lupus erythematosus [42]. In these diseases, the highest levels of CD169 expression were observed in patients not receiving drugs, such as glucocorticoids or hydroxychloroquine, that decrease interferon production through the inhibition of Toll-like receptors in plasmacytoid dendritic cells [43]. Recently, lower circulating counts of CD169+ monocytes have been described in severe COVID-19 patients relative to mild cases [44]. Conversely, we observed increased CD169 expression in moderate and severe patients and in those with extensive interstitial pneumonia who did not receive any treatment.

Moreover, we also highlighted the close association between the early detection of CD169 RMFI and the respiratory outcome, suggesting that CD169 RMFI is a specific marker for patients who need respiratory support during their hospitalization.

Our findings reinforce the usefulness of CD169 RMFI at patient admission, along with T- and B-lymphocyte immunophenotyping, providing a reliable early measurement of immune status and assessment of COVID-19 disease progression to potentially drive the therapeutic approach.

4. Materials and Methods

4.1. Patients and Controls

Sixty-eight patients with positive SARS-CoV-2 RT-PCRs were enrolled in an open study by the Clinic of Infectious Diseases, Departments of System Medicine, University of Rome "Tor Vergata" and Policlinic of Tor Vergata (PTV) of Rome Foundation. Ethical approval for

the collection and use of human samples was obtained from the ethical committee of “Tor Vergata” Hospital, COroNaVIrus Disease: Safety and Efficacy of Experimental Treatment (COVID_SEET prot.7562/2020. 9 April 2020, experimental register 46.20). Blood samples from healthy donors ($n = 57$, HDs) were obtained from individuals attending the local blood Transfusion Unit of PTV who were referred to the Virology Unit of PTV for screening. All the HDs and COVID-19 patients provided written informed consent. SARS-CoV-2 infection was diagnosed by the Virology Unit of PTV using the Allplex 2019-nCoV Real-time PCR (SeeGene, Seoul, Korea) assay according to the manufacturer’s instructions.

Haematology and biochemical parameters of COVID-19 patients were measured on blood, serum, and plasma samples collected upon admission to the emergency department, infectious disease unit. Healthy individuals were screened for routine serology analysis. White blood cell (WBC) count was determined by using an automated hematological analyzer (Dasit-Sysmex, Milan, Italy). Serum levels of glucose (70–100 mg/dl), BUN (15–40 mg/dl), AST (5–34 U/L), ALT (0–55 U/L), LDH (125–220 U/L), C-reactive protein (CRP) (0–5 mg/L), lipase (8–78 U/L), and amylase (25–125 U/L) were measured by using an immunoturbidimetric method (Abbott Diagnostics, Milan, Italy). Plasma fibrinogen (200–400 mg/dL), D-dimer levels (0–500 ng/mL), and antithrombin III % (75–128) were measured using the Clauss method (ACL-TOP instrumentation, Werfen, Milan, Italy). Laboratory data that were collected through electronic medical records (Modulab[®]) were reported in Table 2 ((a), (b)) and in the Results in the “Demographics and Clinical Classification of COVID-19 Patients” section.

Samples were collected in the first several days of hospitalization (max. 5 days), and the clinical analysis, CT scans, immunophenotyping, CD169 determination, cytokine expression, and degree of severity refer to the same period. By contrast, the respiratory outcome applies to the entire duration of hospitalization, which may have ended with a transition to intensive care, discharge, or death, and was assessed and categorized based on the maximum need for oxygen throughout the duration of hospitalization.

4.2. *In Vitro Stimulation with Spike Protein*

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from EDTA blood samples of all the individuals enrolled in the study were isolated by density gradient centrifugation (Pancoll human) and collected immediately after separation. PBMCs were cultured at a density of 0.25×10^6 in RPMI 1640 (PAN-Biotech) enriched with 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, 0.1 mg/mL streptomycin, and 12% fetal bovine serum in the presence of 20 U/mL human recombinant interleukin-2 (IL-2) (all from Sigma, MO, USA). PBMCs were exposed to 0.1, 1, 5, and 10 nM concentrations of a SARS-CoV-2 S protein active trimer (ACRO-Biosystems, San Jose, CA, USA) for 24 h at 37 °C in 5% CO₂. After incubation, the samples were recovered and analyzed by flow cytometry and real-time PCR. Each culture condition was tested in duplicate.

4.3. *Flow Cytometry for CD169 Expression and Immunophenotyping Analysis*

EDTA blood samples (10 µL) were simultaneously lysed with 500 µL of Versalyse lysing solution (Beckman Coulter) and stained with CD64-CD169/infection dried custom mixture composed of anti-CD169-phycoerythrin (PE) (clone 7-239), anti-CD64-Pacific Blue (PB), and HLA-DR (APC) (clone 22) (Beckman Coulter).

The DuraClone IM T-cell subset tube and B-cell subset tube from Beckman Coulter were used to analyze differentiation and exhaustion markers. Stained cells were then washed with Dulbecco’s phosphate-buffered saline (PBS, PAN-Biotech). The stained cells were examined using a CytoFLEX (Beckman Coulter), and the data were analyzed using the CytExpert 2.2 software (Beckman Coulter). The gating strategy is reported in Figure S2 and described in previous work [12,15]. In monocytes, the expression of mCD169 MFI was very high in COVID-19 patients compared to healthy donors ($p = 0.010$), while in lymphocytes, no significant difference was detected. Interestingly, the ratio of the CD169 MFI between monocytes and lymphocytes (RMFI) was even more significant ($p < 0.001$)

than the MFI in monocytes alone (Figure S1A); for this reason, all the results are expressed as the RMFI. The analysis of CD169 MFI in monocytes and lymphocytes were reported in Supplementary Figure S1 and in Supplementary Table S1.

4.4. RNA Extraction from Blood Samples

Blood samples were centrifuged at 800 g for 8 min and washed with PBS two times. The obtained pellets were treated with 150 µL of Red Blood lysing buffer (GRiSP, Lda) for 5 min at room temperature two times to remove red cells. After washing with PBS, the pellets were resuspended in 400 µL of R1 buffer for RNA (GRiSP) containing 1 mM dithiothreitol (DTT, Merck, Germany), and incubated at room temperature for 5 min. Next, the samples were mixed with 70% ethanol and transferred to RNA mini spin columns according to the manufacturer's instructions (Total RNA Extraction Kit Blood, GRiSP). Treatment with DNase I "in column" at room temperature for 15 min ensured the removal of contaminating DNA. The RNA samples were evaluated using a Nanodrop DS 11 (DeNovix, USA), showing 260/280 ratios of about 2.0 and concentrations ranging from 10 to 100 ng/µL.

4.5. Real-Time Quantitative RT-PCR

DNase-treated RNA (100 ng) was reverse-transcribed into cDNA using an Improm-II Reverse Transcription System (Promega, Fitchburg, Wisconsin, DC, USA) and oligo dT according to the manufacturer's protocol; controls without the template and another without the enzyme were included in each RT reaction. A total of 2.5 ng of initial RNA in the RT reaction was used to quantitatively evaluate genes, and the gene expression of IL-6, IL-10, TNF-α, and IFN-γ was analyzed by real-time PCR (all the primer pairs used are listed in Table 11) [43,44]. The assays were performed in a Bio-Rad instrument (CFX96 Real-Time System, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) using SYBR Green chemistry (Fast QPCR Master Mix, Smobio, Taiwan). Each sample was analyzed in triplicate, and a negative control (no template reaction) was included in each experiment to check for contamination. The expression of the housekeeping gene beta-glucuronidase (GUSB) in healthy donors was used to normalize the results. Each experiment was completed with a melting curve analysis to confirm the specificity of amplification and the absence of non-specific products and primer dimerization. Quantification was performed using the threshold cycle (Ct) comparative method: the relative expression was calculated as follows: $2^{-[\Delta Ct(\text{sample}) - \Delta Ct(\text{calibrator})]} = 2^{-\Delta \Delta Ct}$, where $\Delta Ct(\text{sample}) = [Ct(\text{target gene}) - Ct(\text{housekeeping gene})]$, and $\Delta Ct(\text{calibrator})$ was the mean of ΔCt of all the HD samples.

Table 11. Primer pair sequences used in the real-time PCR analysis.

Gene		Forward Primer (5'→3')	Reverse Primer (5'→3')
GUSB	NM_000181	CAGTTCCTCCAGCTTCAATG	ACCCAGCCGACAAAATGC
IL-6	NM_000600.3	TGCAATAACCACCCCTGACC	ATTGCCGAAGAGCCCTCAG
IL-10	NM_000572.2	ACATCAAGGCGCATGTGAAC	CACGGCCTTGCTCTTGTITTT
TNF-α	NM_000594.3	CCCGAGTGACAAGCCTGTAG	TGAGGTACAGGCCCTCTGAT
IFN-γ	NM_000619.2	TCAGCTCTGCATCGTTTTGG	GTTCCATTATCCGCTACATCTGAA

4.6. Statistical Analysis

The statistical analysis of group-wise expression levels was performed through the non-parametric Mann–Whitney test in the case of 2 independent samples or Kruskal–Wallis test and Bonferroni's correction in the case of n-independent samples. Pearson's correlation and Benjamini Hochberg FDR correction were used to assess the relationship between two continuous variables after testing for gaussianity through the Shapiro–Wilk test. For the hematology and biochemistry analysis, a one-sample *t*-test with respect to the range values was performed. Comparisons were considered statistically significant when $p \leq 0.050$. Data analyses were performed using the SPSS statistical software system (version 23.0 for Windows, Los Altos, CA, USA).

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/pathogens10121639/s1>, Figure S1. (A) The results are represented as box plots and extreme outliers (numbers) for each group. Box plot of CD169 MFI in lymphocytes and monocytes of healthy donors ($n = 57$) and COVID-19 patients ($n = 68$) and the corresponding RMFI values. Moreover, a table with the results of the ROC Curve for mCD169 MFI and CD169 RMFI was reported; (B) Patients were stratified into three groups based on pulmonary status and compared to HDs ($n = 57$): no pneumonia and non-interstitial pneumonia (None+P, $n = 28$), monolateral or minimal interstitial pneumonia (MiP, $n = 6$), and bilateral or severe pneumonia (BiP, $n = 23$). mCD169 MFI is represented as a box plot of all groups examined, and statistical differences are shown. Non-parametric Kruskal–Wallis tests and Bonferroni’s corrections were used to compare groups; (C) Patients were stratified into two groups based on treatment with antiviral and corticosteroids at sampling (COV-treated, $n = 25$; COV-untreated, $n = 19$) and are represented as median \pm SD of mCD169 MFI in treated vs. untreated COV patients as a box plot. Non-parametric Kruskal–Wallis tests and Bonferroni’s correction were used to compare groups, and values were considered statistically significant when $p \leq 0.050$. Figure S2. Gating strategy for the flow cytometry analysis of CD169 expression in blood cells of COV and HD samples. (A,B) A representative gating strategy in leukocytes from a healthy donor (HD, panel A) and a COVID-19 patient (COV, panel B) for the analysis of the mean intensity of CD169 PE, CD64 PB, and HLA-DR APC fluorescence. FSC vs. SSC dot plots on leukocytes (left panel), gate for HLADR+ monocytes and lymphocytes (middle panel), and subsequent CD64+ monocytes and CD64-lymphocyte gates (right panel). (C) Monocyte and lymphocyte CD169 MFI histogram overlay. (D) Calculation of the CD169 MFI ratio between monocytes and lymphocytes (RMFI). Table S1. ROC curve for CD169 RMFI and CD169 in monocytes in COV with respect to HD. The area under ROC curve (AUC) is indicated as well as the sensitivity and specificity of the test. Table S2. Correlation between mCD169 MFI and CD169 RMFI with biochemical parameters and Immune system markers. Pearson’s correlation was used to assess the relationship between the two continuous variables. Values were considered statistically significant when $p \leq 0.050$.

Author Contributions: Conceptualization, A.M. and C.M.; Data curation, A.M., V.P., M.F., M.I., L.S., E.B. and F.M.; Formal analysis, A.M., V.P., M.I., I.A.B. and E.B.; Investigation, A.M., V.P., M.F., M.I., M.G., I.A.B., M.Z., P.V., L.S. and S.G.; Methodology, F.M. and C.M.; Project administration, M.G.; Resources, M.I., M.Z., P.V., L.S., M.A., S.G. and C.M.; Supervision, A.M. and C.M.; Validation, C.M., V.P., M.F. and E.B.; Visualization, V.P. and M.F.; Writing—original draft, C.M., V.P., M.F. and C.M.; Writing—review and editing, M.I., G.R., P.S.-V., L.S., M.A., E.B., S.G. and C.M. All the authors will be informed about each step of manuscript processing, including submission, revision, revision reminders, etc., via emails from our system or the assigned Assistant Editor. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: No specific funding was received for this work. The study was supported by Beckman Coulter, which provided materials and reagents for CD169 analysis, and by facilities from the University of Rome “Tor Vergata”.

Institutional Review Board Statement: Ethical approval for the collection and use of human samples was obtained from the ethical committee of “Tor Vergata” Hospital, COronaVIrus Disease: Safety and Efficacy of Experimental Treatment (COVID_SEET prot.7562/2020. 9 April 2020, experimental register 46.20). The blood samples from healthy donors ($n = 57$, HDs) were obtained from individuals attending the local blood Transfusion Unit of Policlinic of “Tor Vergata” in Rome who were referred to the Virology Unit of PTV for screening. All the HDs and COV patients provided written informed consent.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all the subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Data is contained within the article and supplementary material.

Acknowledgments: The authors would like to thank Joe Olechno for helpful discussions and linguistic revision, and Beckman Coulter for providing reagents used in the study. This private company had no role in the study design or collection and interpretation of the clinical data.

Conflicts of Interest: The other authors have nothing to disclose. F.M. and Inès Ait Belkacem are Beckman Coulter employees. No private companies had any role in the study design or collection and interpretation of the clinical data.

