



HAL
open science

Immunodépression acquise en réanimation : approche expérimentale et cliniques des altérations lymphocytaires induites lors des syndromes septiques

Fanny Poujol

► **To cite this version:**

Fanny Poujol. Immunodépression acquise en réanimation : approche expérimentale et cliniques des altérations lymphocytaires induites lors des syndromes septiques. Immunologie. Université de Lyon, 2016. Français. NNT : 2016LYSE1005 . tel-01359996

HAL Id: tel-01359996

<https://theses.hal.science/tel-01359996>

Submitted on 5 Sep 2016

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

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

N° d'ordre 05-2016

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I
Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Soutenue publiquement le 8 Janvier 2016 par

Mme Fanny POUJOL

Pour le diplôme de

DOCTORAT EN BIOLOGIE

**IMMUNODEPRESSION ACQUISE EN REANIMATION : APPROCHE
EXPERIMENTALE ET CLINIQUE DES ALTERATIONS LYMPHOCYTAIRES
INDUITES LORS DES SYNDROMES SEPTIQUES**

Directrice de thèse : Dr Fabienne VENET

JURY : Monsieur le Professeur Guillaume MONNERET

Monsieur le Professeur Didier PAYEN DE LA GARANDERIE (rapporteur)

Monsieur le Docteur Thomas RIMMELE

Monsieur le Professeur Pierre TISSIERES (rapporteur)

Monsieur le Docteur Fabien TOUZOT

Madame le Docteur Fabienne VENET

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

M. François-Noël GILLY

Vice-président du Conseil d'Administration

M. le Professeur Hamda BEN HADID

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie
Universitaire

M. le Professeur Philippe LALLE

Vice-président du Conseil Scientifique

M. le Professeur Germain GILLET

Directeur Général des Services

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud –
Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C.
BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C.
VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de Recherche en
Biologie Humaine

Directeur : Mme. la Professeure A-M.
SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme Caroline FELIX

Département GEP	Directeur : M. Hassan HAMMOURI
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Département Mathématiques	Directeur : M. le Professeur Georges TOMANOV
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Département Physique	Directeur : M. Jean-Claude PLENET
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. Y. VANPOULLE
Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon	Directeur : M. B. GUIDERDONI
Polytech Lyon	Directeur : M. P. FOURNIER
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. G. PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. le Professeur C. VITON
Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education	Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. N. LEBOISNE

REMERCIEMENTS

Aux membres de mon Jury

Au Professeur Tissières et au Professeur Payen De La Garanderie, merci d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse en étant à la fois rapporteurs et membres du jury de soutenance.

Au Docteur Rimmelé, merci pour nos échanges lors des comités de suivi de thèse, et merci d'avoir participé à l'évaluation finale de mes travaux lors de la soutenance.

Au Docteur Touzot, merci d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse en participant au jury de soutenance.

Au Professeur Monneret, merci de m'avoir donné la chance de réaliser cette thèse, merci pour tous vos précieux conseils tout au long de cette thèse, et merci d'avoir accepté de prendre part à l'évaluation finale de ces travaux.

Au Docteur Venet, merci de m'avoir encadrée tout au long de cette thèse.

A mes encadrants

Fabienne, merci pour ta patience et ton écoute. Julien, merci pour ton implication. Merci à tous les deux pour votre disponibilité, votre pédagogie, votre rigueur et votre enthousiasme. J'ai énormément appris à vos côtés, scientifiquement et humainement, merci de m'avoir permis de mener à bien cette thèse.

A mes collègues.

Estelle, tu n'imagines pas à quel point tu as pu m'aider. Merci, pour ton soutien, pour nos longues discussions, pour les échanges scientifiques et les conseils techniques, et puis merci d'avoir été mon décodeur Convergence et bioMérieux.

Julie D, courage, toi aussi bientôt fini, c'était génial de pouvoir partager tout ça avec toi, merci ! Jérémy, merci pour ta bonne humeur à toute épreuve, ta curiosité, ta motivation communicative. Julie M, Marine, Olivier à vous d'assurer la relève, bon courage, mais je ne suis pas inquiète, vous assurez ! Merci pour votre bonne humeur et tous nos échanges.

Babeth, Marie, Jonathan, Mary-Luz, Sophie, Virginie, Emmanuelle, et tout le LCR grâce à vous j'ai connu une équipe soudée et chaleureuse. Merci pour vos conseils et votre disponibilité, j'ai appris de chacun d'entre vous et je n'aurais pas pu trouver meilleures conditions pour faire une thèse.

Véro, Alexandre, François, Javier, Karine, Karen, et tous les membres du département MD3, merci pour nos échanges.

Fabien, Paola, Mélissa, Audrey, Giulia, merci, et bonne chance pour la suite.

A l'équipe du laboratoire d'immunologie, merci de m'avoir toujours aussi bien accueillie lors de mes multiples passages éclairs. Anne, merci pour ton aide précieuse.

A mes proches

Papa tu m'as appris à persévérer, à défendre mes convictions, à toujours aller de l'avant. Mémé, tu m'as transmis ta bonne humeur, ta volonté, et un certain goût pour la cuisine... Vous êtes dans mes pensées.

Maman, merci pour ton soutien pendant toutes mes études (et elles furent longues), et surtout merci d'être une Super-maman.

Cédric, merci d'avoir été là, de m'avoir écoutée, soutenue, réconfortée, supportée... tu as assuré. Très heureuse et très fière de partager tes jours.

Nikita, Odile, Dimitri, Nina, Muriel, merci de m'avoir aidée à grandir, et merci d'être là, trop loin des yeux mais toujours près du cœur.

Cathy, Patrick, Marion, Mamie,... toute ma belle-famille : merci de m'avoir accueillie à bras ouverts.

Inès, ma sœur de cœur, on s'est connues en prépa, déjà une période compliquée, et on s'est toujours soutenues après ça, merci de partager tous ces petits riens et ces grands tout qui font notre amitié. Les copains, merci pour votre soutien, et les soirées, les week-ends, la danse, les rires ... autant de pauses qui m'ont bien aidée.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	11
REVUE DE LA LITTÉRATURE	13
I - Les syndromes septiques	13
1.1 - Définitions	13
1.2 - Epidémiologie	14
1.2.A - Incidence	14
1.2.B - Mortalité	15
1.2.C - Etiologie infectieuse et épidémiologie microbienne	16
1.2.D - Facteurs de risque	17
1.2.E - Coût	18
1.3 - Diagnostic	19
1.3.A - Diagnostic clinique	19
1.3.B - Diagnostic microbiologique.....	20
1.3.C - Diagnostic biologique	22
1.4 - Prise en charge thérapeutique.....	24
1.4.A - Contrôle du processus infectieux.....	24
1.4.B - Traitement hémodynamique et défaillances d'organes	25
1.5 - Conclusion	25
II - Réponse de l'hôte durant les syndromes septiques	26
11.1 - Déclenchement de la réponse immunitaire et hyperinflammation	26
11.1.A - Phase précoce et reconnaissance microbienne	26
11.1.A.a Pathogen Associated Molecular Patterns et Danger Associated Molecular Patterns.....	27
11.1.A.a.i - Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs).....	27
11.1.A.a.ii - Danger Associated Molecular Patterns (DAMPs).....	27
11.1.A.b Pathogene recognition receptors (PRRs)	28
11.1.A.b.i - Toll-like receptors (TLR).....	28
11.1.A.b.i - Nod Like receptors (NLR).....	31
11.1.A.b.ii - RLR et CLR.....	33
11.1.B - Déclenchement de la réponse immuno-inflammatoire.....	34
11.1.B.a Cascade immuno-inflammatoire et amplification systémique	34
11.1.B.b Régulation de la réponse immunitaire par le système nerveux central	36
11.1.B.c Défaillances d'organes et état de choc	38
11.1.B.c.i - Coagulation	38
11.1.B.c.ii - Système du complément	39
11.1.B.c.iii - Hypotension et état de choc.....	39
11.1.B.c.iv - Métabolisme cellulaire et défaillance multi-viscérale	40
11.1.B.d Cas des super-antigènes (SAg).....	40
11.2 - Immunodépression.....	41
11.2.A - Atteintes monocytaires et altération de la réponse innée	43