References

1. Tay, M.Z.; Poh, C.M.; Rénia, L.; MacAry, P.A.; Ng, L.F.P. The trinity of COVID-19: Immunity: Inflammation and intervention. *Nat. Rev. Immunol.* **2020**, *20*, 363–374. [[CrossRef](#)]
2. Wadaa-Allah, A.; Emhamed, M.S.; Sadeq, M.A.; Dahman, N.B.H.; Ullah, I.; Farrag, N.S.; Negida, A. Efficacy of the current investigational drugs for the treatment of COVID-19: A scoping review. *Ann. Med.* **2021**, *53*, 318–334. [[CrossRef](#)]
3. To, K.K.; Sridhar, S.; Chiu, K.H.; Hung, D.L.; Li, X.; Hung, I.F.; Tam, A.R.; Chung, T.W.; Chan, J.F.; Zhang, A.J.; et al. Lessons learned 1 year after SARS-CoV-2 emergence leading to COVID-19 pandemic. *Emerg. Microbes Infect.* **2021**, *10*, 507–535. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Matteucci, C.; Minutolo, A.; Balestrieri, E.; Petrone, V.; Fanelli, M.; Malagnino, V.; Ianetta, M.; Giovinazzo, A.; Barreca, F.; Di Cesare, S.; et al. Thymosin Alpha 1 Mitigates Cytokine Storm in Blood Cells from Coronavirus Disease 2019 Patients. *Open Forum Infect. Dis.* **2020**, *5*, ofaa588. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Jan, L.Y.; Xia, Y.; Qiu, C.H. Functions of CD169 positive macrophages in human diseases. *Biomed. Rep.* **2021**, *14*, 26.
6. Klaas, M.; Crocker, P.R. Sialoadhesin in recognition of self and non-self. *Semin. Immunopathol.* **2012**, *34*, 353–364. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Bourgoin, P.; Biéché, G.; Ait Belkacem, I.; Morange, P.E.; Malergue, F. Role of the interferons in CD64 and CD169 expressions in whole blood: Relevance in the balance between viral- or bacterial-oriented immune responses. *Immun. Inflamm. Dis* **2020**, *8*, 106–123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Xu, H.C.; Huang, J.; Khairnar, V.; Duhan, V.; Pandya, A.A.; Grusdat, M.; Shinde, P.; McIlwain, D.R.; Maney, S.K.; Gommerman, J.; et al. Deficiency of the B cell-activating factor receptor results in limited CD169+ macrophage function during viral infection. *J. Virol.* **2015**, *89*, 4748–4759. [[CrossRef](#)]
9. Pino, M.; Erkizia, I.; Benet, S.; Erikson, E.; Fernández-Figueras, M.T.; Guerrero, D.; Dalmau, J.; Ouchi, D.; Rausell, A.; Ciuffi, A.; et al. HIV-1 immune activation induces Siglec-1 expression and enhances viral trans-infection in blood and tissue myeloid cells. *Retrovirology* **2015**, *12*, 37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Rempel, H.; Calosing, C.; Sun, B.; Pulliam, L. Sialoadhesin expressed on IFN-induced monocytes binds HIV-1 and enhances infectivity. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e1967. [[CrossRef](#)]
11. Perez-Zsolt, D.; Erkizia, I.; Pino, M.; García-Gallo, M.; Martin, M.T.; Benet, S.; Chojnacki, J.; Fernández-Figueras, M.T.; Guerrero, D.; Urrea, V.; et al. Anti-Siglec-1 antibodies block Ebola viral uptake and decrease cytoplasmic viral entry. *Nat. Microbiol.* **2019**, *4*, 1558–1570. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Feng, Z.; Diao, B.; Wang, R.; Wang, G.; Wang, C.; Tan, Y.; Liu, L.; Wang, C.; Liu, Y.; Liu, Y.; et al. The Novel Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Directly Decimates Human Spleens and Lymph Nodes. *medRxiv* **2020**. [[CrossRef](#)]
13. Ortilion, M.; Coudereau, R.; Cour, M.; Rimmelè, T.; Godignon, M.; Gossez, M.; Yonis, H.; Argaud, L.; Lukaszewicz, A.C.; Venet, F.; et al. Monocyte CD169 expression in COVID-19 patients upon intensive care unit admission. *Cytometry A.* **2021**, *99*, 466–471. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Bedin, A.S.; Makinson, A.; Picot, M.C.; Mennechet, F.; Melergue, F.; Pisoni, A.; Nyiramigisha, E.; Montagnier, L.; Bollere, K.; Debiesse, S.; et al. Monocyte CD169 Expression as a Biomarker in the Early Diagnosis of Coronavirus Disease 2019. *J. Infect. Dis.* **2021**, *223*, 562–567. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Bourgoin, P.; Soliveres, T.; Barbaresi, A.; Londou, A.; Ait Belkacem, I.; Arnoux, I.; Bernot, D.; Loosveld, M.; Morange, P.E.; Michelet, P.; et al. CD169 and CD64 could help differentiate bacterial from COVID-19 or other viral infections in the Emergency Department. *Cytometry A.* **2021**, *99*, 435–445. [[CrossRef](#)]
16. Comins-Boo, A.; Gutiérrez-Larrañaga, M.; Roa-Bautista, A.; Guiral Foz, S.; Renuncio García, M.; González López, E.; Jirure Ventura, J.; Fariñas-Álvarez, M.C.; San Segundo, D.; López Hoyos, M. Validation of a Quick Flow Cytometry-Based Assay for Acute Infection Based on CD64 and CD169 Expression. New Tools for Early Diagnosis in COVID-19 Pandemic. *Front Med.* **2021**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Frederico, B.; Chao, B.; Lawler, C.; May, J.S.; Stevenson, P.G. Subcapsular sinus macrophages limit acute gammaherpesvirus dissemination. *J. Gen. Virol.* **2015**, *96*, 2314–2327. [[CrossRef](#)]
18. McKechnie, J.L.; Blish, C.A. The Innate Immune System: Fighting on the Front Lines or Fanning the Flames of COVID-19? *Cell Host Microbe.* **2020**, *27*, 863–869. [[CrossRef](#)]
19. Merad, M.; Martin, J.C. Pathological inflammation in patients with COVID-19: A key role for monocytes and macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* **2020**, *20*, 355–362. [[CrossRef](#)]
20. Vabret, N.; Britton, G.J.; Gruber, C.; Hegde, S.; Kim, J.; Kuksin, M.; Levantovsky, R.; Malle, L.; Moreira, A.; Park, M.D.; et al. Immunology of COVID-19: Current State of Science. *Immunity* **2020**, *52*, 910–941. [[CrossRef](#)]
21. Chevrier, S.; Zurbuchen, Y.; Cervia, C.; Adamo, S.; Raeber, M.E.; de Souza, N.; Sivapatham, S.; Jacobs, A.; Bachli, E.; Rudiger, A.; et al. A distinct innate immune signature marks progression from mild to severe COVID-19. *Cell. Rep. Med.* **2020**, *2*, 100166. [[CrossRef](#)]
22. Martinez, F.O.; Combes, T.W.; Orsenigo, F.; Gordon, S. Monocyte activation in systemic COVID-19 infection: Assay and rationale. *EBioMedicine* **2020**, *59*, 102964. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Di Micco, P.; Russo, V.; Carannante, N.; Imperato, M.; Cardillo, G.; Lodigiani, C. Prognostic Value of Fibrinogen among COVID-19 Patients Admitted to an Emergency Department: An Italian Cohort Study. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 4134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

24. Barlass, U.; Williams, B.; Dhana, K.; Adnan, D.; Shahab, R.K.; Mahdavinia, M.; Bishehsari, F. Marked Elevation of Lipase in COVID-19 Disease: A Cohort Study. *Clin. Transl. Gastroenterol.* **2020**, *11*, e00215. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Kulkarni, A.V.; Kumar, P.; Tevethia, H.V.; Premkumar, M.; Arab, J.P.; Candia, R.; Talukdar, R.; Sharma, M.; Qu, X.; Rao, P.N.; et al. Systematic review with meta-analysis: Liver manifestations and outcomes in COVID-19. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2020**, *52*, 584–599. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Ji, P.; Zhu, J.; Zhong, Z.; Li, H.; Pang, J.; Li, B.; Zhang, J. Association of elevated inflammatory markers and severe COVID-19: A meta-analysis. *Medicine* **2020**, *99*, e23315. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Han, H.; Ma, Q.; Li, C.; Liu, R.; Zhao, L.; Wang, W.; Zhang, P.; Liu, X.; Gao, G.; Liu, F.; et al. Profiling serum cytokines in COVID-19 patients reveals IL-6 and IL-10 are disease severity predictors. *Emerg. Microbes Infect.* **2020**, *9*, 1123–1130. [[CrossRef](#)]
28. Wang, W.; Ye, L.; Ye, L.; Li, B.; Gao, B.; Zeng, Y.; Kong, L.; Fang, X.; Zheng, H.; Wu, Z.; et al. Up-regulation of IL-6 and TNF-alpha induced by SARS-coronavirus Spike protein in murine macrophages via NF-kappaB pathway. *Virus Res.* **2007**, *128*, 1–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Shah, V.K.; Fimal, P.; Alam, A.; Ganguly, D.; Chattopadhyay, S. Overview of Immune Response during SARS-CoV-2 Infection: Lessons from the Past. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 1949. [[CrossRef](#)]
30. Chen, Z.; Wherry, E.J. T cell responses in patients with COVID-19. *Nat. Rev. Immunol.* **2020**, *20*, 529–536. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. De Candia, P.; Prattichizzo, F.; Garavelli, S.; Matarese, G. T Cells: Warriors of SARS-CoV-2 Infection. *Trends Immunol.* **2021**, *42*, 18–30. [[CrossRef](#)]
32. Sami, R.; Fathi, F.; Eskandari, N.; Ahmadi, M.; Aref Nezhad, R.; Motedayyen, H. Characterizing the immune responses of those who survived or succumbed to COVID-19: Can immunological signatures predict outcome? *Cytokine* **2021**, *140*, 155439. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Ohnishi, K.; Yamaguchi, M.; Erdenebaatar, C.; Saito, F.; Tashiro, H.; Katabuchi, H.; Takeya, M.; Komohara, Y. Prognostic significance of CD169-positive lymph node sinus macrophages in patients with endometrial carcinoma. *Cancer Sci.* **2016**, *107*, 846–852. [[CrossRef](#)]
34. Focosi, D.; Bestagno, M.; Burrone, O.; Petrini, M. CD57⁺ T lymphocytes and functional immune deficiency. *J. Leukoc. Biol.* **2010**, *87*, 107–116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Pinti, M.; Appay, V.; Campisi, J.; Frasca, D.; Fülöp, T.; Sauce, D.; Larbi, A.; Weinberger, B.; Cossarizza, A. Aging of the immune system: Focus on inflammation and vaccination. *Eur. J. Immunol.* **2016**, *46*, 2286–2301. [[CrossRef](#)]
36. Balestrieri, E.; Minutolo, A.; Petrone, V.; Fanelli, M.; Iannetta, M.; Malagnino, V.; Zordan, M.; Vitale, P.; Charvet, B.; Horvat, B.; et al. Evidence of the pathogenic HERV-W envelope expression in T lymphocytes in association with the respiratory outcome of COVID-19 patients. *EbiMedicine.* **2021**, *66*, 103341. [[CrossRef](#)]
37. Chamoto, K.; Al-Habsi, M.; Honjo, T. Role of PD-1 in immunity and diseases. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2017**, *410*, 75–97. [[PubMed](#)]
38. De Biasi, S.; Lo Tartaro, D.; Meschiari, M.; Gibellini, L.; Bellinazzi, C.; Borella, R.; Fidanza, L.; Mattioli, M.; Paolini, A.; Gozzi, L.; et al. Expansion of plasmablasts and loss of memory B cells in peripheral blood from COVID-19 patients with pneumonia. *Eur. J. Immunol.* **2020**, *50*, 1283–1294. [[CrossRef](#)]
39. Sosa-Hernández, V.A.; Torres-Ruiz, J.; Cervantes-Díaz, R.; Romero-Ramírez, S.; Páez-Franco, J.C.; Meza-Sánchez, D.E.; Juárez-Vega, G.; Pérez-Fragoso, A.; Ortiz-Navarrete, V.; Ponce-de-Leon, A.; et al. B Cell Subsets as Severity-Associated Signatures in COVID-19 Patients. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 611004. [[CrossRef](#)]
40. Perez-Zsolt, D.; Muñoz-Basagoiti, J.; Rodon, J.; Elosua-Bayes, M.; Raich-Regué, D.; Risco, C.; Sachse, M.; Pino, M.; Gumber, S.; Paiardini, M.; et al. SARS-CoV-2 interaction with Siglec-1 mediates trans-infection by dendritic cells. *Cell Mol. Immunol.* **2021**, *18*, 2676–2678. [[CrossRef](#)]
41. Bogie, J.F.; Boelen, E.; Louagie, E.; Delputte, P.; Elewaut, D.; van Horssen, J.; Hendriks, J.J.; Hellings, N. CD169 is a marker for highly pathogenic phagocytes in multiple sclerosis. *Mult. Scler.* **2018**, *24*, 290–300. [[CrossRef](#)]
42. Von Stuckrad, S.L.; Klotsche, J.; Biesen, R.; Lieber, M.; Thumfart, J.; Meisel, C.; Unterwalder, N.; Kallinich, T. SIGLEC1 (CD169) is a sensitive biomarker for the deterioration of the clinical course in childhood systemic lupus erythematosus. *Lupus* **2020**, *29*, 1914–1925. [[CrossRef](#)]
43. Kuznik, A.; Bencina, M.; Svajger, U.; Jeras, M.; Rozman, B.; Jerala, R. Mechanism of endosomal TLR inhibition by antimalarial drugs and imidazoquinolines. *J. Immunol.* **2011**, *186*, 4794–4804. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Doehn, J.M.; Tabeling, C.; Biesen, R.; Saccomanno, J.; Madlung, E.; Papp, E.; Gabriel, F.; Kurth, F.; Meisel, C.; Corman, V.M.; et al. CD169/SIGLEC1 is expressed on circulating monocytes in COVID-19 and expression levels are associated with disease severity. *Infection* **2021**, *6*, 1–6. [[CrossRef](#)]

Role of the interferons in CD64 and CD169 expressions in whole blood: Relevance in the balance between viral- or bacterial-oriented immune responses

Pénélope Bourgoïn^{1,2}  | Géraldine Biéché¹ | Inès Ait Belkacem^{1,3} | Pierre-Emmanuel Morange^{2,4} | Fabrice Malergue¹

¹Department of Research and Development, Immunotech-Beckman Coulter, Marseille, France

²C2VN INSERM-INRAE, Aix-Marseille University, Marseille, France

³UMR 7280, Center for Marseille-Luminy Immunology (CIML), Marseille, France

⁴Laboratory of Hematology, La Timone Hospital (AP-HM), Marseille, France

Correspondence

Pénélope Bourgoïn, 130 Avenue de Lattre de Tassigny, 13009 Marseille, France.
Email: pbourgoïn01@beckman.com

Funding information

Association Nationale de la Recherche et de la Technologie, Grant/Award Numbers: 2016/1368, 2018/1212

Abstract

Introduction: CD64 expression increases on neutrophils during bacterial infections. Recently an increase in CD169 expression has been discovered on monocytes during viral infections. Generally, interferons α (IFN α) and IFN γ are key drivers of the infectious host immune response. The purpose of this study was to explore if a link exists between these IFNs and both biomarkers.

Methods: Whole blood samples from healthy volunteers were stimulated with either IFNs, interleukins, or infectious extracts, to mimic an infectious state. Expressions of CD64 and CD169 were assessed in these samples by multiple flow cytometry methods, over precise kinetics.

Results: The expression of CD64 was statistically higher in samples stimulated with IFN γ , and CD169 in those stimulated with IFN α (and all other type I IFNs). Surface expressions are directly induced by their respective IFNs via Janus kinase/signal transducer and activator of transduction pathways within 6 to 8 hours of incubation. Mixing both types of IFNs seemed to indicate that they partially inhibit each other.

Conclusions: The induction of CD169 on monocytes and CD164 on neutrophils by type I and type II IFNs confirms the relevance of these markers for assessing between a viral- vs bacterial-oriented immune response.

KEYWORDS

CD169, CD64, flow cytometry, interferons, pathways

1 | INTRODUCTION

To survive in its living environment, the human body is protected from infectious agents, their toxins, and the damage they can cause, by a set of effector cells and

molecules. The innate immune system is an early but less-specific biological mechanism that avoids the development of pathogenic organisms.¹ Myeloid cells, such as monocytes and macrophages, neutrophils, or dendritic cells (DCs), have pattern recognition receptors

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2020 The Authors. *Immunity, Inflammation and Disease* published by John Wiley & Sons Ltd.

(PRR) to immediately identify the pathogen-associated or damage-associated molecular patterns (PAMP or DAMP) from microorganisms. The binding of PAMP or DAMP to the PRR triggers a robust inflammatory response that leads to the activation of different signaling cascades depending on the nature of the infectious agent. Thus, among other things, it activates the production of antibacterial or antiviral mediators, such as interferon (IFN), as well as the expression of various molecules on the surface of the immune cells.² Particularly, the secretion of type I IFNs (IFN I) has been suggested as a specific cellular response of viral infections and includes the IFN- α family plus IFN- β , IFN- ω , IFN- κ , and IFN- ε . By contrast, only the unique type II IFN (IFN II), the IFN- γ , mainly contributes to the clearance of bacterial infections.³

If IFN I and IFN II are clear signatures associated with viral and bacterial infections, their short life in the body fluids does not allow a robust differentiation.⁴ Thus, it appears that it would be useful to study molecules that are more stably expressed downstream of IFN activation.

CD64, also known as the high-affinity immunoglobulin fragment crystallizable- γ receptor 1, is mainly distributed on the surface of cells of myeloid lineage such as macrophages, monocytes, and DCs, for providing the first line of recognition and defense against invading microorganisms.⁵ It has almost no expression on neutrophils under healthy homeostasis. Upon bacterial infection, the activation of the immune system releases proinflammatory cytokines, including IFN γ , that highly induce the expression of CD64 on neutrophils (nCD64).^{6–8}

Interestingly, recent works have identified sialoadhesin CD169 (Sn or SIGLEC-1), a member of the sialic acid-binding immunoglobulin-like lectins (SIGLEC) family, as having a role during viral infections.^{9,10} CD169 has been shown to be expressed on the surface of DCs and monocytes after antiviral molecule release, and, more particularly, a twofold elevated upregulation of CD169 on monocytes (mCD169) was observed in vitro when induced by IFN α .^{11,12}

Thus, the combinatorial detection of CD64 and CD169, respectively, on the surface of neutrophils and monocytes, could be a specific measure for the distinction between the different causes of infections.¹³ The main goal of the study was to understand the link that exists between both biomarkers and IFNs produced in response to infections. The main hypothesis was that the understanding of this functional link could help demonstrate the relevance of using these biomarkers for discriminating between bacterial and viral infections.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Study samples and activation testing

Immunotech evaluations were conducted on leftover heparin blood samples from healthy volunteers, obtained from the Saint Joseph Hospital (Marseille, France) and tested after informed consent and hospital Ethical Committee approval.

Samples were activated either with type I IFNs (IFN α 1-alpha A (2a), IFN α 2-alpha B2 (8), IFN α 3-alpha C (10), IFN α 4-alpha D (1 [Val(114)]), IFN α 5-alpha F (21), IFN α 6-alpha G (5), IFN α 7-alpha H2 (14), IFN α 8-alpha I (17), IFN α 9-alpha J1 (7), IFN α 10-alpha K (6), IFN α 11-alpha 4b (4), IFN α 12-alpha WA (16), IFN β , and IFN ω), used at 3 ng/mL, or with IFN γ , used at 30 ng/mL, all from R&D Systems (Minneapolis, MN).

For comparison, whole blood was also activated with interleukins (IL) (IL-2, IL-6, IL-12, and IL-18), used at 1000 U/mL, from R&D Systems, or infectious extracts, such as polyinosinic-polycytidylic acid (Poly IC) or lipopolysaccharide (LPS), from *Escherichia coli* O127:B8, both at 10 μ g/mL, from Sigma-Aldrich Co, (St. Louis, MO).

All activations were made in closed tubes in a water bath at 37°C. When needed, samples were also cocubated with Brefeldin A (Bref. A), at 10 μ g/mL, from Sigma-Aldrich Co.

For in vivo comparison of these in vitro activations, leftover ethylenediaminetetraacetic acid blood samples from viral- and bacterial-infected subjects, admitted to the Adult Emergency Unit at La Timone Hospital (Marseille, France), were tested within 4 hours of admission. Samples were obtained under informed consent and Ethical Committee approval (Committee for Protection of Persons n°181160; ID-RCB n° 2018 A02706-49).

2.2 | Flow cytometry procedures

Samples were treated at room temperature with flow cytometry extracellular and/or intracellular and/or phospho-epitopes procedures, with reagents that were for research use only and all used at their recommended doses. For each experiment, multiple individual samples were processed (number of tested donors indicated by n), with all testing in singlicate due to the known strong reproducibility of the procedures used.

The extracellular procedure has been described by Bourgoin et al¹⁴ in 2019. Briefly, 5 μ L of whole blood is

simultaneously lysed and stained at room temperature by incubating for 15 minutes in the dark, with 500 μ L of the Versalyse lysing solution and the CD64-CD169/ infections dried custom mixture, composed of anti-CD169-phycoerythrin (PE) (clone 7-239) and anti-CD64-Pacific Blue (PBE) (clone 22). The custom mixture was replaced either with anti-IgG1-PE and

anti-IgG1-PBE, at the same concentrations, for staining controls, or with Annexin V-fluorescein isothiocyanate and propidium iodide for cell death evaluation. All products or custom products come from Beckman Coulter Inc, (Brea, CA).

The intracellular procedure is the method described within the PerFix nc kit (Beckman Coulter Inc). Briefly,

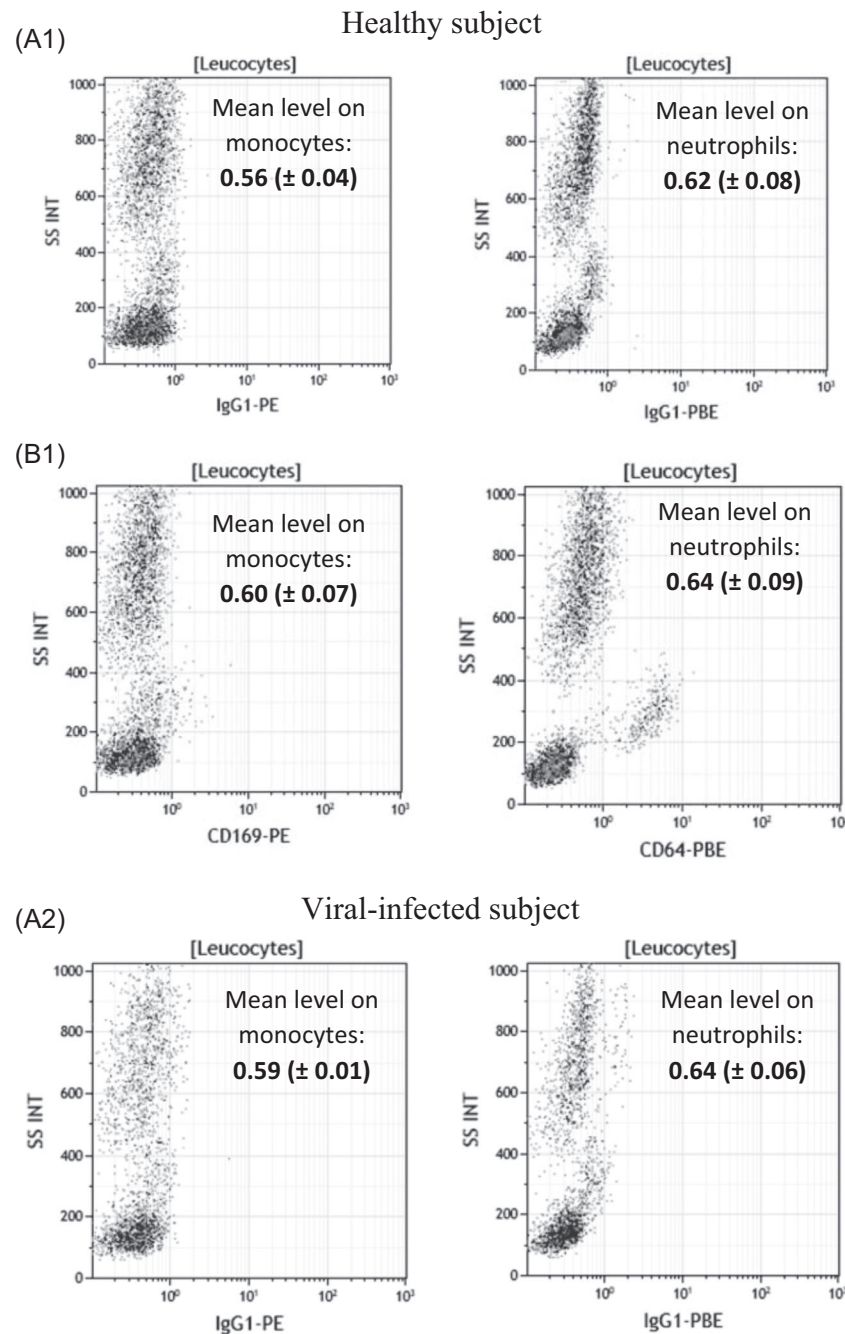


FIGURE 1 CD169 and CD64 in vivo expressions in whole blood. Either IgG1-PE and IgG1-PBE (isotype; A1,A2), or CD169-PE and CD64-PBE (staining; B1) expressions were respectively measured on the surface of the monocytes and of the neutrophils in the whole blood of five healthy subjects, five viral-infected subjects, and five bacterial-infected subjects. Results are expressed as averages \pm standard deviations of their median of fluorescence intensities (MFI). Examples were given for one first healthy volunteer whole blood, one-second viral-infected whole blood, and one-third bacterial-infected whole blood

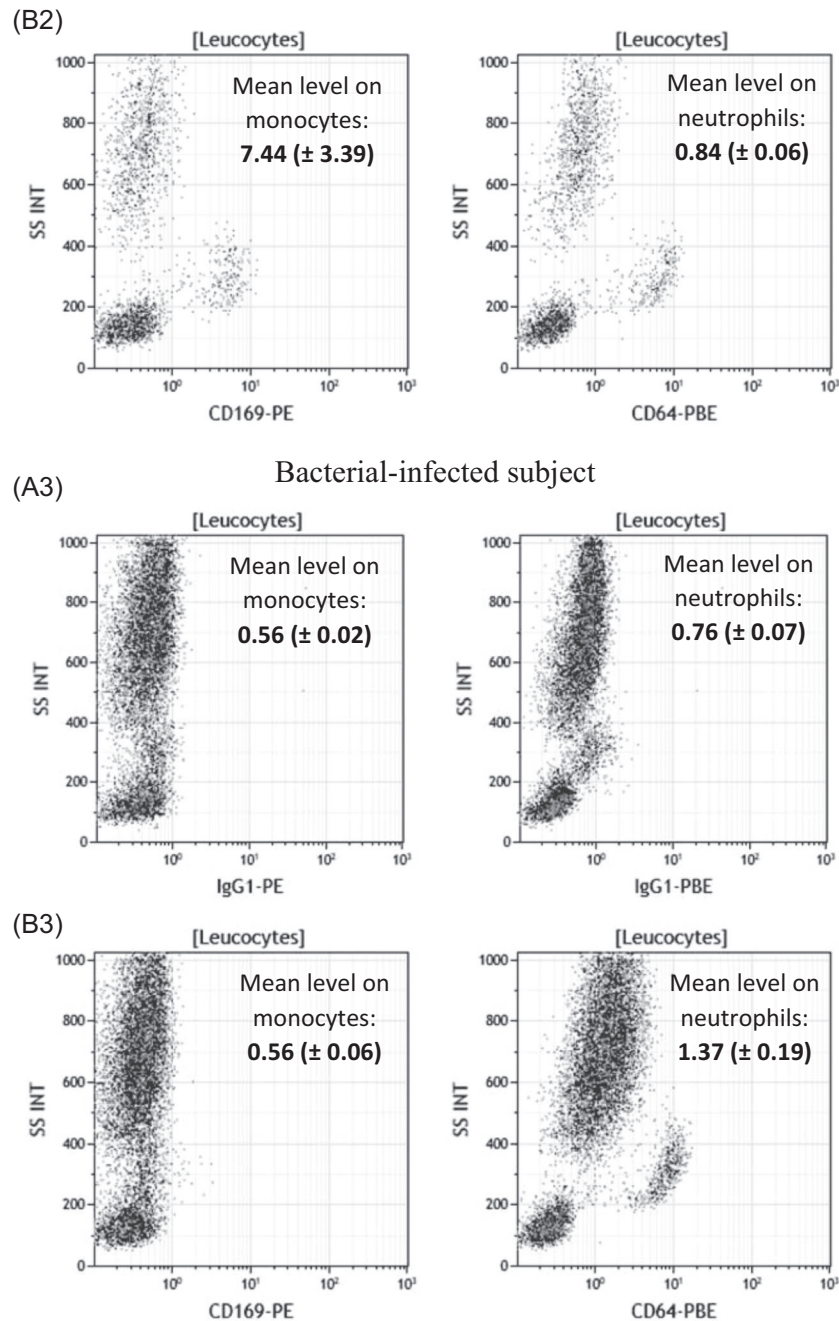


FIGURE 1 (Continued)

50 μ L of whole blood is first fixed with the kit reagent number 1 “R1” and incubated for 15 minutes, then simultaneously lysed, permeabilized, and stained by incubating for 15 minutes in the dark with the kit reagent number 2 “R2” and the CD64-CD169/infections dried custom mixture. Finally, the sample is washed once with the kit reagent number 3 “R3.”

The phospho-epitopes procedure is the method described within the PerFix EXPOSE kit (Beckman Coulter Inc). Briefly, 100 μ L of whole blood is first fixed with the kit reagent number 1 “R1” by incubating for 10 minutes and is simultaneously permeabilized and

lysed with the kit reagent number 2 “R2” by incubating for 10 minutes. After a wash step, sample is stained by incubating for 15 minutes in the dark with the kit reagent number 3 “R3” and the DCs dried custom mixture, composed of anti-CD123-PE cyanin 7 (clone SSDCLY107D2), anti-CD3-allophycocyanin (APC) (clone UCHT1), anti-CD14-APC (clone RMO52), anti-CD19-APC (clone J3-119), anti-CD56-APC (clone N901-NKH1), anti-CD11c-APC Alexa Fluor 700 (clone BU15), anti-human leukocyte antigen-DR (HLA-DR)-PBE (clone Immu 357) and anti-CD45-Krome Orange (clone J33), all products from Beckman Coulter Inc.