II.2.A.a Atteintes monocytaires.....	43
II.2.A.a.i - Altérations phénotypiques.....	43
II.2.A.a.ii - Altérations fonctionnelles	45
• Présentation antigénique et activation de l'immunité adaptative.....	45
• Production de cytokines	45
• Phagocytose.....	46
II.2.A.a.iii - Tolérance à l'endotoxine	47
• Définition.....	47
• Mécanismes impliqués	49
• Modélisation.....	50
II.2.B - Altérations touchant les autres acteurs de la réponse innée: polynucléaires neutrophiles, cellules dendritiques, cellules NK, lymphocyte T $\gamma\delta$	51
II.2.B.a Polynucléaires neutrophiles	51
II.2.B.b Cellules dendritiques.....	52
II.2.B.c Cellules NK.....	53
II.2.B.d Lymphocytes T $\gamma\delta$	54
II.2.C - Altérations de la réponse adaptative : altérations lymphocytaires induites par le sepsis	55
II.2.C.a Lymphocytes T (non régulateurs).....	55
II.2.C.a.i - Apoptose et lymphopénie	56
II.2.C.a.ii - Altérations fonctionnelles.....	58
• Prolifération.....	58
• Production de cytokines	59
II.2.C.a.iii - Altérations phénotypiques	60
• Expression des récepteurs de co-stimulation et de co-inhibition	60
• Diminution de la diversité du répertoire TCR	61
II.2.C.b Lymphocytes T régulateurs.....	61
II.2.C.c Lymphocytes B	62
III - Modélisation des altérations lymphocytaires T induites par le sepsis	65
III.1 - Définitions	65
III.2 - Mécanismes et modélisation de l'anergie lymphocytaire T.....	68
III.2.A - Mécanismes.....	68
III.2.B - Modélisation	70
III.2.B.a Absence de co-stimulation.....	70
III.2.B.b Stimulation sub-optimale du TCR.....	72
III.2.B.c Activation en présence d'IL-10.....	72
III.2.B.d Modulation de la voie CaN/NFAT.....	73
III.2.C - Pertinence vis-à-vis de la modélisation des ALIS.....	73
III.3 - Mécanismes et modélisation de l'épuisement lymphocytaire T	74
III.3.A - Mécanismes.....	74
III.3.B - Modélisation	77
III.3.C - Pertinence des modèles d'épuisement lymphocytaire vis-à-vis des ALIS.....	78
IV - CONCLUSION	80

TRAVAIL PERSONNEL	82
I - Présentation du projet de thèse	82
II - Flow cytometric evaluation of lymphocyte transformation test based on 5-ethynyl-2' deoxyuridine incorporation as a clinical alternative to tritiated thymidine uptake measurement	83
II.1 - Contexte	83
II.2 - Description de l'étude	83
II.3 - Conclusion	83
III - Altered T lymphocyte proliferation upon LPS challenge <i>ex-vivo</i>	94
III.1 - Contexte	94
III.2 - Description de l'étude	94
III.3 - Conclusion	94
IV - <i>Ex vivo</i> evaluation of IL-10 role in sepsis-induced T cell alterations	112
IV.1 - Contexte	112
IV.2 - Description de l'étude	112
IV.3 - Conclusion	112
DISCUSSION	133
CONCLUSION.....	147
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	148

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1. Nosologie des syndromes septiques	13
Figure 2 Nombre de décès en fonction du pathogène à l'origine du syndrome septiques	17
Figure 3 Coûts associés aux syndromes septiques durant les 5 années suivant l'épisode, en fonction de l'âge au moment de l'épisode.....	19
Figure 4 Diminution du temps avant résultat des tests de diagnostic microbiologique grâce à l'utilisation de nouvelles techniques.....	21
Figure 5 Voies de signalisation associées aux TLR.....	30
Figure 6 Mécanismes d'activation des principaux inflammasomes NLR.....	32
Figure 7 Reconnaissance de l'ARN viral par RIG-I et MDA5 et voies d'activation des interférons.....	33
Figure 8 Rôles des systèmes sympathique et parasympathique dans les syndromes septiques	37
Figure 9 Comparaison entre les modes de liaison des antigènes (à droite) et des super antigènes (à gauche) aux molécules CMH-II et TCR	41
Figure 10 Modélisation de la réponse immunitaire lors des syndromes septiques	42
Figure 11 Caractéristiques de la tolérance à l'endotoxine	48
Figure 12 Inhibition des voies de signalisation associées à TLR4 lors de la tolérance à l'endotoxine.....	49
Figure 13 Activation des lymphocytes T par les cellules présentatrices d'antigène	56
Figure 14 Evolution des marqueurs d'épuisement lymphocytaire T au cours du temps	67
Figure 15 Voies de signalisation intracellulaires associées à l'activation des lymphocytes T	69
Figure 16 Inhibition des signaux secondaires d'activation des lymphocytes T.....	70
Figure 17 Récepteurs de co-inhibition et signalisation associée.....	75
Figure 18. Mécanismes possibles d'induction des ALIS.....	134

Figure 19 Cinétique de la production de cytokines par des lymphocytes T en réponse à une stimulation antigénique	143
Tableau 1 Exemple de biomarqueurs évalués pour le diagnostic des syndromes septiques	23
Tableau 2 Ligands et origine des ligands reconnus par les différents TLR	29
Tableau 3 Comparaison des principales caractéristiques de l'anergie, de l'épuisement, et des ALIS.....	79
Tableau 4 Différences entre la souris et l'Homme.....	145

INTRODUCTION

Les syndromes septiques restent à ce jour un problème majeur de santé publique. Définis comme l'association d'une infection et d'une réponse inflammatoire systémique, ils constituent la première cause de mortalité en service de réanimation. Malgré d'importants progrès concernant la prise en charge des patients en service de réanimation, la mortalité associée à ces syndromes reste très élevée, atteignant 30 à 40% pour le choc septique.

La physiopathologie du sepsis, très complexe, implique divers mécanismes parmi lesquels la réponse immunitaire joue un rôle central. Pendant longtemps les syndromes septiques étaient considérés comme une réponse hyper-inflammatoire systémique, à l'origine de défaillances d'organes multiples pouvant conduire au décès. En conséquence, de nombreux essais cliniques mettant en jeu des thérapies anti-inflammatoires ont été développés : ils se sont soldés par autant d'échecs.

Ce constat a conduit à la remise en cause de la compréhension du modèle physiopathologique sous-jacent. Il a été établi qu'en parallèle de la réponse pro-inflammatoire, responsable de la symptomatologie du choc septique, une réponse anti-inflammatoire se met en place. Cette phase anti-inflammatoire affecte les pans innés et adaptatifs de la réponse immunitaire et conduit à un état d'immunodépression. Cette immunodépression est associée à un mauvais contrôle de l'infection, un risque accru de développement d'infections secondaires et est probablement responsable des décès plus tardifs.

Les lymphocytes T, principaux acteurs de la réponse adaptative, sont particulièrement touchés. Ils subissent une apoptose massive et les lymphocytes T survivants présentent des altérations fonctionnelles (prolifération, production de cytokines) et phénotypiques (expression des récepteurs d'activation et d'inhibition, diversité du répertoire du TCR). Or l'intensité et la durée de la lymphopénie et de ces altérations sont associées à un risque accru de développement d'infections nosocomiales et à une mortalité plus élevée.

Ceci constitue le rationnel pour le développement de nouvelles thérapies immunostimulantes ciblant ces altérations.

Les mécanismes à l'origine des altérations lymphocytaires T induites par le sepsis sont encore mal connus. Améliorer leur compréhension permettrait de cibler au mieux ces altérations. De plus, compte-tenu de la dynamique de la réponse immunitaire et de l'hétérogénéité des patients, la mise en place de thérapies immunoadjuvantes nécessite l'utilisation d'outils permettant la stratification des patients en fonction de leur statut immunitaire, inexistant à ce jour.