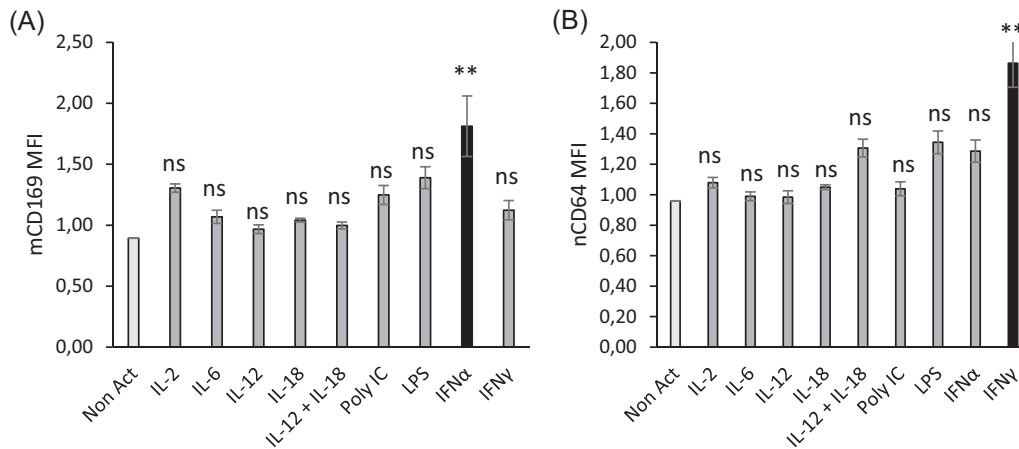


FIGURE 2 CD169 and CD64 expressions after blood stimulation. Whole blood of three donors was coincubated for 7 hours at 37°C with either no activator (Non Act), or interleukins (IL-2, IL-6, IL-12, IL-18, IL-12 + IL-18) or infectious extracts (Poly IC, lipopolysaccharide [LPS]) or interferons (IFN α 1 and IFN γ). Extracellular staining of the activated blood was performed with the CD64-CD169/infections antibody mixture. Results are expressed as averages \pm standard deviations of the median of fluorescence intensities (MFI) of CD169 on monocytes (mCD169) (A) and of CD64 on neutrophils (nCD64) (B). The comparison was made using a Dunnett's control test, with the Non-Act condition used as control (in white) and *P* value was considered either not statistically significant above .05 (in gray; NS) or statistically significant under .05 (in black; *) or under .01 (in black; **). NS, not significant

When needed, anti-phospho-epitope antibodies were also added: anti-phosphorylated signal transducer and activator of transcription (pSTAT) 1-Alexa Fluor 488 (clone 58D6), or pSTAT2-PE (clone D3P2P) from Cell Signaling Technology Inc, (Danvers, MA). Finally, the sample is washed once with the kit reagent number 4 "R4."

2.3 | Flow cytometry and statistical analyses

All data were collected on a 3-laser, 10-color Navios flow cytometer and analyzed using Kaluza Software version 2.1 (both from Beckman Coulter Inc).

When using CD64-CD169/infections dried custom mixture, monocytes and neutrophils were first gated on the basis of their typical forward- and side-scatter characteristics. CD169 and CD64 were respectively measured on the surface of the gated cells on monoparametric histograms.

When using the DCs dried custom mixture, leukocytes were first gated on their CD45 expression. Monocytes and neutrophils were gated out on the basis of their side-scatter characteristics whereas DCs were isolated based on their additional HLA-DR+ CD3- CD14- CD19- CD56- expression. Myeloid DCs (mDCs) were differentiated from plasmacytoid DCs (pDCs) on their respective CD11c+ or CD123+ expressions. Finally, phosphoepitope expressions were measured on monocytes, neutrophils, mDCs, or pDCs.

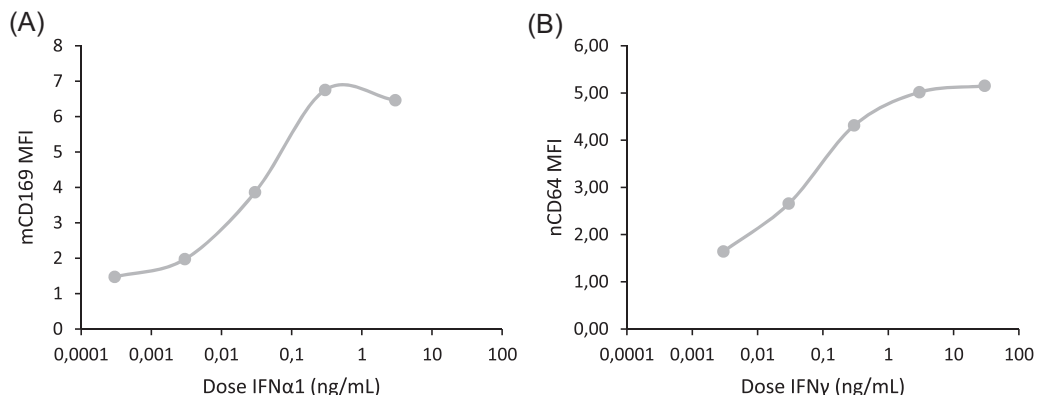


FIGURE 3 Dose-response curves of interferon α 1 (IFN α 1) and IFN γ . The whole blood of two donors was coincubated for 15 hours at 37°C with five doses (between 0.0003, 0.003, 0.03, 0.3, 3, or 30 ng/mL) of either one type I IFN (IFN α 1) or one type II IFN (IFN γ). Extracellular staining of the activated blood was performed with the CD64-CD169/infections antibody mixture. Results were expressed as averages of the median of fluorescence intensities (MFI) of CD169 on monocytes (mCD169) (Figure 2A) and of CD64 on neutrophils (nCD64) (Figure 2B)

All results were given as a median of fluorescence intensity related to the entire population.

Comparisons of quantitative variables were performed using paired Tukey or Dunnett's control tests and

by analysis of variance for more than two groups. The statistical analyses were performed using Jump software version 10 (SAS Institute Inc, Cary, NC). All *P* values are considered statistically significant under .05.

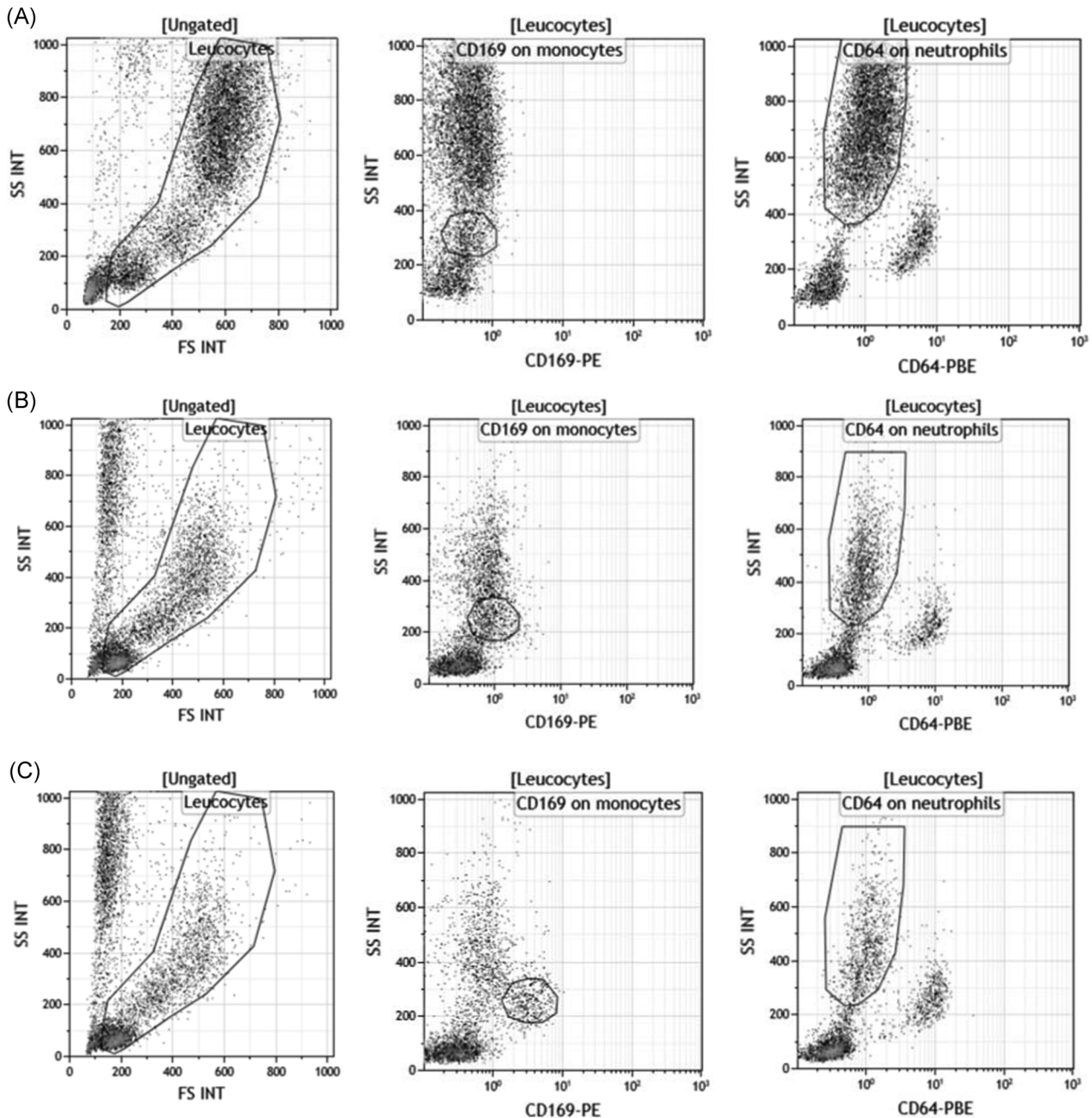


FIGURE 4 CD169 and CD64 flow cytometry expressions on natural or incubated blood. First, leukocytes were isolated from red blood cells or debris or apoptotic cells based on their typical side (SS INT) and forward scatter (FS INT). Then, CD169 and CD64 were respectively measured on the surface of the monocytes (CD169 on monocytes) and of the neutrophils (CD64 on neutrophils). Examples of their expressions were given for three subjects: A, One first healthy volunteer whole blood. B, The same healthy volunteer whole blood that was not activated by interferons (IFNs), but that staid 15 hours at 37°C. C, The same healthy volunteer whole blood that was activated by IFN α 1 for 15 hours at 37°C. D, The same healthy volunteer whole blood that was activated by IFN γ for 15 hours at 37°C. E, One-second viral-infected whole blood, and (F) one-third bacterial-infected whole blood

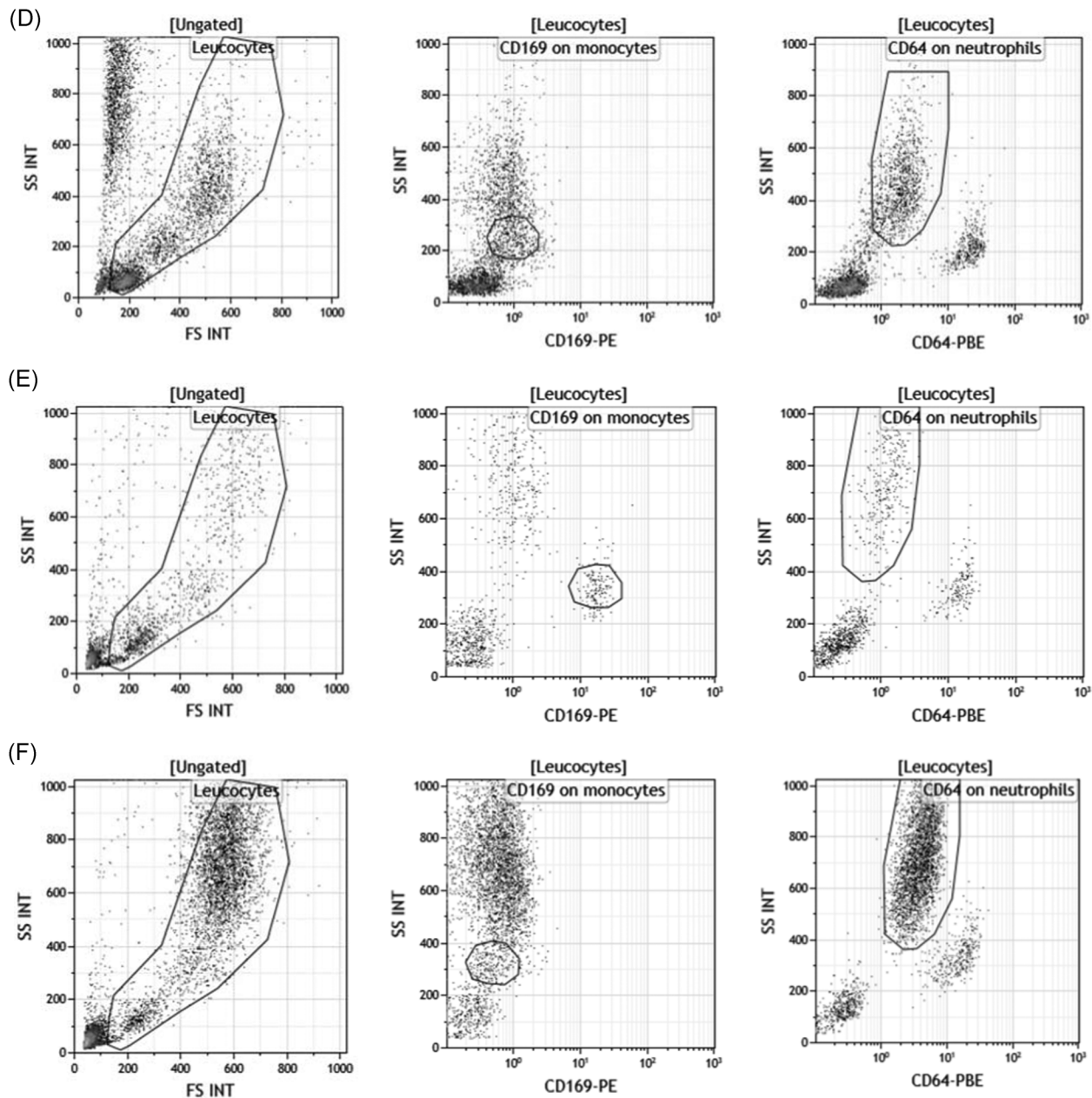


FIGURE 4 (Continued)

3 | RESULTS

3.1 | CD169 and CD64 expressions are induced by IFN stimuli

In the preamble to the study, natural *in vivo* expressions of CD169 at the surface of monocytes and of CD64 at the surface of neutrophils were assessed in healthy and viral- or bacterial-infected subjects (Figure 1). In comparison to healthy subjects, results showed that mCD169 expression was increased from $0.60 (\pm 0.07)$ to $7.44 (\pm 3.39)$ in viral-infected subjects ($n = 5$), and nCD64 expression was increased from

$0.64 (\pm 0.09)$ to $1.37 (\pm 0.19)$ in bacterial-infected subjects ($n = 5$), whereas no change was measured in the respective isotopic control tubes.

The first part of the study was to quantify and statistically compare these same expressions when whole blood is co-incubated *in vitro* with several activators. Since most of them are known to induce multiple responses and the release of other soluble mediators, a short incubation time was chosen to limit the risk of measuring indirect effects. At 3 and 5 hours, no specific effects were detected (except LPS non-specific early response), whereas the first significant changes were observed at 7 hours (Figure 2). All detailed values are given in Table S1.

After 7 hours of incubation, mCD169 expression was significantly increased in whole blood activated by IFN α 1 (1.8 ± 0.6 , $P = .006$; $n = 3$), in comparison to a nonactivated whole blood (0.9 ± 0.1), whereas it was unchanged when incubated with other activators (IL-2 = 1.3 ± 0.1 , $P = .2011$; IL-6 = 1.1 ± 0.2 , $P = .9219$; IL-12 = 1.0 ± 0.1 , $P = .9999$; IL-18: 1.0 ± 0.1 , $P = .9674$; IL-12 + IL-18 = 1.0 ± 0.1 , $P = .9964$; Poly IC = 1.3 ± 0.1 , $P = .3324$; LPS = 1.4 ± 0.3 , $P = .0857$; IFN γ = 1.1 ± 0.1 , $P = .7634$).

Conversely, nCD64 expression was significantly increased in whole blood activated by IFN γ (1.9 ± 0.4 , $P < .0001$; $n = 3$), in comparison to a nonactivated whole blood (1.0 ± 0.1), whereas it was unchanged when incubated with other activators (IL-2 = 1.1 ± 0.1 , $P = .9515$; IL-6 = 1.0 ± 0.1 , $P = 1.0000$; IL-12 = 1.0 ± 0.1 , $P = 1.0000$; IL-18 = 1.1 ± 0.1 , $P = .9910$; IL-12 + IL-18 = 1.3 ± 0.2 , $P = .1228$; Poly IC = 1.0 ± 0.1 , $P = .9962$; LPS = 1.3 ± 0.1 , $P = .0725$; IFN α 1 = 1.3 ± 0.2 , $P = .1597$).

After 24 hours of incubation, some activators induced increased responses, indicating they had later effects on the blood samples, probably via indirect pathways. Therefore, the results of this screening indicated that IFNs have earlier, more direct and more persistent potential implications in biomarker expression.

Dose-response curves for IFN α 1 and IFN γ were then established to determine the optimum dose to maximize mCD169 and nCD64 expression, respectively (Figure 3). Longer incubation time was tested to increase the observed effects (15 vs 7 hours). Results were referring to dose-response curves: optimal IFN α 1 dose was 3 ng/mL, whereas the optimal IFN γ dose was 30 ng/mL. Both doses were similar to what could be released physiologically in the human body after bacterial or viral infections.¹⁵

In addition, mCD169 and nCD64 expressions, following stimulation by these optimum IFN doses, were compared to biomarker natural expressions in healthy and viral- or bacterial-infected subjects (Figure 4). The main result was that IFN α 1 and IFN γ , at their optimal doses, induced expression of CD169 on monocytes and of CD64 on neutrophils, respectively, at levels similar to what happens physiologically during the course of natural viral or bacterial infections. CD64 on monocytes (mCD64) was also moderately increased upon IFN γ stimulation, as observed in bacterial-infected subjects; however, mCD64 has been demonstrated in many studies to be less accurate than nCD64.¹⁶ This study thus focused only on nCD64.

The plots also showed that keeping the whole blood of a healthy volunteer in a water bath at 37°C for 15 hours did not induce a nonspecific activation of either biomarker on any cell subsets, except a slight increase of mCD169.

Finally, this long ex vivo incubation induced some cell death that might interfere with the results. However, Figure S1 demonstrated that apoptotic or dead cells account for less than 5% of the total sample, and including them or not in the analysis did not change the biomarker levels.

3.2 | CD169 expression is induced by IFN type I and CD64 expression is induced by IFN type II

Based on the previously determined doses, a larger spectrum of each IFN family was tested: IFN α 1 belongs to the IFN I family which includes 13 subtypes of IFN α (only 1-12 were tested), plus IFN β and IFN ω , whereas IFN γ is the unique IFN II (Figure 5). The longer

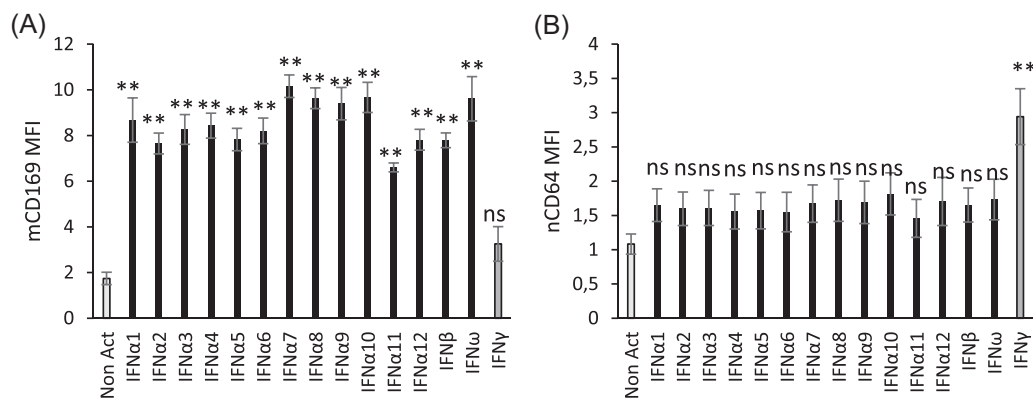


FIGURE 5 CD169 and CD64 expression after interferon (IFN) stimulation. Whole blood of four donors was coincubated for 15 hours at 37°C with either no IFN (Non Act), or type I IFNs (IFN α 1, IFN α 2, IFN α 3, IFN α 4, IFN α 5, IFN α 6, IFN α 7, IFN α 8, IFN α 9, IFN α 10, IFN α 11, IFN α 12, IFN β , and IFN ω) or type II IFN (IFN γ). Extracellular staining of the activated blood was performed with the CD64-CD169/infections antibody mixture. Results are expressed as averages \pm standard deviations of the median of fluorescence intensities (MFI) of CD169 on monocytes (mCD169) (Figure 4A) and of CD64 on neutrophils (nCD64) (Figure 4B). Comparison was made using a Dunnett's control test, with the Non Act condition used as control (in white), and P value was considered either not statistically significant above .05 (in gray; NS) or statistically significant under .05 (in black; *) or under .01 (in black; **). NS, not significant

incubation time was kept (15 vs 7 hours). Detailed values are given in Table S2.

Interestingly, mCD169 expression was again significantly increased in whole blood activated by IFN α 1 (8.7 ± 1.9 , $P < .0001$; $n = 4$), in comparison to a non-activated whole blood (1.7 ± 0.5), but also by all IFN α subtypes (IFN α 2 = 7.7 ± 0.9 , $P < .0001$; IFN α 3 = 8.3 ± 1.3 , $P < .0001$; IFN α 4 = 8.4 ± 1.1 , $P < .0001$; IFN α 5 = 7.8 ± 1.0 , $P < .0001$; IFN α 6 = 8.2 ± 1.1 , $P < .0001$; IFN α 7 = 10.2 ± 1.0 , $P < .0001$; IFN α 8 = 9.6 ± 0.9 , $P < .0001$; IFN α 9 = 9.4 ± 1.4 ; $P < .0001$; IFN α 10 = 9.7 ± 1.3 , $P < .0001$; IFN α 11 = 6.6 ± 0.4 , $P = .0005$; IFN α 12 = 7.8 ± 0.9 , $P = .0042$) and by others in the IFN I family (IFN β = 7.8 ± 0.6 , $P < .0001$; IFN ω = 9.6 ± 1.9 , $P < .0001$). mCD169 expression, however, remained low when incubated with IFN II (3.3 ± 1.5 , $P = .1979$).

Conversely, nCD64 expression was again significantly increased in whole blood activated by IFN γ (2.9 ± 0.8 , $P = .0008$; $n = 4$), in comparison to nonactivated whole blood (1.1 ± 0.3), but not when incubated with the IFN I family (IFN α 1 = 1.7 ± 0.5 , $P = .8185$; IFN α 2 = 1.6 ± 0.5 , $P = .8897$; IFN α 3 = 1.6 ± 0.5 , $P = .8743$; IFN α 4 = 1.6 ± 0.5 , $P = .9318$; IFN α 5 = 1.6 ± 0.5 , $P = .9199$; IFN α 6 = 1.6 ± 0.6 , $P = .9384$; IFN α 7 = 1.7 ± 0.5 , $P = .7835$; IFN α 8 = 1.7 ± 0.6 , $P = .6995$; IFN α 9 = 1.7 ± 0.6 , $P = .7549$; IFN α 10 = 1.8 ± 0.6 , $P = .5375$; IFN α 11 = 1.5 ± 0.6 , $P = .9882$; IFN α 12 = 1.7 ± 0.7 , $P = 1.0000$; IFN β = 1.7 ± 0.5 , $P = .8147$; IFN ω = 1.7 ± 0.6 , $P = .6821$).

These results indicated that all IFN I had a direct influence on the expression of CD169 on monocytes and that IFN II was involved in CD64 expression on neutrophils.

3.3 | CD169 and CD64 biomarkers have rapid expression kinetics after IFN stimuli

In the second part of the study, precise kinetics of both biomarkers were studied. In preparation for the study, the hypothesis that the response amplitude might depend on the blood volume incubated was tested (Figure S2). After comparing several IFN-activated blood volumes, results showed that these long-term activations by IFN should be done in a whole blood volume of at least 300 μ L, otherwise the mean measured level could be lowered. This could be explained by the fact that a smaller volume of blood, placed in 5 mL closed test tubes for incubation with IFNs, is unable to equilibrate CO₂ and/or humidity with the larger volume of air (4 to 5 mL), which changes the cellular environment too much (pH and/or osmolality) for a proper activation of these markers. Having this new information, CD64 and CD169 biomarker kinetics were established by activating an amount of blood from 300 to 500 μ L with IFN (Figure 6). Detailed values are given in Table S3.

As previously found, mCD169 was specifically induced on monocyte surfaces after IFN I stimulation ($P < .0001$) but not after IFN II ($P = .1706$) or no activation ($P = .1299$). When statistically comparing incubation time, results showed that expression of mCD169 was significantly increased by IFN I after 8 hours of incubation (8 hours: 2.9 ± 0.3 ; 10 hours: 3.8 ± 0.3 ; 12 hours: 4.98 ± 0.2 ; all $P < .001$; $n = 4$) in comparison to 2 hours (1.5 ± 0.1), 4 hours (1.5 ± 0.2), or 6 hours (1.9 ± 0.1).

In the same way, nCD64 was induced on the neutrophil surface after IFN II stimulation ($P < .0001$) but not after IFN I ($P = .2456$) or no activation ($P = .3776$). When statistically comparing incubation time, results showed that expression of nCD64 was significantly increased by IFN II after 6 hours of incubation (6 hours: 1.3 ± 0.1 ; 8 hours: 1.8 ± 0.1 ; 10 hours: 2.3 ± 0.1 ; 12 hours:

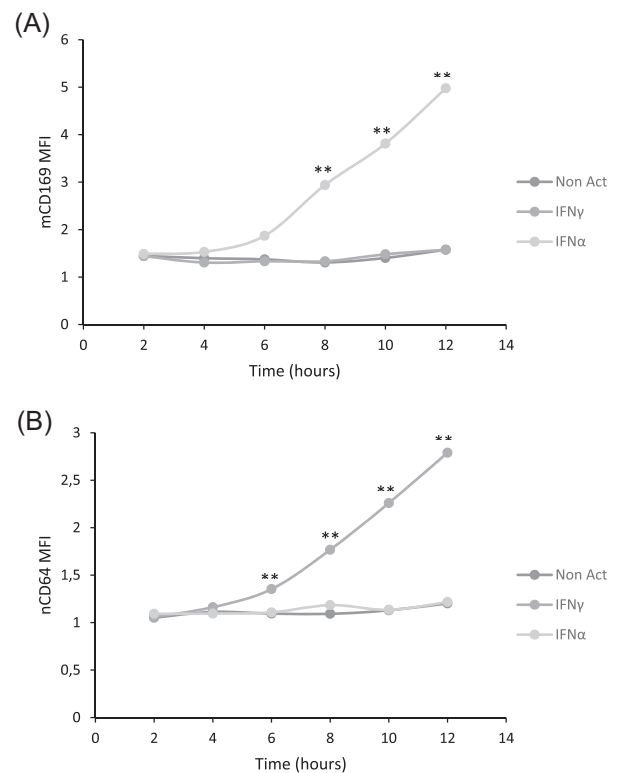


FIGURE 6 CD169 and CD64 kinetics after interferon (IFN) stimulation. Whole blood of four donors was coincubated for 2 to 12 hours at 37°C with either no IFN (Non Act; in the dark gray), or one type II IFN (IFN γ ; in medium gray) or one type I IFN (IFN α 1; in light gray). Extracellular staining of the activated blood was performed with the CD64-CD169/infections antibody mixture. Results were expressed as averages of the median of fluorescence intensities (MFI) of CD169 on monocytes (mCD169) (Figure 5A) and of CD64 on neutrophils (nCD64) (Figure 5B). The comparison was made using an analysis of variance test, for which P value was considered statistically significant under .05. When P value was under .05, a comparison was made using a paired Tukey test, for which P value was also considered statistically significant under .05 (*) or under .01 (**)

2.8 ± 0.1 ; all $P < .001$; $n = 4$) in comparison to 2 hours (1.1 ± 0.1) or 4 hours (1.2 ± 0.1).

Biomarker expression was observed as early as 6 hours, which did not exclude that their expression might be indirectly associated to IFN stimuli through various signaling cascades.

3.4 | CD169 and CD64 biomarkers have direct expression kinetics after IFN stimuli

It has been described that many cytokines are released within 2 to 4 hours poststimulation.¹⁷ The IFNs were thus

evaluated to understand if they directly or indirectly activate the expression of CD64 and CD169 (Figure 7). Detailed values are given in Table S4, and results are supported by flow cytometry plots presented in Figure 8.