Dans ce contexte, le but de ce projet de thèse était de mettre en place des modèles *ex-vivo* d'altérations lymphocytaires induites par le sepsis. Ces modèles permettront (i) d'améliorer notre compréhension des mécanismes physiopathologiques à l'origine des altérations lymphocytaires induites par le sepsis (ii) d'identifier des marqueurs de ces altérations lymphocytaires qui permettraient la stratification des patients susceptibles de bénéficier de thérapies immunoadjuvantes (iii) de tester de nouvelles thérapies ciblant ces altérations.

Avant d'envisager la description détaillée de nos travaux de recherche, une revue bibliographique est présentée. Elle concerne principalement :

- Les connaissances actuelles concernant l'épidémiologie et la prise en charge des syndromes septiques
- La compréhension actuelle de la physiopathologie de ces syndromes et en particulier de l'immunodépression associée
- Les modèles d'altérations des lymphocytes T existants et leur pertinence vis-à-vis de la modélisation des altérations des lymphocytes T induites par le sepsis.

REVUE DE LA LITTÉRATURE

I - Les syndromes septiques

I.1 - Définitions

Le sepsis est défini comme l'association d'un syndrome de réponse inflammatoire systémique (SRIS) et d'une infection (« International Sepsis Definitions Conference » ¹).

Plus précisément, un SRIS est défini par la présence d'au moins deux critères parmi les 4 critères suivants : (i) température $>38^{\circ}\text{C}$ ou $<36^{\circ}\text{C}$, (ii) rythme cardiaque >90 battements/minute, (iii) rythme respiratoire >20 cycles/minute ou pression artérielle en $\text{CO}_2 <4,3\text{kPa}$, (iv) nombre de globules blanc $>12\ 000$ cellules/ μL ou $<4\ 000$ cellules/ μL ou présence d'au moins 10% de granuleux immatures.

Une infection est le processus déclenché par l'invasion d'un tissu, d'un fluide ou d'une cavité corporelle par des micro-organismes pathogènes. Le sepsis est souvent associé à la survenue de dysfonctions d'organes (défaillance cardio-vasculaire, rénale, hépatique,...) pouvant évoluer en syndrome de défaillance multiviscérale. On parle

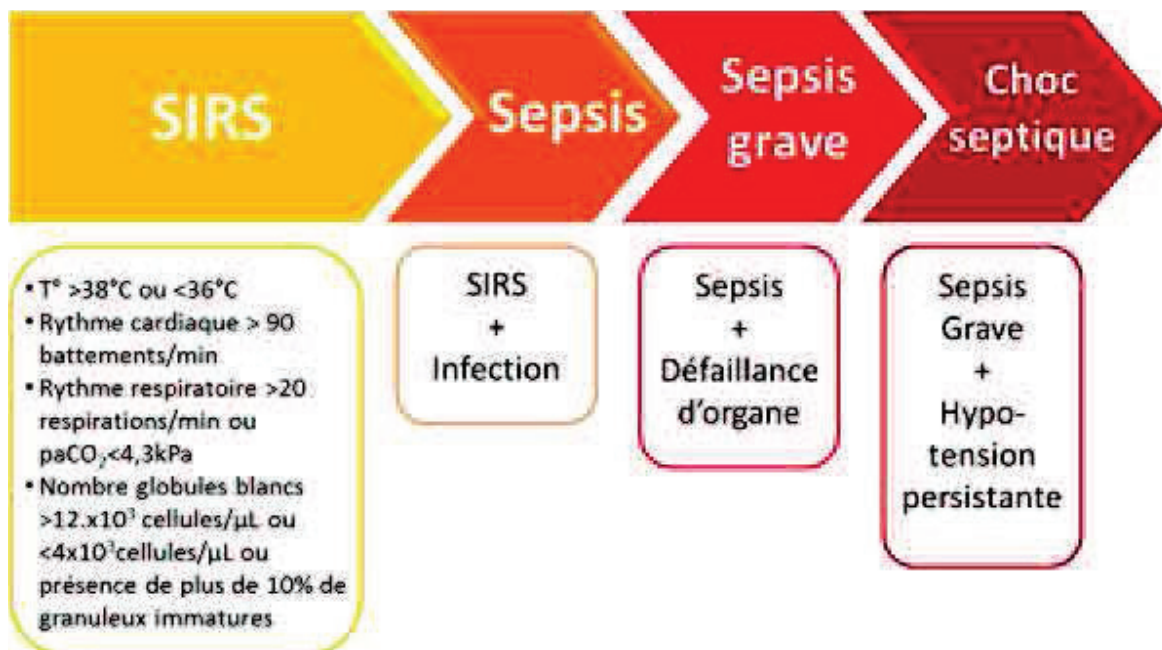


Figure 1. Nosologie des syndromes septiques

alors de sepsis grave. Enfin, lorsque l'une de ces défaillances d'organes se traduit par un état de choc, soit une hypotension persistante malgré un remplissage vasculaire adéquat, le terme retenu est choc septique. Sepsis, sepsis grave et choc septique forment un continuum nosologique de gravité croissante (Figure 1).

Il est à noter que ces définitions prêtent aujourd'hui à discussion ^{2,3}. Une première limite concerne la spécificité du concept de SRIS. En effet ce syndrome peut être observé chez des patients à la suite d'une intervention chirurgicale importante, de traumatismes multiples ou encore lors d'un processus inflammatoire stérile comme la pancréatite aiguë ^{4,5}. A l'opposé, des patients peuvent présenter une infection grave sans présenter de critère de SRIS. Une étude par Kaukonen *et al.* a d'ailleurs estimé que les seuls critères de SRIS excluaient environ 12% des patients présentant une infection associée à une ou plusieurs défaillances d'organes et à un taux de mortalité élevé ⁶. Une nouvelle définition, plus sensible et plus spécifique, permettrait d'améliorer la compréhension de la pathologie et sa prise en charge ⁷.

1.2 - Epidémiologie

1.2.A - Incidence

De nos jours l'incidence des syndromes septiques est élevée et en constante augmentation. Estimée à 123/100 000 en France en 2006 ⁸, elle atteint jusqu'à 1000 cas pour 100 000 habitants aux Etats-Unis en 2009 ⁹.

On estime que, dans les pays développés, les hospitalisations dues aux syndromes septiques représentent 2 % des hospitalisations ¹⁰. En Europe, les formes les plus graves des syndromes septiques représentaient 10 à 45% des admissions en service de réanimation en 2002 ¹¹, en Australie/Nouvelle Zélande elles représentaient 11% de ces admissions en 2012 ¹².

Les disparités entre les différentes zones géographiques concernant l'incidence des

syndromes septiques s'expliquent principalement par des différences dans les politiques de prise en charge de patients, le nombre de lits disponibles en service de réanimation ou encore la provenance des patients qui entrent dans ces unités (services généraux ou services d'urgence) ^{13,14}.

Durant les dernières décennies plusieurs études ont montré que cette incidence est non seulement en augmentation mais que cette augmentation semble accélérée, passant, aux Etats-Unis, de 8,7% par an entre 1979 et 2000 à 13% par an entre 2004 et 2009 ^{9,15}. Des études menées en Australie, en Angleterre ou encore en Croatie montrent elles aussi une tendance à l'augmentation, bien qu'à des rythmes différents ¹⁶⁻¹⁸. Néanmoins la part de cette augmentation liée à une meilleure connaissance des syndromes (due à des multiples actions de sensibilisation et de communication), ainsi qu'à l'amélioration du codage, est difficile à déterminer.

1.2.B - Mortalité

Le nombre de décès liés aux syndromes septiques est estimé à environ 6 millions par an à travers le monde, soit un mort toutes les 5,2 secondes (estimation de Fleischman *et al.* obtenue par extrapolation des données de 33 études ¹⁹). La mortalité associée aux syndromes septiques, très élevée, est directement proportionnelle à leur gravité. Elle est estimée à environ 10% pour le sepsis, 20% pour le sepsis grave et 40% pour le choc septique ^{12,20,21}.

Par ailleurs, les syndromes septiques représentent la 10^{ième} cause de mortalité aux Etats-unis ²², et la première cause de mortalité au sein des services de réanimation non cardiologiques ¹⁵. Malgré une diminution constante de la mortalité, l'augmentation constante de l'incidence entraîne un nombre de décès lui aussi en augmentation. Il est à noter que la plupart des études évaluent la mortalité à 28 jours après le diagnostic du syndrome. Or la mortalité à 5 ans est elle aussi plus élevée après un choc septique : il est probable que la mortalité évaluée à 28 jours sous-estime la mortalité totale associée aux syndromes septiques ^{23,24}.

1.2.C - Etiologie infectieuse et épidémiologie microbienne

Les pneumopathies représentent la cause principale de sepsis, sepsis grave et choc septique. Les infections abdominales représentent quant à elles la deuxième cause de sepsis, devant les infections urinaires puis les infections d'autres origines comme les infections intravasculaires ou les infections des tissus mous ^{21,25}. Les syndromes septiques peuvent être causés par des infections communautaires ou des infections nosocomiales, suivant les études la prédominance de l'une ou de l'autre varie ¹¹.

A ce jour les pathogènes les plus couramment à l'origine de syndromes septiques sont des bactéries, suivi des champignons, des virus puis des levures. Parmi les 70% de patients pour lesquels le diagnostic microbiologique est établi, on constate que les infections sont plus fréquemment causées par des bactéries Gram positif que par des bactéries Gram négatif, représentant respectivement 200 000 et 150 000 cas de sepsis par an aux Etats-Unis ¹⁵.

Parmi ces bactéries on retrouve, par ordre d'incidence, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp* et *Pseudomonas aeruginosa* ^{15,26}. Ces dernières années, on observe une diminution de la proportion de sepsis d'origine bactérienne, et une augmentation de la proportion de sepsis d'origine fongique (Figure 2). Ceci s'explique en partie par une amélioration dans l'identification des sepsis d'origine fongique ¹⁵.

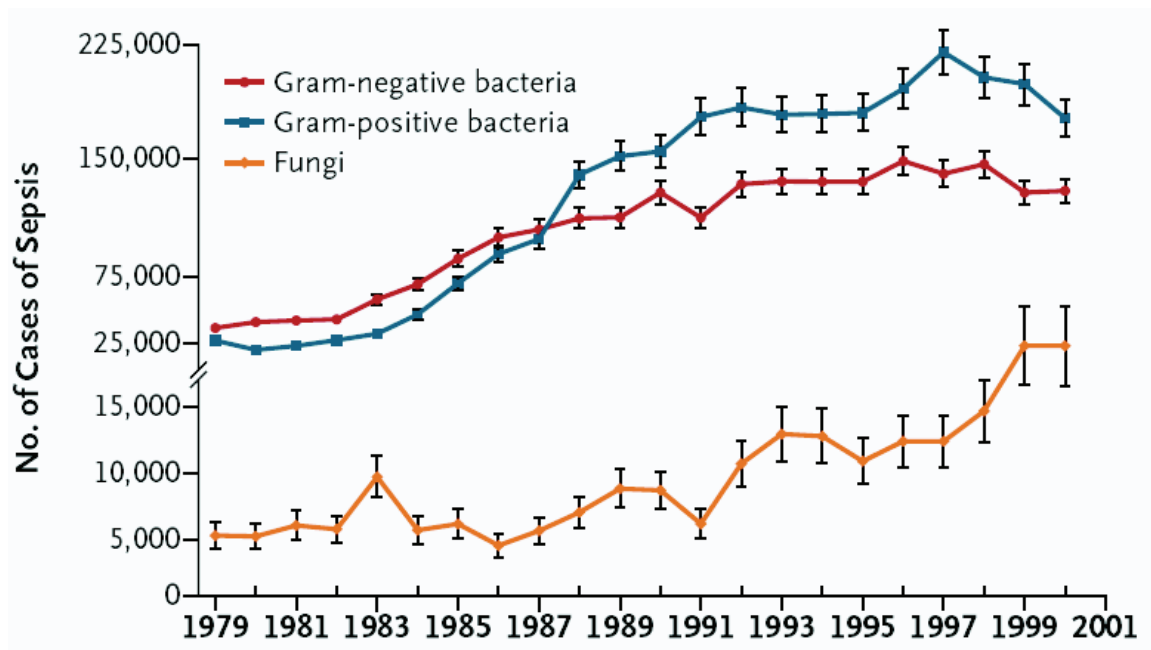


Figure 2 Nombre de décès en fonction du pathogène à l'origine du syndrome septique, d'après Martin *et al.*, NEJM, 2003

L'abscisse représente l'estimation du nombre de cas de sepsis causé par chaque type de pathogène, aux Etats-Unis, par année. Les barres verticales représentent les erreurs-types.

1.2.D - Facteurs de risque

L'âge est l'un des principaux facteurs de risque. En effet aux âges extrêmes de la vie le système immunitaire n'est pas pleinement opérationnel. Immature chez l'enfant, il est sénescence chez les individus âgés. Or un système immunitaire défaillant augmente le risque d'infection et d'évolution de cette infection en syndrome septique. Chez l'enfant le sepsis, le plus souvent causé par une infection pulmonaire représente la première cause de décès²⁷⁻²⁹. Les personnes âgées, en plus d'un système immunitaire défaillant, présentent le plus souvent d'autres pathologies chroniques (défaillances cardiovasculaires, respiratoires, rénales, etc). Il en résulte un risque de développement de syndrome septique et une mortalité plus élevées³⁰⁻³².

Le genre semble lui aussi être un facteur de risque : les hommes sont plus à risque de développer un syndrome septique, mais le risque de décès chez les patients septiques est, lui, plus élevé chez les femmes³³⁻³⁵.

Les maladies altérant le système immunitaire, comme le diabète, le HIV, ou les leucémies, augmentent elles aussi le risque de développer un syndrome septique ainsi que la gravité de ce syndrome ^{36,37}.

On observe aussi une influence de l'ethnie, les individus caucasiens présentant un risque plus faible de développer un syndrome septique ^{38,39}. Néanmoins il est possible que l'influence de l'ethnie représente en réalité l'influence d'une multitude de facteurs de risque environnementaux et sociaux-économiques ⁴⁰.

Enfin il existe des facteurs de risque génétiques. D'une part les maladies génétiques touchant les cellules du système immunitaire, comme le syndrome de Wiskott-Aldrich ou le syndrome de Chediak-Higashi, favorisent le développement d'infections, ponctuelles comme chroniques, qui peuvent évoluer vers un syndrome septique. D'autre part les polymorphismes génétiques touchant des gènes liés à des acteurs de la réponse immunitaire, comme les molécules impliquées dans la détection de pathogènes ⁴¹, les récepteurs d'activation et de co-stimulation des cellules effectrices ⁴², ou encore les cytokines ⁴³, peuvent affecter négativement ou positivement le risque de développement d'un syndrome septique ^{44,45}.

1.2.E - Coût

Les coûts associés à la prise en charge des patients septiques sont particulièrement élevés. En France une étude de 1998 estimait le coût d'un épisode septique entre 26 000€ et 35 000€ (cours de 2001) suivant la gravité du syndrome ⁴⁶. Les épisodes de sepsis grave ont un coût plus élevé que les épisodes de sepsis parce qu'ils nécessitent une prise en charge thérapeutique plus importante que le sepsis. Ils présentent néanmoins un coût plus élevé que les épisodes de choc septique car ils sont associés à une durée de séjour en service de réanimation plus longue ⁴⁶.