The hypothesis was tested by using Brefeldin A, a Golgi apparatus blocker that acts by blocking exocytosis of molecules, preventing both the secretion of soluble proteins (such as cytokines) and also the surface expression of de novo synthesized proteins (such as CD64 and CD169). If IFNs directly activate the cells to produce the biomarkers, then Brefeldin A would prevent their expression at the surface, and they would remain intracellular. However, if IFNs activate intermediary

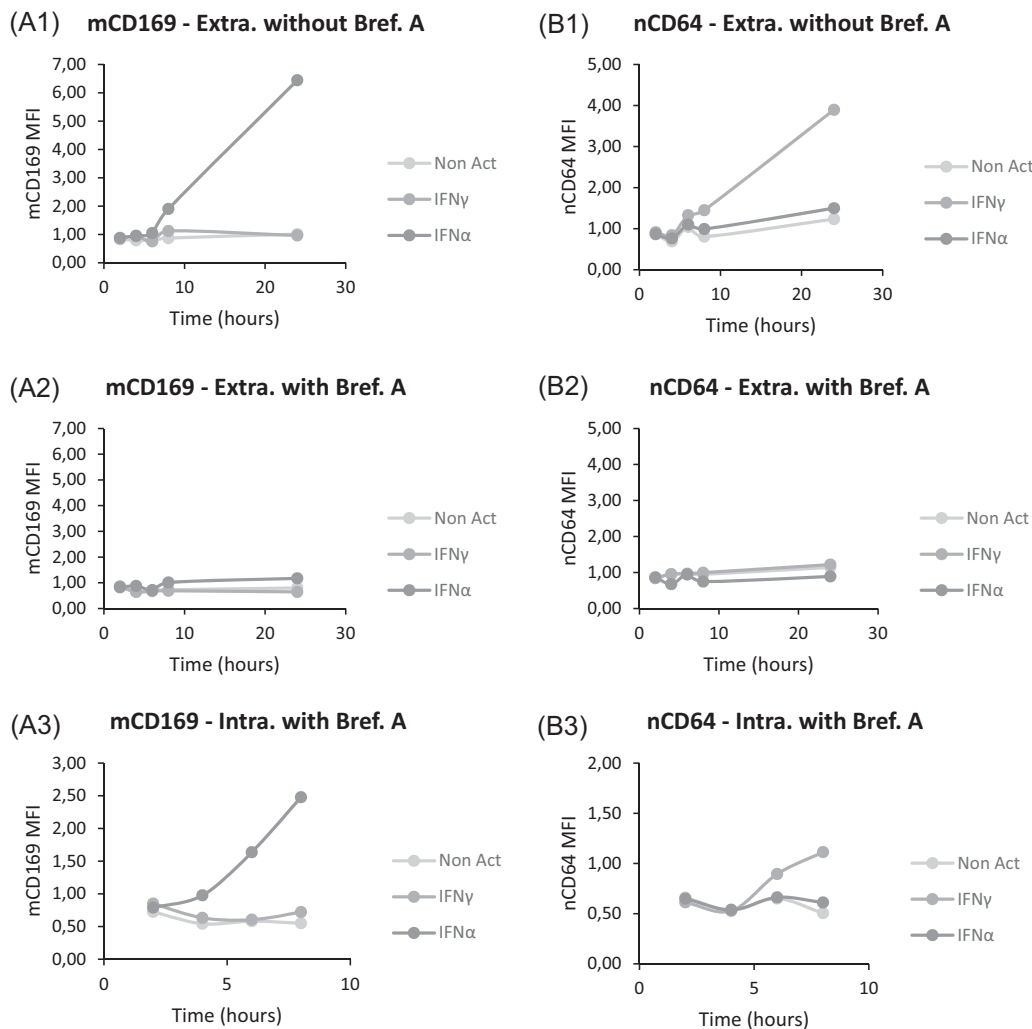


FIGURE 7 Direct or indirect CD169 and CD64 kinetics after interferon (IFN) stimulation. Whole blood of eight donors was coincubated for 2 to 24 hours at 37°C with either no IFN (Non Act; in light gray), or one type II IFN (IFN γ ; in medium gray) or one type I IFN (IFN α 1; in the dark gray). On the one hand, biomarker extracellular expressions (Extra.) were assessed in activated whole blood without Brefeldin A (Bref. A), a Golgi apparatus blocker, (A1 and B1) or with Brefeldin A (A2 and B2). On the other hand, intracellular expressions (Intra.) were evaluated with Brefeldin A only (A3 and B3). All stainings were performed with the CD64-CD169/infections antibody mixture. Results were expressed as averages of the median of fluorescence intensities (MFI) of CD169 on monocytes (mCD169) (Figure 6A) and of CD64 on neutrophils (nCD64) (Figure 6B). The comparison was made using an analysis of variance test, for which P value is considered statistically significant under .05

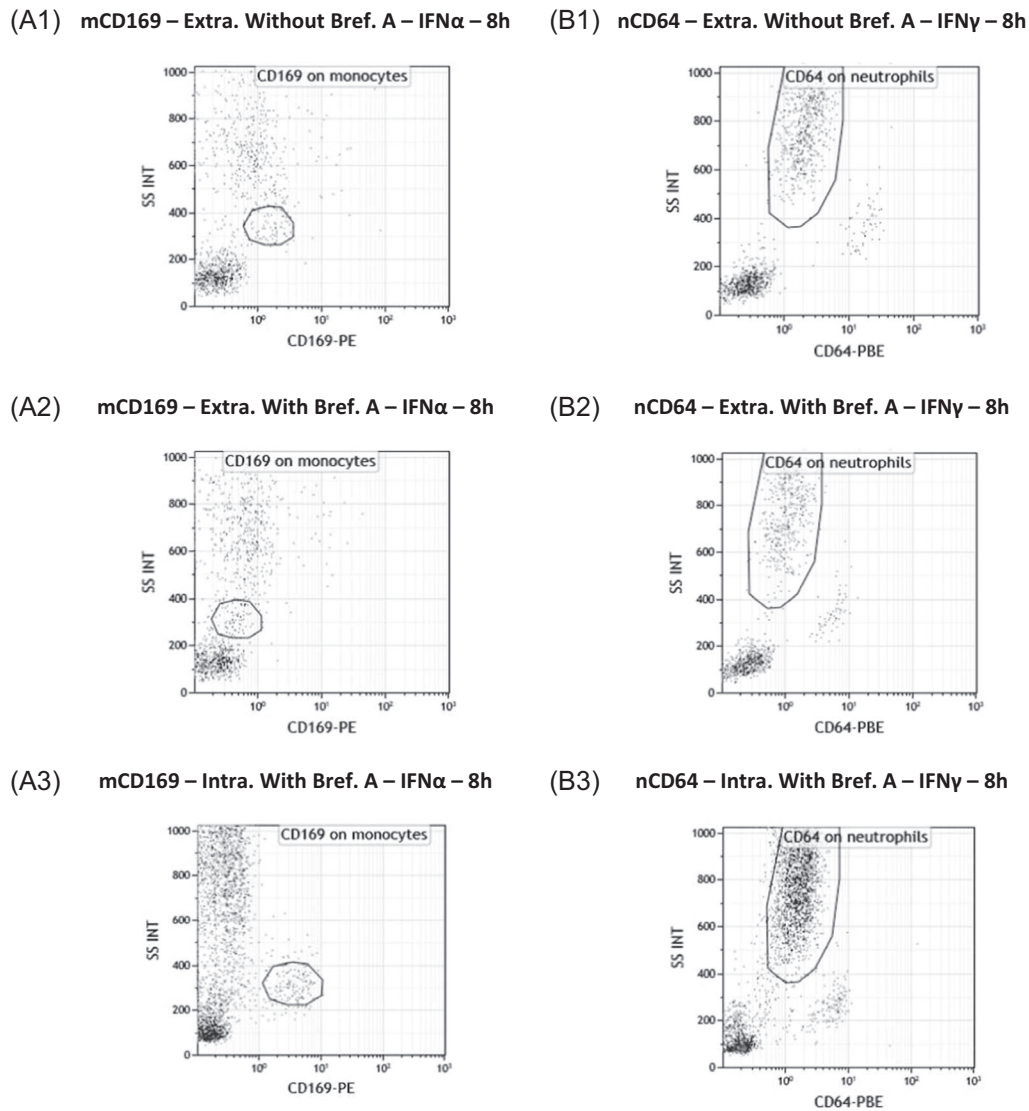


FIGURE 8 Flow cytometry extracellular or intracellular expressions of CD169 and CD64. Flow cytometry example of whole blood of one donor that was coincubated for 8 hours at 37°C with either one type I interferon (IFN α 1) (Figure 7A) or one type II IFN (IFN γ) (Figure 7B). CD169 and CD64 were respectively presented on monocytes (mCD169) (Figure 7A) and neutrophils (nCD64) (Figure 7B). On the one hand, biomarker extracellular expressions (Extra.) were showed in activated whole blood without Brefeldin A (Bref. A) (A1 and B1) or with Brefeldin A (A2 and B2). On the other hand, intracellular expressions (Intra.) were showed with Brefeldin A only (A3 and B3)

actors that produce intermediary molecules that would finally stimulate the cells to express the biomarkers, then Brefeldin A would cause intracellular retention of the first intermediary molecules, and there would be no activation of the final cell to either intracellularly produce or extracellularly express the biomarkers.

When quantifying the extracellular expression of mCD169 and nCD64 without Brefeldin A (Figure 7A1,B1), results showed significant increases after IFN I ($P < .0001$) or IFN II ($P = .0002$) stimulations, respectively. On flow cytometry plots (Figure 8A1,B1), CD169 and CD64 extracellular expressions were also increased.

If Brefeldin A was added (Figure 7A2,B2), blocking of surface expression occurred as expected, as no significant changes in the expressions were observed (mCD169; $P = .3478$; nCD64; $P = .8226$; $n = 8$). On flow cytometry plots (Figure 8A2,B2), when Brefeldin A was added, there was no CD169 and CD64 extracellular expressions.

However, when Brefeldin A was added and the intracellular expression of both biomarkers was assessed (Figure 7A3,B3), significant intracellular increases were observed of mCD169 after IFN I stimulation ($P = .0010$; $n = 8$) and of nCD64 after IFN II stimulation ($P = .0149$;

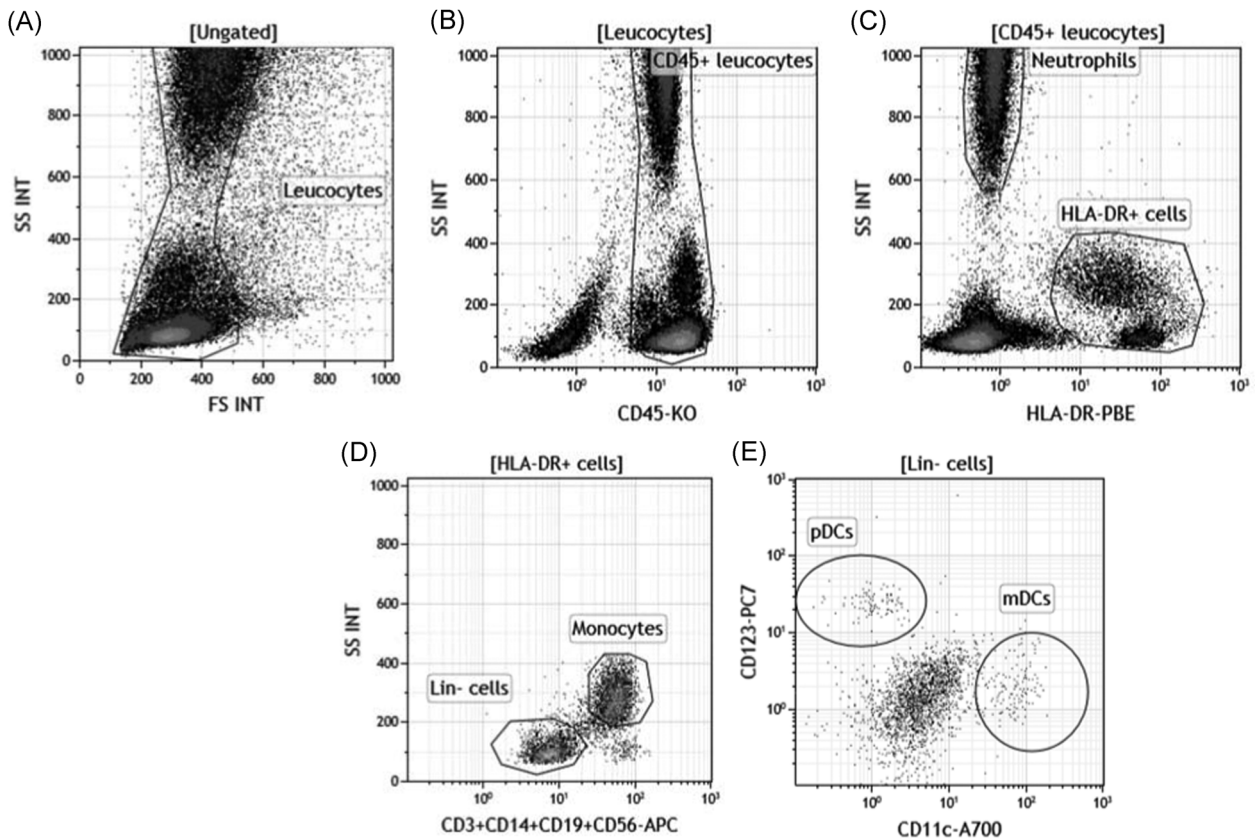


FIGURE 9 Monocytes, neutrophils, myeloid dendritic cells (mDCs) and plasmacytoid (pDCs) isolation by flow cytometry. A, First, leukocytes were isolated from red blood cells or debris or apoptotic cells based on their typical side (SS INT) and forward scatter (FS INT). B, Leukocytes CD45+ were gated out of them on their positive CD45 expression. C, Using the HLA-DR expression on this population, negative neutrophils were separated from positive HLA-DR cells, including B lymphocytes, monocytes, and DCs. D, Gated out from this last population, the lineage composed of CD3, CD14, CD19, and CD56 made the distinction between the positive monocytes and the lineage negative (lin-) cells, including DCs. E, DCs were finally divided in both cellular subtypes: CD11c+CD123- mDCs or CD11c-CD123+ plasmacytoid DCs (pDCs)

$n = 8$). Flow cytometry plots (Figure 8A3,B3) showed that both biomarkers were expressed.

These results confirmed that rapid kinetics of biomarker expressions were observed because of direct activation of the monocytes or neutrophils by the IFNs.

3.5 | IFNs type I and 2 play specific and independent roles in CD169 and CD64 expression

The third part of the study was to decipher the cellular actors involved in the expression of both CD169 and CD64 biomarkers and which pathways they activate. Four cellular actors of the innate immune system were considered to have potential implications in these activations: monocytes, neutrophils, and both special myeloid (mDCs) and plasmacytoid (pDCs) subtypes of DCs (Figure 9).

Intracellular expressions of both phosphorylated STAT1 and STAT2 were assessed in the four cellular

types to study actors and pathways involved when whole blood was coincubated with IFNs (Figure 10). Detailed values are given in Table S5, and results are supported by flow cytometry plots presented in Figure 11.

In comparison to nonactivated whole blood, pSTAT1 and pSTAT2 expressions were significantly increased in monocytes (pSTAT1: $P = .0027$; pSTAT2: $P = .0032$; $n = 3$), neutrophils (pSTAT1: $P = .0002$; pSTAT2: $P = .0441$; $n = 3$), mDCs (pSTAT1: $P = .0337$; pSTAT2: $P = .0435$; $n = 3$) and pDCs (pSTAT1: $P = .0406$; pSTAT2: $P = .0016$; $n = 3$) when blood was incubated with IFN α .

Conversely, only pSTAT1 expression was significantly increased in monocytes ($P = .0030$; $n = 3$), neutrophils ($P < .0001$; $n = 3$) and mDCs ($P = .0297$; $n = 3$) when blood was incubated with IFN γ .

These results confirm that IFN α triggered a double activation of pSTAT1 and pSTAT2 resulting in CD169 expression on monocytes, whereas IFN γ triggered a unique pSTAT1 activation resulting in CD64 expression on neutrophils.

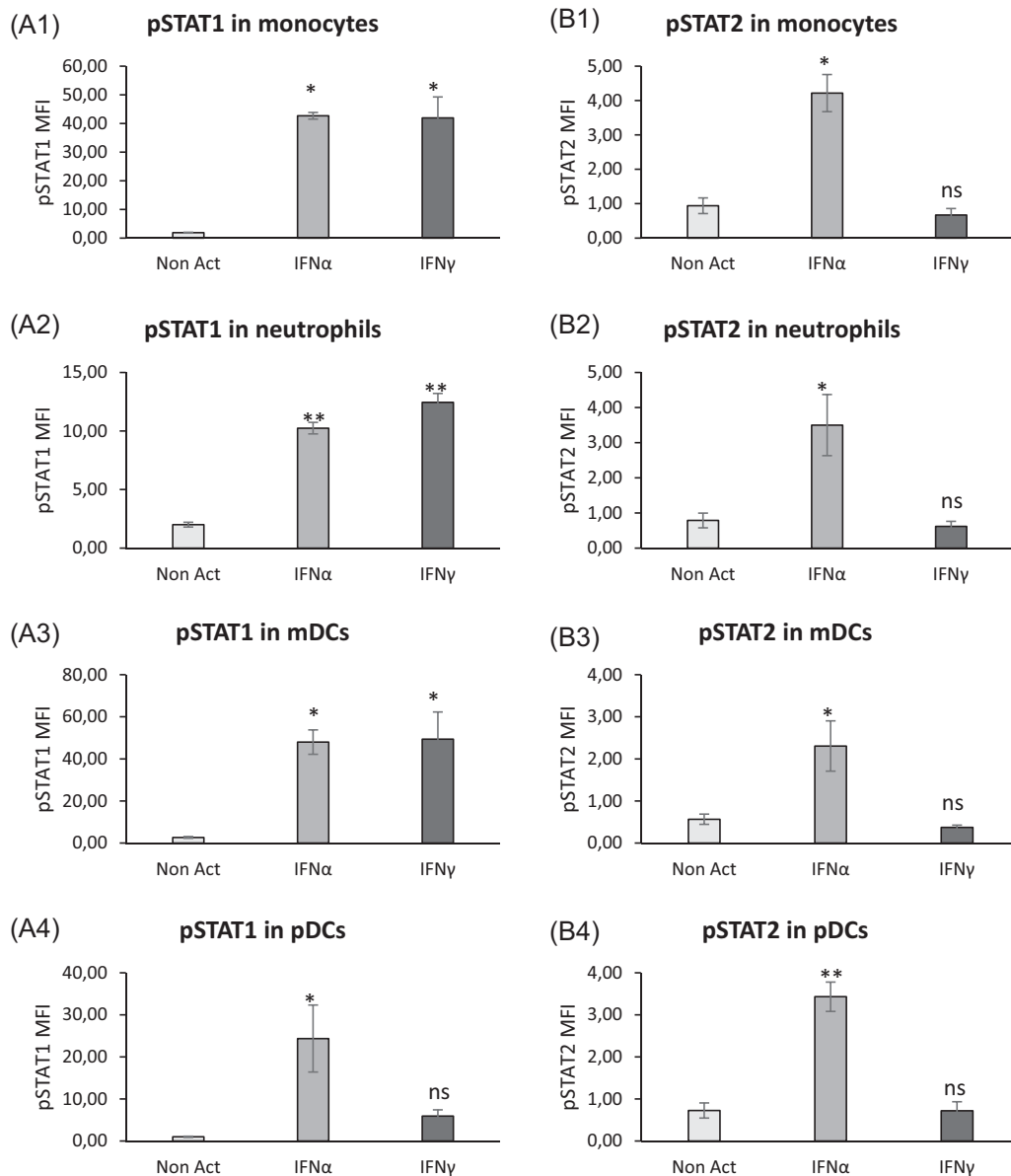


FIGURE 10 Cellular actors and activation pathways after interferon (IFN) stimulation. Whole blood of three donors was coincubated for 15 minutes at 37°C with either no IFN (Non Act; in white), or one type I IFN (IFN α 1; in light gray) or one type II IFN (IFN γ ; in the dark gray). Phosphoepitope staining of the activated blood was performed with the dendritic cells (DCs) antibody mixture. Results were expressed as averages of median of fluorescence intensities (MFI) of phosphorylated STAT1 (pSTAT1) (A1-A4) and of pSTAT2 (B1-B4) on monocytes (Figure 9A1,B1), neutrophils (Figure 9A2,B2), myeloid DCs (mDCs) (Figure 9A3,B3) and plasmacytoid DCs (pDCs) (Figure 9A4,B4). The comparison was made using a paired Tukey test, for which P value was considered either not statistically significant above .05 (NS) or statistically significant under .05 (*) or under .01 (**). NS, not significant

Finally, the independence of both activation pathways was further deciphered by studying the effects of combined IFNs on biomarker expressions (Figure 12). Detailed values are given in Table S6.

When IFN α and IFN γ were concomitantly activating the blood, it seemed that IFN γ inhibited the IFN α -induced mCD169 level because a slight (but nonsignificant) decrease was observed with the IFN α + IFN γ combination (3.4 ± 0.9 ; $P = .1154$; $n = 6$) in comparison to IFN α alone (4.4 ± 1.2).

Conversely, it seemed that IFN α inhibited the IFN γ -induced nCD64 level because a slight (but nonsignificant) decrease was observed with the IFN α + IFN γ combination (1.5 ± 0.6 ; $P = .1355$; $n = 6$) in comparison to IFN γ alone (2.4 ± 1.1).

These preliminary results indicated that the expression of both biomarkers relies on specific and independent activation pathways, depending on the IFN produced and the cell type.

4 | DISCUSSION

The clinical distinction between viral and bacterial infections is an important issue for practitioners,¹⁸ as discrimination is often hard to establish based on clinical signs or currently measured biomarkers. Unfortunately, biomarkers are not currently combined into an application that is sensitive and specific enough for routine diagnosis. Therefore, when in doubt, antibiotic treatments are frequently prescribed, contributing to the dangerous rise of antibiotic resistance.¹⁹ The purpose of the study was to decipher pathways of two cell surface receptors described in infections, CD64 expressed on neutrophils and CD169 expressed on monocytes, and further establish their link with IFN, the main actor in antiviral or antibacterial responses.

CD64 plays a key role in bacterial phagocytosis, clearance of immune complexes, antigen presentation, and

cytokine release.²⁰ Increased neutrophil CD64 expression has been proposed as a biomarker of bacterial infection with superior performance^{6,21–25} and even more strongly with sepsis diagnosis or acute infections.^{26–28} Conversely, CD169 is an endocytic receptor that recognizes sialylated molecules exposed on virus membrane gangliosides, binds to them to capture and internalize the virus, and either participates in its clearance or enhances its transmission and infectivity.^{11,29} CD169 is mostly described as a resident macrophage marker and is not expressed in blood under healthy homeostasis. Only a few reports have pointed out its expression on monocytes upon diverse pathogenic processes, including rhinovirus infection, porcine reproductive, and respiratory syndrome virus infection and in certain inflammatory diseases such as multiple sclerosis, atherosclerosis, rheumatoid arthritis, and systemic lupus erythematosus, all being known to involve IFN I production, and in patients with viral infections such as Epstein-Barr

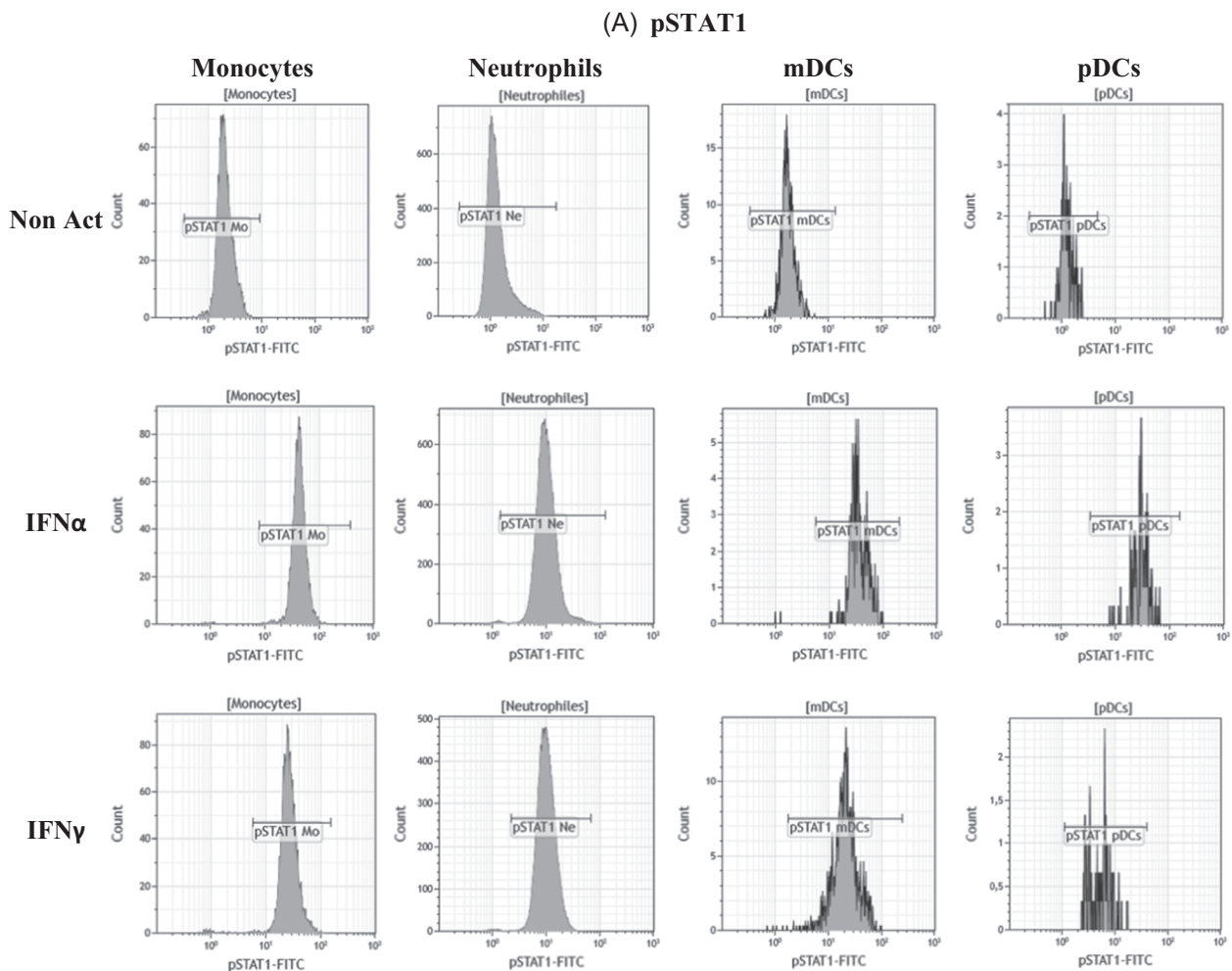


FIGURE 11 Flow cytometry expressions of phospho-epitopes. The whole blood of one donor was coincubated for 15 minutes at 37°C with either no interferon (IFN) (Non Act), or one type I IFN (IFN α 1) or one type II IFN (IFN γ). Phosphoepitope staining of the activated blood was performed with the dendritic cells (DCs) antibody mixture. Results were presented as histograms of phosphorylated STAT1 (pSTAT1) (Figure 10A) and of pSTAT2 (Figure 10B) on monocytes (Mo), neutrophils (Ne), myeloid DCs (mDCs), and plasmacytoid DCs (pDCs)

(B) pSTAT2

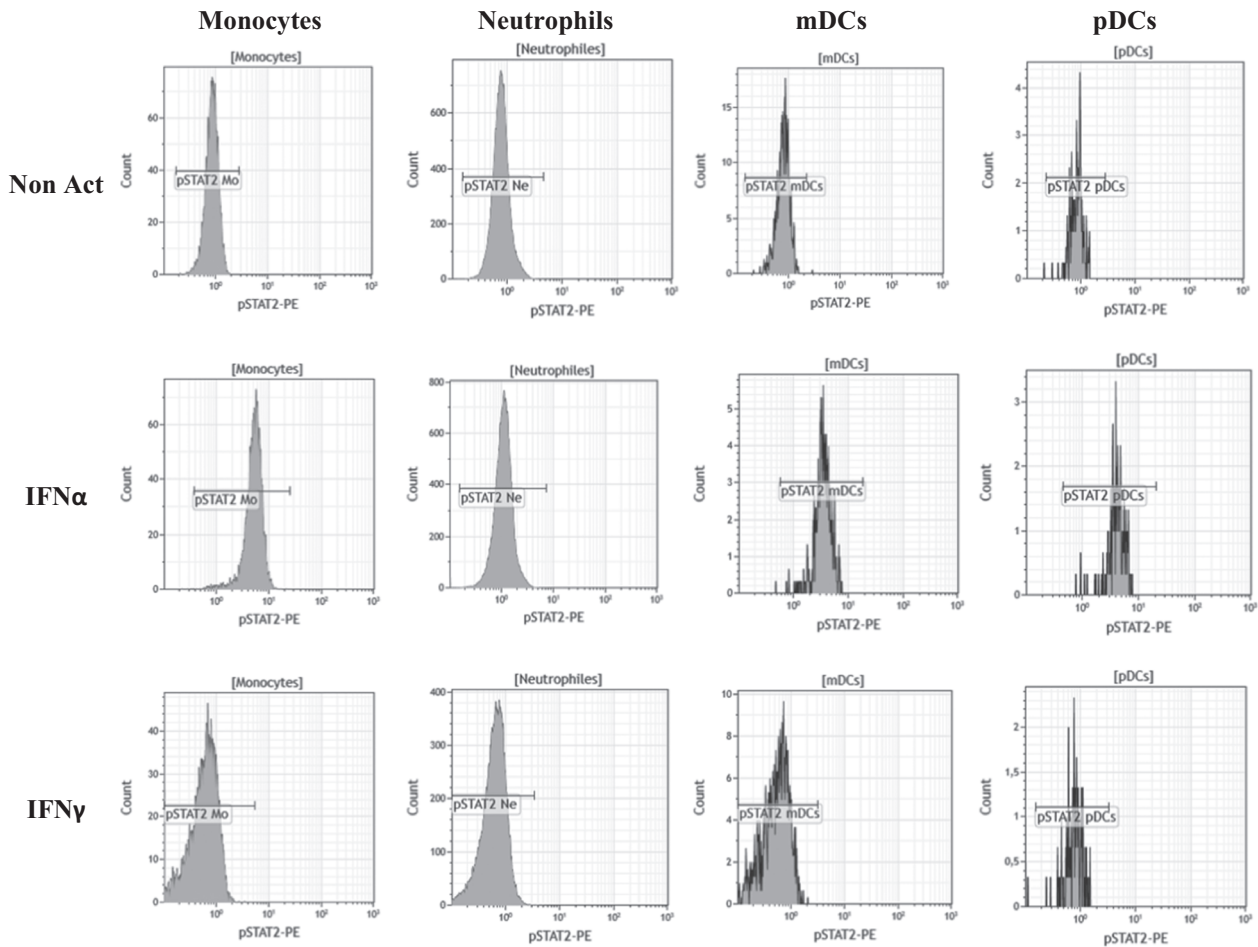


FIGURE 11 (Continued)

virus-associated enteritis and human immunodeficiency virus (HIV) infection. Moreover, upregulated expression of CD169 in monocytes in HIV-1-infected patients is associated with high viral loads.^{12,29–31}

The rationale for the study was that immune system status is a reliable indicator of what happens at a cellular level for the recognition, elimination, and defense from what is foreign.¹ On one hand, anatomical barriers, such

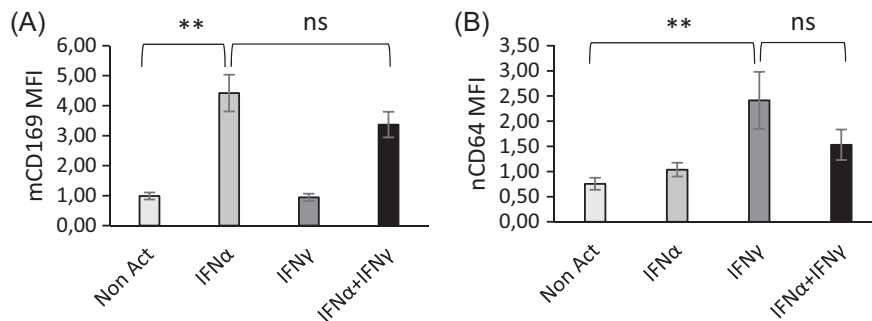


FIGURE 12 Combined effects of interferons (IFNs) on CD169 and CD64 expressions. Whole blood of six donors was coincubated for 18 hours at 37°C with either no IFN (Non Act; in white), or one type I IFN (IFN α 1; in light gray) or one type II IFN (IFN γ ; in the dark gray) or a combination of both IFNs (IFN α 1 + IFN γ ; in black). Extracellular staining of the activated blood was performed with the CD64-CD169/infections antibody mixture. Results were expressed as averages \pm standard deviations of the median of fluorescence intensities (MFI) of CD169 on monocytes (mCD169) (Figure 11A) and of CD64 on neutrophils (nCD64) (Figure 11B). The comparison was made using a paired Tukey test, for which *P* value was considered either not statistically significant above .05 (NS) or statistically significant under .05 (*) or under .01 (**). NS, not significant

as skin, mucous membranes, gastric acidity or any epithelium, are interesting because they represent the first defense against infectious agents. On the other hand, when a microorganism crosses one of these barriers, the cellular response induced by the innate immune system involves powerful actors, among them IFN, which is identified as acting primarily against pathogens. It was thus interesting to explore the functional link between IFN and both biomarkers.