Aux Etats-Unis des études plus récentes estiment quant à elles le coût d'un épisode septique à \$21 000 en moyenne ⁴⁷. Ces coûts concernent uniquement la prise en charge des patients durant leur hospitalisation. Or dans une étude publiée en 2015, Tiru *et al.* estiment que ces coûts représentent seulement 30% des coûts réels liés aux syndromes

septiques ¹³. En effet, il faut aussi prendre en compte le coût des soins hors-hôpital nécessaires à la suite d'un syndrome septique. A ces coûts s'ajoutent encore la perte de productivité liée à l'impossibilité de travailler pendant la durée de l'épisode et de la convalescence, ainsi que les coûts liés au syndrome post-sepsis, *i.e.* les atteintes cognitives des individus ayant survécu à un sepsis ^{13,48}. La Figure 3 décrit le coût associé à un épisode septique en fonction de l'âge du patient au moment de l'épisode, au cours des 5 années suivant l'épisode

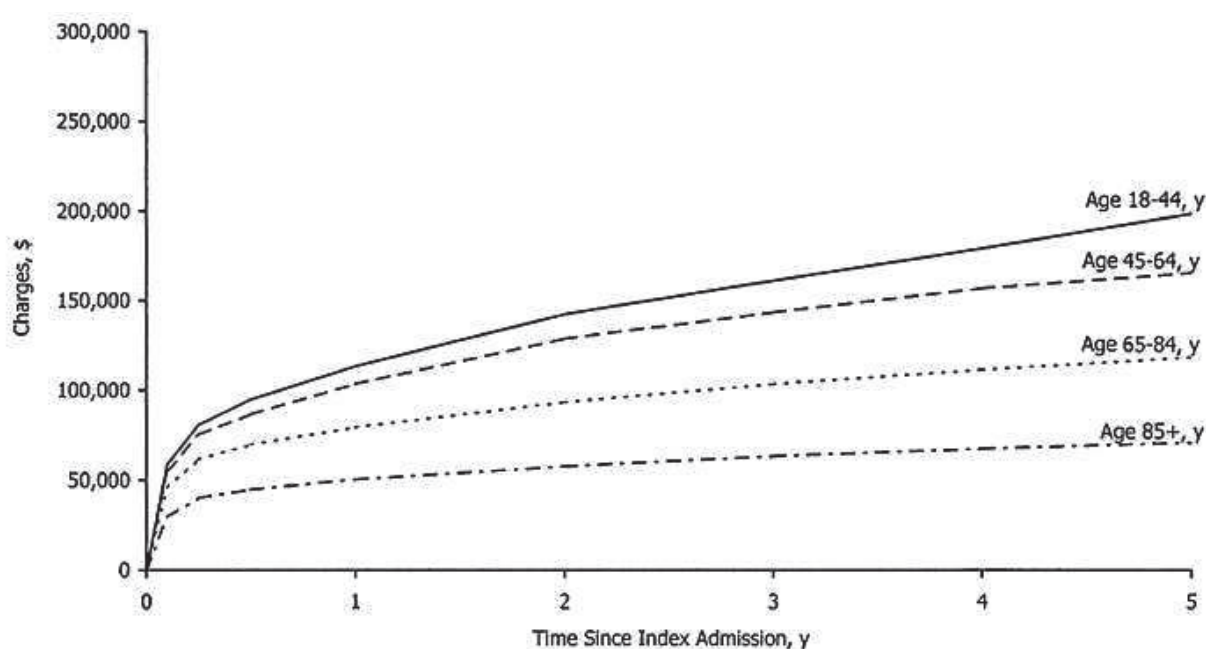


Figure 3 Coûts associés aux syndromes septiques durant les 5 années suivant l'épisode, en fonction de l'âge au moment de l'épisode, d'après Tiru *et al.*, Pharmaco Economics, 2015 ¹²

1.3 - Diagnostic

1.3.A - Diagnostic clinique

Les signes cliniques suivants, bien que non spécifiques, accompagnent le plus souvent les syndromes septiques : modification importante de la température corporelle (fièvre ou hypothermie), tachycardie, augmentation du rythme respiratoire, apparition de rougeurs cutanées ou de pâleurs. Ces signes correspondent au SRIS, néanmoins, comme évoqué précédemment, il est à noter que tous les patients présentant un SRIS ne

sont pas nécessairement septiques. L'apparition de signes traduisant une défaillance d'organe peut ensuite appuyer la suspicion de syndrome septique. Confusion, délirium, pertes cognitives (pouvant aller jusqu'au coma), marbrures, œdème pulmonaire, lactatémie, hyperglycémie, augmentation de la créatinine, augmentation de la bilirubine, sont autant d'exemple de signes de défaillances d'organes.

1.3.B - Diagnostic microbiologique

Il doit être établi dans les plus brefs délais afin d'appliquer au plus tôt une antibiothérapie adéquate. En fonction des évènements ayant précédé la prise en charge du patient en service de réanimation (chirurgie, traumatisme, hospitalisation de longue durée) ou de situations cliniques particulières (infections chroniques, choc toxique staphylococcique, *purpura fulminans*, ...) certaines causes infectieuses sont plus probables que d'autres. Des hémocultures sont réalisées, suivies de coloration de Gram permettant une première caractérisation bactérienne. Ces dernières années, de nouvelles techniques ont été développées, reposant principalement sur des techniques de biologie moléculaire comme la PCR en temps réel, la spectroscopie de masse ou la juxtaposition de ces techniques ⁴⁹⁻⁵¹. Une identification rapide du micro-organisme responsable de l'infection permet de réduire l'utilisation d'antibiothérapies à large spectre. Or leur usage favorise le développement de résistances microbiennes ce qui complique les traitements subséquents. Elle permet de plus de réduire la durée d'hospitalisation et potentiellement d'augmenter la survie des patients ⁵². En effet, environ 20% des patients en choc septique reçoivent une antibiothérapie inappropriée, ce qui divise par 5 leurs chances de survie ⁵³. Les techniques récentes permettent de réduire considérablement la durée nécessaire à l'identification définitive du micro-organisme comme décrit dans la Figure 4.

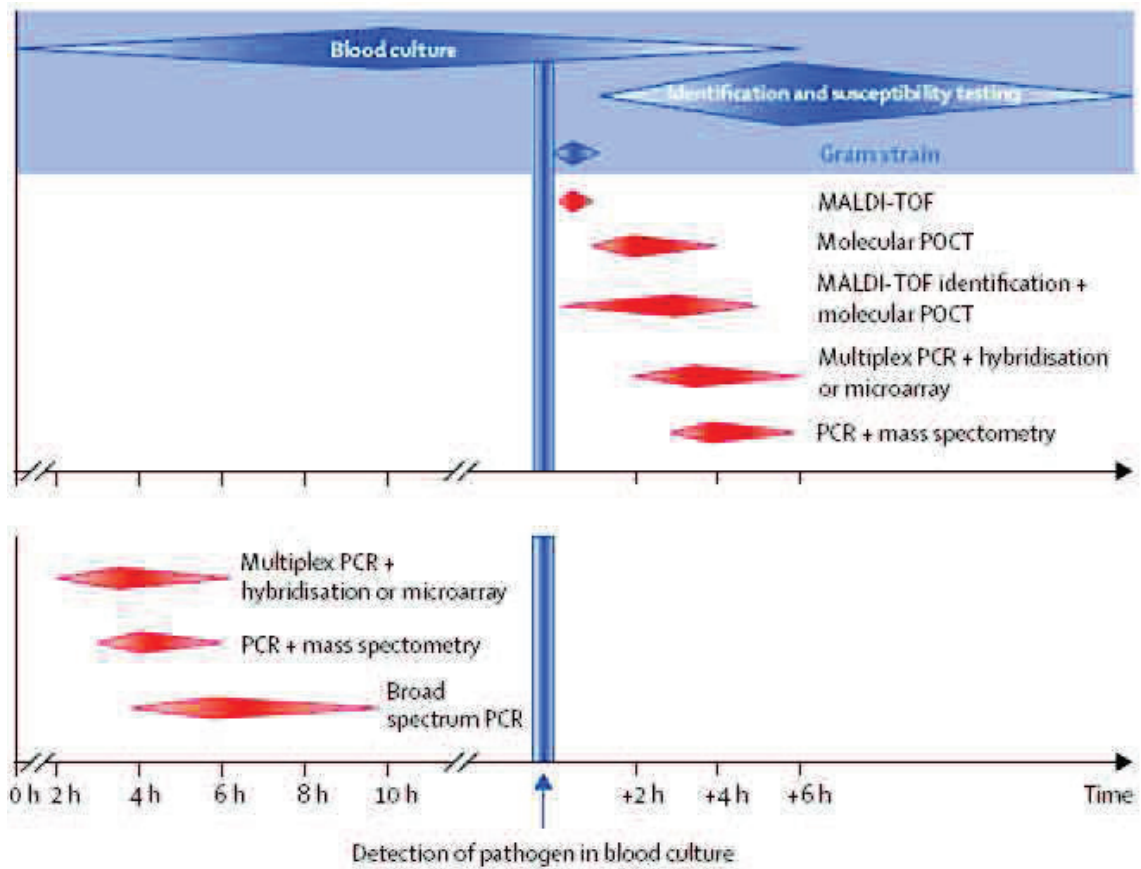


Figure 4 Diminution du temps avant résultat des tests de diagnostic microbiologique grâce à l'utilisation de nouvelles techniques, d'après Cohen *et al.*, The Lancet, 2015