In addition to IFN, several classes of activators were tested. However, only IFN was demonstrated to significantly induce direct mCD169 and nCD64 expressions after 7 hours of incubation. Particularly it was demonstrated that CD169 was increased on monocytes after IFN I stimulation, and CD64 was increased on neutrophils after IFN II stimulation. IFNs are described as three distinct classes (type I, II, and III).³² All act through the same mechanisms of action by the activation of IFN-stimulated genes and microRNAs but are distinguished by their differing receptors, structural features, and biological activities according to the kind of infection that occurs in the human body.

IFN type I is principally described in viral infections to have immunomodulatory, antiproliferative, and antiviral functions after being secreted by almost all cell types.⁴ Some teams³³ have further demonstrated that, among IFN I, some subtypes could be more or less effective, but no differences were observed in the present study. IFN type II is found in bacterial infections. Initially, only CD4+ T-helper cells, CD8+ cytotoxic lymphocytes, and natural killer cells were believed to exclusively produce IFN γ , but there is now evidence that other cells, such as B cells, natural killer T cells, and professional antigen-presenting cells also secrete IFN γ .³⁴

The role of IFN III was not investigated in this study as it has not been correlated to biomarker expression. Type III IFN are a family of three proteins named IFN λ 1, λ 2, and λ 3. These proteins were previously known as IL-29, IL-28A, and IL-28B, respectively.³² The IFN λ 3 gene is transcribed in the opposite direction of the IFN λ 1 and IFN λ 2 genes, but all act like IFN I by activating the Janus kinase (JAK)/STAT pathway. As it also stimulates, in turn, the phosphorylation of STAT1 and STAT2, a hypothesis needs to be investigated about the potential role of IFN III in mCD169 expression.

All other potential activators evaluated had no significant direct impact on either biomarker expression. However, the stimulation of whole blood by bacterial components such as LPS is normally known to induce CD64 expression on the surface of neutrophils.^{6,8} Also, certain toll-like receptor ligands, such as Poly IC, are described to induce CD169 expression on the surface of monocytes.³⁵ And finally,

ILs are sometimes related to IFN production.³ Later time points did show some of these expected effects, but this could be explained by multiple indirect pathways, and deserves further investigation.

Precise kinetics were established. Results obtained strongly correlated with the literature. Indeed, it is demonstrated that nCD64 upregulation is elevated to three times the normal level after IFN γ stimulation and occurs within a short time scale of 6 hours for cell surface expression.⁸ Also, detectable messenger RNA (mRNA) increases by northern blot analysis in 1 to 3 hours.²⁴ In parallel, CD169 protein expression, and also mRNA, is demonstrated to be significantly increased after viral infection *in vivo*.³⁰ To our knowledge, this is the first time its expression was demonstrated to be directly induced by IFN. This was expected, as monocytes and neutrophils are known to have IFN receptors on their surfaces that in turn activate the JAK/STAT pathways. IFN I and IFN II seem to have cross-inhibitory effects on each other regarding the induction of CD169 or CD64, respectively, reflecting the immune system orientation in response to a virus or bacteria.

Finally, the assessment of the biomarkers was made according to a newly described procedure of flow cytometry.¹⁴ Indeed, one of the prerequisites was that the biomarkers chosen could be easily quantified when further applied in a clinical context. That was a major issue with IFN, as titration relies on complex techniques with often biased or difficult measurements.⁴ As immediate downstream events, CD64 and CD169 expression are supposed to parallel the levels of IFNs, with the advantage of being easily measured in whole blood, with a one-step sample preparation procedure, and levels assessed in 15 minutes, all advantages for practitioners. It could even be further applied at the patient's bedside.

Of course, the study has some limitations. First, activators have all been titrated in preparation of the study to maximize their effects, and have doses close to what happens physiologically. Furthermore, several whole blood volumes have been tested to best mimic what happens *in vivo* when activators are put in contact with host cells. Despite this, a cellular environment is hardly reproducible because of the large spectrum of interactions that could exist or the diversity of factors impacting on pathways, even more in the case of such complex pathologies like infections. Moreover, pathogens involved *in vivo* could sometimes deflect the cellular machinery leading to a different or inexistent host response with IFNs. Finally, CD169 and CD64 levels have only been quantified by flow cytometry, whereas it would have been interesting to measure it with other techniques, knowing for instance that the biomarkers mRNA levels also

correlate with IFN activation. These results should be investigated further.

5 | CONCLUSION

The goal of the study was to try to understand the kinetics of CD169 expression on monocytes and CD64 expression on neutrophils during the course of a viral and bacterial infection, as they have not been well studied to date. The functional link between markers and IFN were explored to help identify the potential relevance of using them in a clinical context. In response to a bacterial infection, IFN γ directly induces, in 6 hours, nCD64 expression via pSTAT1, whereas in the case of a viral infection, IFN α directly induces, in 8 hours, mCD169 expression via pSTAT1 and pSTAT2. Both biomarkers were further demonstrated to be independently activated by IFN, preventing false results from interactions, and to be rapidly expressed, due to direct and easily detectable pathways established in response by the host in the first hours of the infection.

ACKNOWLEDGMENTS

Pénélope Bourgoin and Inès Ait Belkacem are recipients of CIFRE PhD grants from the ANRT (National Agency for Research and Technology). This study was supported by Beckman Coulter through donations of laboratory supplies and participation of the four employees mentioned, as part of an internal research initiative. The authors would like to thank the technician team of the Saint Joseph Hospital laboratory for their assistance in blood sampling.

CONFLICT OF INTERESTS

Pénélope Bourgoin, Géraldine Biéché, Inès Ait Belkacem, and Fabrice Malergue are Beckman Coulter employees. Beckman Coulter and the Beckman Coulter product and service marks mentioned herein are trademarks or registered trademarks of Beckman Coulter, Inc, in the United States and other countries. All other trademarks are the property of their respective owners.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The authors certify that this manuscript reports original clinical research data. Individual data that underlie the results reported in this article are available from the corresponding author following publication, including the study report and study protocol. Additional data are available upon reasonable request.

ORCID

Pénélope Bourgoin  <http://orcid.org/0000-0002-9970-2680>

REFERENCES

- Murphy K, Weaver C. *Janeway's Immunobiology*. 9th ed. New York NY: Garland Science/Taylor & Francis Group, LLC; 2017.
- Thompson MR, Kaminski JJ, Kurt-Jones EA, Fitzgerald KA. Pattern recognition receptors and the innate immune response to viral infection. *Viruses*. 2011;3(6):920-940.
- Luis Muñoz-Carrillo J, Francisco Contreras-Cordero J, Gutiérrez-Coronado O, Trinidad Villalobos-Gutiérrez P, Guillermo Ramos-Gracia L, Elizabeth Hernández-Reyes V. Cytokine profiling plays a crucial role in activating immune system to clear infectious pathogens. In: Tyagi R K, Bisen P S, eds. *Immune Response Activation and Immunomodulation*. Mexico: IntechOpen; 2019:1-30.
- Engelmann I, Dubos F, Lobert P-E, et al. Diagnosis of viral infections using myxovirus resistance protein A (MxA). *Pediatrics*. 2015;135(4):e985-e993.
- Kipfmüller F, Schneider J, Prusseit J, et al. Role of neutrophil CD64 index as a screening marker for late-onset sepsis in very low birth weight infants. *PLOS One*. 2015;10(4):1-15.
- Mokuda S, Doi O, Takasugi K. Simultaneous quantitative analysis of the expression of CD64 and CD35 on neutrophils as markers to differentiate between bacterial and viral infections in patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol*. 2012;22(5):750-757.
- Nuutila J. The novel applications of the quantitative analysis of neutrophil cell surface Fc γ RI (CD64) to the diagnosis of infectious and inflammatory diseases. *Curr Opin Infect Dis*. 2010; 23(3):268-274.
- Tang Z, Qin D, Tao M, et al. Examining the utility of the CD64 index compared with other conventional indices for early diagnosis of neonatal infection. *Sci Rep*. 2018;8(1):1-7.
- Klaas M, Crocker PR. Sialoadhesin in recognition of self and non-self. *Semin Immunopathol*. 2012;34(3):353-364.
- Puryear WB, Akiyama H, Geer SD, et al. Interferon-inducible mechanism of dendritic cell-mediated HIV-1 dissemination is dependent on Siglec-1/CD169. *PLOS Pathog*. 2013;9(4):1-15.
- Pino M, Erkizia I, Benet S, et al. HIV-1 immune activation induces Siglec-1 expression and enhances viral trans-infection in blood and tissue myeloid cells. *Retrovirology*. 2015;12(1):1-15.
- Rempel H, Calosing C, Sun B, Pulliam L. Sialoadhesin expressed on IFN-induced monocytes binds HIV-1 and enhances infectivity. *PLOS One*. 2008;3(4):1-9.
- Bourgoin P, Soliveres T, Ahriz D, et al. Clinical research assessment by flow cytometry of biomarkers for infectious stratification in an Emergency Department. *Biomark Med*. 2019;13:1373-1386.
- Bourgoin P, Hayman J, Rimmelé T, Venet F, Malergue F, Monneret G. A novel one-step extracellular staining for flow cytometry: proof-of-concept on sepsis-related biomarkers. *J Immunol Methods*. 2019;470:59-63.
- Liu J, Gao L, Zang D. Elevated levels of IFN- γ in CSF and serum of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *PLOS One*. 2015;10(9). e0136937.
- Groselj-Grenc M, Ihan A, Derganc M. Neutrophil and monocyte CD64 and CD163 expression in critically ill neonates and children with sepsis: comparison of fluorescence intensities and calculated indexes. *Mediators Inflamm*. 2008;2008:1-10.
- Letessier W, Demaret J, Gossez M, et al. Decreased intralymphocyte cytokines measurement in septic shock patients: a proof of concept study in whole blood. *Cytokine*. 2018;104:78-84.

18. Liang SY, Theodoro DL, Schuur JD, Marschall J. Infection prevention in the Emergency Department. *Ann Emerg Med*. 2014;64(3):299-313.
19. Ventola CL. The antibiotic resistance. *Crisis Pharm Ther*. 2015; 40(4):277-283.
20. Cortegiani A, Russotto V, Montalto F, Foresta G, Lozzo Santi P, Raineri M. Neutrophil CD64 as a marker of infection in patients admitted to the emergency department with acute respiratory failure. *Open Access Emerg Med*. 2014;6:37-44.
21. Kapasi AJ, Dittrich S, González IJ, Rodwell TC. Host biomarkers for distinguishing bacterial from non-bacterial causes of acute febrile illness: a comprehensive review. *PLOS One*. 2016;11(8):1-29.
22. Juskewitch JE, Abraham RS, League SC, et al. Monocyte HLA-DR expression and neutrophil CD64 expression as biomarkers of infection in critically ill neonates and infants. *Pediatr Res*. 2015;78(6):683-690.
23. Gibot S, Béné MC, Noel R, et al. Combination biomarkers to diagnose sepsis in the critically ill patient. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;186(1):65-71.
24. Cid J, Aguinaco R, Sánchez R, García-Pardo G, Llorente A. Neutrophil CD64 expression as marker of bacterial infection: a systematic review and meta-analysis. *J Infect*. 2010;60(5):313-319.
25. Li S, Huang X, Chen Z, et al. Neutrophil CD64 expression as a biomarker in the early diagnosis of bacterial infection: a meta-analysis. *Int J Infect Dis*. 2013;17(1):e12-e23.
26. Hassan U, Ghonge T, Reddy B Jr, et al. A point-of-care microfluidic biochip for quantification of CD64 expression from whole blood for sepsis stratification. *Nat Commun*. 2017;8:1-12.
27. Xu N, Chen J, Chang X, et al. nCD64 index as a prognostic biomarker for mortality in acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Ann Saudi Med*. 2016;36(1):37-41.
28. Xiong S-D, Pu L-F, Wang H-P, et al. Neutrophil CD64 Index as a superior biomarker for early diagnosis of infection in febrile patients in the hematology department. *Clin Chem Lab Med CCLM*. 2017;55(1):82-90.
29. Kim W-K, McGary CM, Holder GE, et al. Increased expression of CD169 on blood monocytes and its regulation by virus and CD8 T cells in Macaque models of HIV infection and AIDS. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2015;31(7):696-706.
30. van der Kuyl AC, van den Burg R, Zorgdrager F, Groot F, Berkhout B, Cornelissen M. Sialoadhesin (CD169) expression in CD14+ cells is upregulated early after HIV-1 infection and increases during disease progression. *PLOS One*. 2007;2(2): e257.
31. Ashokkumar C, Gabriellan A, Ningappa M, Mazariegos G, Sun Q, Sindhi R. Increased monocyte expression of sialoadhesin during acute cellular rejection and other enteritides after intestine transplantation in children. *Transplantation*. 2012;93(5):561-564.
32. Scagnolari C, Antonelli G. Antiviral activity of the interferon α family: biological and pharmacological aspects of the treatment of chronic hepatitis C. *Expert Opin Biol Ther*. 2013;13(5): 693-711.
33. Koyama T, Sakamoto N, Tanabe Y, et al. Divergent activities of interferon-alpha subtypes against intracellular hepatitis C virus replication. *Hepatol Res*. 2006;34(1):41-49.
34. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*. 2004;75(2):163-189.
35. York MR, Nagai T, Mangini AJ, Lemaire R, van Seventer JM, Lafyatis R. A macrophage marker, Siglec-1, is increased on circulating monocytes in patients with systemic sclerosis and induced by type I interferons and toll-like receptor agonists. *Arthritis Rheum*. 2007;56(3):1010-1020.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

How to cite this article: Bourgoin P, Biéché G, Ait Belkacem I, Morange P-E, Malergue F. Role of the interferons in CD64 and CD169 expressions in whole blood: Relevance in the balance between viral- or bacterial-oriented immune responses. *Immun Inflamm Dis*. 2020;8:106–123. <https://doi.org/10.1002/iid3.289>