Technologies conventionnelles (en bleu) et nouvelles technologies (en rouge) pour le diagnostic des pathogènes présents dans la circulation sanguine à partir de d'hémocultures positives (A) ou de sang (B). La ligne bleue verticale indique le moment où, en général, les hémocultures deviennent positives. Les losanges représentent la durée théorique d'indentification d'un pathogène pour chaque technologie. MALDI-TOF = matrix-assisted laser desorption ionisation - time of flight. POCT = point-of-care test.

1.3.C - Diagnostic biologique

Les syndromes septiques présentent des origines et des formes cliniques extrêmement hétérogènes. La localisation des foyers infectieux, le type de pathogène à l'origine du sepsis, la présence de comorbidités, l'âge et le sexe sont autant de paramètres qui varient d'un patient à l'autre et qui nécessitent d'adapter la prise en charge thérapeutique. Les limitations des définitions actuelles des syndromes septiques, d'une part, et la nécessité de pouvoir proposer une prise en charge thérapeutique la plus spécifique possible d'autre part, ont poussé les chercheurs à développer et tester de nombreux biomarqueurs.

Un biomarqueur est un paramètre objectivement mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire ou physiologique, associé à une pathologie ou à son évolution :

- les biomarqueurs diagnostiques permettent de caractériser l'état d'un patient à un instant donné : présence d'infection, de défaillance d'organe, ...
- les biomarqueurs pronostiques permettent de prédire l'évolution de l'état du patient : risque de développement d'infection secondaire, aggravation de l'état, ...
- les biomarqueurs de stratification permettent de classer les patients selon le degré de sévérité de leur pathologie ou d'autres critères : nosologie du syndrome, inflammation, immunodépression, ...
- les biomarqueurs de suivi permettent de suivre l'effet d'un traitement : éradication d'un pathogène suite à une antibiothérapie, inactivation de cellules immunitaires après une thérapie immunosuppressive, ...

De nombreux biomarqueurs ont été évalués au cours des dernières décennies mais Pierrakos et Vincent ont observé qu'aucun des 178 biomarqueurs évalués dans 3370 études ne présentait de performances suffisantes pour être utilisable en routine pour le diagnostic des syndromes septiques (Tableau 1) ⁵⁴.

Sepsis biomarker	Clinical study	Type of measurement	Outcome
aPTT**	C	c	High negative predictive value
CD11b***	B	s	Higher values in neonates with sepsis than in those with possible infection
CD25	A	s	Distinguished between sepsis and SIRS
CD64***	C	s	Low sensitivity and specificity to distinguish between viral and bacterial infections
Complement	B	s	Distinguished between sepsis and SIRS
EA complex	C	s	Diagnosis of sepsis, increased earlier than CRP
ELAM-1 (cellular and soluble)	C(s)	c	Increased in trauma patients with sepsis compared with no sepsis
Endocan	B	s	Distinguished between sepsis and SIRS
E-Selectin (cellular and soluble)	B	s	Distinguished between sepsis and SIRS
Fibrin degradation products	B	s	High negative predictive value
G-CSF	C	s	Distinguished between sepsis and SIRS
Gelsolin	B(s)	c	Higher in septic patients compared with patients without sepsis
IL-1 receptor antagonist	C	s	Early diagnosis of sepsis before symptoms in newborns
IL-8*	C	s	Higher in septic neutropenic patients compared with febrile neutropenic patients without sepsis
IL-10	A	s	Higher in septic shock compared with cardiogenic shock
IL-12***	C	s	Diagnosis of sepsis in pediatric patients
IL-18	B(s)	s	Distinguished between Gram-positive and Gram-negative sepsis. Higher in trauma patients with sepsis than in those without
IP-10***	C	s	Early diagnosis of sepsis in newborns
Laminin	A	s	Distinguished between Candida sepsis and bacterial sepsis
LBP	C	s	Distinguished between Gram-positive sepsis and Gram-negative
MCP-1	C	s	Distinguished between sepsis and SIRS in neutropenic pediatric patients
NO, nitrate, nitrite	B	s	Higher in septic shock compared with cardiogenic shock
Osteopontin	B	s	Distinguished between sepsis and SIRS
PAI-1	B	s	Higher in patients with sepsis and DIC compared with no-septic patients with DIC
Pentraxin 3	C	s	Distinguished between septic shock and SIRS
Peptidoglycan	B(s)	c	Higher in postoperative patients with infection compared with no-infected postoperative patients
pFN	B	s	Distinguished between sepsis and SIRS
PLA2-II (soluble)***	B	s	Distinguished between bacteremic and non-bacteremic infections
ST2 (soluble)	A	s	Higher in septic patients compared with those with no sepsis
TREM-1 (soluble)	C	s	Distinguished between sepsis and SIRS, diagnosed pneumonia
Troponin	B	s	Diagnosis of myocardial dysfunction in septic patients

Tableau 1 Exemple de biomarqueurs évalués pour le diagnostic des syndromes septiques, d'après Pierrakos et Vincent, Crit. Care, 2015

*sensibilité et spécificité < 90% ** sensibilité > 90% et spécificité < 90% *** sensibilité et spécificité > 90%

A = essai clinique sur moins de 20 patients, = essai clinique sur 20 à 50 patients, C= essai clinique sur plus de 50 patients (s) =patients issus de chirurgie uniquement. s=valeur unique, c= valeur au cours du temps

aPTT: activated partial thromboplastin time; ARDS: acute respiratory distress syndrome; CRP: C-reactive protein; DIC: disseminated intravascular coagulopathy; EA:elastase alpha 1-proteinase inhibitor; ELAM: endothelial leukocyte adhesion molecule; G-CSF: granulocyte colony-stimulating factor; IP: interferon-induced protein;LBP: lipopolysaccharide-binding protein; MCP: monocyte chemotactic protein; NO: nitric oxide; PAI: plasminogen activator inhibitor; pFN: plasma fibronectin;PLA2: phospholipase A2; SIRS: systemic inflammatory response syndrome; TREM: triggering receptor expressed on myeloid cells.

De plus en plus d'équipes font le choix de s'intéresser, non pas à un marqueur unique, mais plutôt à des combinaisons de biomarqueurs. En effet un panel de marqueurs semble plus à même de refléter la complexité des phénomènes physiopathologiques impliqués dans les syndromes septiques, et donc d'offrir de meilleures sensibilités et spécificités qu'un marqueur unique ^{55,56}. La recherche de nouvelles combinaisons de biomarqueurs est favorisée par les avancées technologiques qui permettent l'observation de très nombreux paramètres de manière simultanée à l'échelle génomique, transcriptomique ou métabolomique ⁵⁷. Le développement récent d'outils permettant l'évaluation de multiplexes en routine clinique permettra d'utiliser les combinaisons ainsi identifiées ^{58,59}.

A l'heure actuelle le diagnostic des syndromes septiques repose donc sur un ensemble de signes cliniques et de biomarqueurs non spécifiques. Il est donc crucial de continuer à chercher le marqueur, ou plus probablement la combinaison de marqueurs qui permettra, le plus précocement possible, le diagnostic définitif d'un syndrome septique.

1.4 - Prise en charge thérapeutique

1.4.A - Contrôle du processus infectieux

La prise en charge thérapeutique débute par la mise en place d'une antibiothérapie probabiliste à large spectre dès le diagnostic du syndrome septique. En effet dans une étude publiée en 2006, Kumar *et al.* ont montré que les chances de survie diminuaient de 7,6% par heure de délai entre le début d'un choc septique et l'administration d'une antibiothérapie, et ce durant les 6 premières heures suivant le choc. Elles passent de 82,7% une demi-heure après le choc, à 42% 6h après le choc ⁶⁰.

L'origine nosocomiale ou communautaire de l'infection, la localisation du foyer infectieux (pulmonaire, abdominal, urinaire, ...), le profil de résistance local des micro-organismes et les antécédents médicaux du patient sont pris en compte dans le choix de

l'antibiotique à administrer. Plus l'antibiothérapie à large spectre dure et plus le risque d'apparition de résistances microbiennes augmente, rendant plus difficile le contrôle du processus infectieux. De plus, l'administration d'une antibiothérapie inadéquate augmente le risque de mortalité^{53,61}. Le spectre de l'antibiothérapie doit donc être affiné dans les 48h à 72h suivant le diagnostic du syndrome, en fonction des résultats du diagnostic microbiologique^{62,63}.

Enfin, lorsque nécessaire, on procède à l'élimination physique du foyer infectieux : drainage, élimination chirurgicale des tissus infectés, retrait des dispositifs médicaux potentiellement infectés^{62,64}.

1.4.B - Traitement hémodynamique et défaillances d'organes

En cas d'hypotension marquée, un traitement hémodynamique est mis en place pour restaurer et maintenir une perfusion tissulaire adaptée permettant le bon fonctionnement des organes. Dans un premier temps, on effectue un remplissage, à l'aide de solutions de cristalloïdes (NaCl 0.9% ou Ringer) ou de colloïdes (albumine, gelatine, dextran).

Si l'hypotension persiste, des molécules vasoactives sont administrées. Le plus souvent il s'agit d'agonistes α -adrénergiques : en première intention on utilise la noradrénaline, à laquelle on peut si besoin ajouter la dobutamine ou l'adrénaline⁶⁵.

En cas de détresse respiratoire une ventilation mécanique est mise en place et la position du patient est adaptée (décubitus ventral si le rapport PaO_2/FiO_2 est inférieur à 100).

Chez les patients présentant une défaillance rénale aiguë on met en place une hémofiltration extra-corporelle intermittente ou continue.

1.5 - Conclusion

A l'heure actuelle les syndromes septiques représentent un problème majeur de santé publique. Première cause de mortalité en service de réanimation non cardiologique, ils sont à l'origine de millions de morts chaque année à travers le monde et représentent un coût élevé pour la société. Le diagnostic de ces syndromes est

complexe et d'autant plus délicat qu'il n'existe pas à ce jour de biomarqueur ou de combinaison de biomarqueurs permettant de poser un diagnostic définitif. La prise en charge thérapeutique des patients septiques, essentiellement symptomatique, a permis de réduire considérablement la mortalité associée à ces syndromes, néanmoins cette mortalité reste élevée. L'amélioration de la compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués dans les syndromes septiques, encore insuffisante, est la clé de l'amélioration de la prise en charge thérapeutique des patients.

II - Réponse de l'hôte durant les syndromes septiques

La première ligne de défense de l'organisme vis-à-vis des micro-organismes est constituée par les barrières physiques et chimiques que sont la peau et les muqueuses. Si ces barrières sont franchies, le pathogène est reconnu par l'organisme qui active immédiatement une réponse innée, complétée plus tardivement par une réponse adaptative plus spécifique du pathogène. L'activation du système immunitaire lors d'une infection débute par une phase pro-inflammatoire contre-balancée par une phase anti-inflammatoire qui permet le retour à l'homéostasie. Le système immunitaire fonctionne en collaboration avec d'autres systèmes biologiques, comme le système de la coagulation et le système nerveux autonome, qui permettent notamment de protéger l'organisme des dommages tissulaires engendrés par les phénomènes inflammatoires systémiques. Dans son ensemble la réponse immunitaire d'un individu est déterminée par un système complexe reposant sur l'expression de nombreux gènes et influencée par de nombreux facteurs dont la virulence du pathogène et l'existence de comorbidités.

II.1 - Déclenchement de la réponse immunitaire et hyperinflammation

II.1.A - Phase précoce et reconnaissance microbienne

Tout syndrome septique débute par la reconnaissance d'un micro-organisme pathogène par le système immunitaire ; cet agent pathogène pouvant être une bactérie, un virus, un champignon ou encore un parasite. Or ces micro-organismes présentent des structures moléculaires appelées PAMPs pour « Pathogen Associated Molecular Patterns ». Ces PAMPs peuvent être reconnues par des récepteurs appelés PRRs (pattern recognition receptors), qui activent le système immunitaire. Parallèlement, en cas d'atteinte des tissus, des alarmines, véritables signaux de dangers aussi appelés DAMPs (pour « Danger Associated Molecular Patterns »), peuvent être libérées et activer, similairement aux PAMPs, les PRRs.

II.1.A.a Pathogen Associated Molecular Patterns et Danger Associated Molecular Patterns

II.1.A.a.i - Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs)

Les PAMPs sont des motifs moléculaires très conservés car essentiels à la survie des pathogènes. De plus ils ne sont pas exprimés par l'hôte et sont communs à de nombreux pathogènes. Des exemples bien connus de PAMPs sont : Le LPS (lipopolysaccharide) est le composant principal de la paroi des bactéries à Gram négatif, ainsi que le peptidoglycan (PGN) et l'acide lipotéichoïque qui sont eux les composants principaux de la paroi des bactéries à Gram positif. D'autres composants bactériens peuvent aussi être détectés, comme la flagelline, facteur de motilité bactérien, ou l'ADN bactérien. Les composants permettant à l'organisme de reconnaître des virus sont l'ADN viral et les ARN viraux simple brin et double brin ^{66,67}.

II.1.A.a.ii - Danger Associated Molecular Patterns (DAMPs)

Les DAMPs sont des molécules endogènes, capables d'initier un processus inflammatoire dans un contexte non infectieux. Elles sont rapidement libérées de manière passive par les cellules nécrotiques ou apoptotiques et permettent, en plus de leur rôle inflammatoire, d'initier la reconstruction tissulaire. Parmi les DAMPs on

retrouve des molécules liées à la mort cellulaire, comme HMGB1 (« High Motility Group Box 1 »), une protéine qui se lie à l'ADN pour favoriser son repliement et libérée lors de la mort cellulaire, ou les protéines HSP (« heat shock protein »), qui jouent un rôle dans le repliement des protéines et sont libérées par les cellules nécrotiques. On retrouve aussi des protéines liées à l'inflammation, comme le précurseur de la cytokine IL1- α , ou les protéines de la famille S100, en particulier S100A8 et S100A9, sécrétées par les phagocytes au niveau des sites inflammatoires. On retrouve aussi l'acide uréique, composant cytosolique qui se transforme en cristaux de monosodium d'urate ⁶⁸⁻⁷⁰.

II.1.A.b Pathogene recognition receptors (PRRs)

Les PRRs se décomposent en 4 familles : les Toll-like receptors (TLR), les Nod-like receptors (NLR), les lectines de type C (CLR) et les RIG-I like receptors (RLR).

II.1.A.b.i - Toll-like receptors (TLR)

Les TLR possèdent une région extra-cellulaire contenant des motifs répétés riches en leucine (LRR) et une queue cytoplasmique contenant un domaine Toll/IL-1 receptor (TIR). Chez l'homme il existe 10 TLR différents. Ils sont localisés au niveau de la membrane cytoplasmique ou au niveau de la membrane nucléaire, ce qui leur permet de détecter des pathogènes extra-cellulaires et intra-cellulaires. Le Tableau 2 présente les principaux motifs moléculaires reconnus par chaque TLR, ainsi que les organismes exprimant ces motifs. Leurs domaines LRR leur permettent de reconnaître des structures extrêmement variées et d'induire des signalisations différentes en fonction du type de pathogène.

Table 1 Toll-like receptors and their ligands		
Receptor	Ligand	Origin of ligand
TLR1	Triacyl lipopeptides Soluble factors	Bacteria and mycobacteria <i>Neisseria meningitidis</i>
TLR2	Lipoprotein/lipopeptides Peptidoglycan Lipoteichoic acid Lipoarabinomannan Phenol-soluble modulins Glycoinositolphospholipids Glycolipids Porins Atypical lipopolysaccharide Atypical lipopolysaccharide Zymosan Heat-shock protein 70*	Various pathogens Gram-positive bacteria Gram-positive bacteria Mycobacteria <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Trypanosoma cruzi</i> <i>Treponema maltophilum</i> <i>Neisseria</i> <i>Leptospira interrogans</i> <i>Porphyromonas gingivalis</i> Fungi Host
TLR3	Double-stranded RNA	Viruses
TLR4	Lipopolysaccharide Taxol Fusion protein Envelope protein Heat-shock protein 60* Heat-shock protein 70* Type III repeat extra domain A of fibronectin* Oligosaccharides of hyaluronic acid* Polysaccharide fragments of heparan sulphate* Fibrinogen*	Gram-negative bacteria Plants Respiratory syncytial virus Mouse mammary-tumour virus <i>Chlamydia pneumoniae</i> Host Host Host Host Host
TLR5	Flagellin	Bacteria
TLR6	Diacyl lipopeptides Lipoteichoic acid Zymosan	<i>Mycoplasma</i> Gram-positive bacteria Fungi
TLR7	Imidazoquinoline Loxoribine Boprifimine Single-stranded RNA	Synthetic compounds Synthetic compounds Synthetic compounds Viruses
TLR8	imidazoquinoline Single-stranded RNA	Synthetic compounds Viruses
TLR9	CpG-containing DNA	Bacteria and viruses
TLR10	N.D.	N.D.
TLR11	N.D.	Uropathogenic bacteria

Tableau 2 Ligands et origine des ligands reconnus par les différents TLR, d'après Akira *et al.*, Nature, 2004

Ils sont exprimés non seulement par les cellules immunitaires de la réponse innée (dont les monocytes, les polynucléaires neutrophiles et les cellules dendritiques) mais aussi par les cellules épithéliales (situées au niveau des points d'entrée des pathogènes). Lors de leur activation les TLR s'homo- ou s'hétéro-dimérisent, ce qui initie une signalisation intracellulaire au niveau de leur domaine TIR, via le recrutement de molécules adaptatrices comme MyD88 (myeloid differentiation primary-response protein 88), TIRAP (TIR-domain-containing adaptor protein), TRIF (TIR-domain-

containing adaptor protein inducing interferon- β) ou TRAM (TRIF related adaptor molecule).

L'ensemble des TLR utilise deux grandes voies de signalisation principales partiellement redondantes : l'une dépend de MyD88 et l'autre dépend de TRIF.

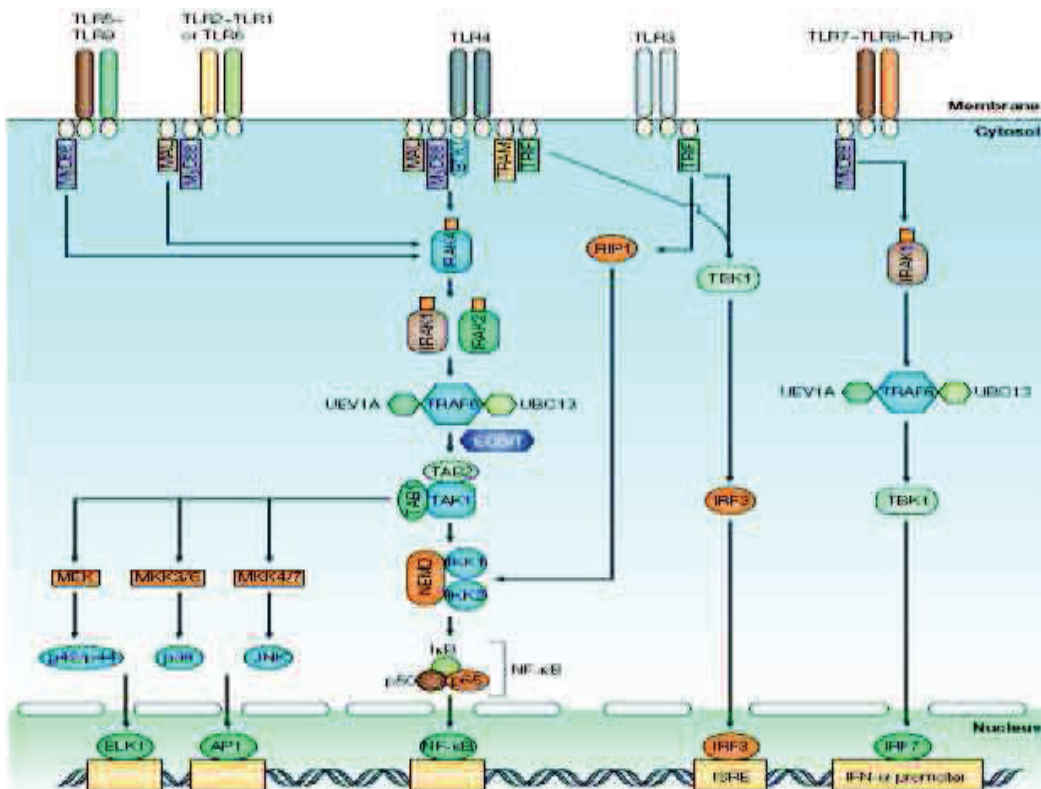


Figure 5 Voies de signalisation associées aux TLR, d'après Liew *et al*, Nature, 2005

La voie dépendant de MyD88 conduit à l'activation de kinases (IRAK-1, IRAK-4) qui vont à leur tour activer différents facteurs de transcription (NF κ B, AP-1, Fos et Jun) pour mener à la régulation de l'expression de nombreux médiateurs clés de la réponse inflammatoire, dont notamment l'IL-1 β et le TNF α . Ces deux cytokines vont à leur tour activer la production de nouveaux médiateurs et ainsi prendre part au développement des réponses immunitaires innée et adaptative.

La voie dépendant de TRIF conduit à une activation plus tardive de NF κ B qui aboutit à la synthèse des interférons de type I, médiateurs clés de la réponse immunitaire antivirale. Ces voies de signalisation associées aux TLR sont récapitulées dans la Figure 5.

Par ailleurs, l'activation des TLR engendre l'augmentation de l'expression de molécules de co-stimulation (CD80 et CD86, aussi appelées B7-1 et B7-2) à la surface des cellules présentatrices d'antigènes, favorisant l'activation de la réponse adaptative par ces cellules.

Enfin, elle entraîne la libération de radicaux libres (oxygénés ou nitrés) et de peptides antimicrobiens qui vont participer à l'élimination du pathogène.

Les TLR sont primordiaux dans la pathogenèse du sepsis. En effet des défauts dans les gènes codant pour les TLR d'une part, et une déficience en MyD88 ou en IRAK-4, d'autre part, sont associés à une susceptibilité accrue aux infections bactériennes ^{41,71}.

De plus, il a été montré que l'expression des TLR est fortement augmentée lors des syndromes septiques ^{72,73}, syndromes au cours desquels les TLR peuvent être activés directement par les agents pathogènes (via les PAMPs) et/ou indirectement, suite à des dommages tissulaires, (via les DAMPs).

Leur rôle clé en fait de potentielles cibles thérapeutiques. En particulier, un inhibiteur de TLR-4 (un TLR activé par de nombreux PAMPs dont le LPS,) a montré des résultats prometteurs lors d'un essai de Phase II mais n'a malheureusement pas montré de bénéfice pour les patients traités lors de l'essai de Phase III ^{74,75}.

II.1.A.b.i - Nod Like receptors (NLR)

Les NLR sont des récepteurs cytoplasmiques présentant différents domaine N-terminaux permettant leur classification et définissant le type de PAMPs ou DAMPs reconnu.

Les NOD sont des NLR reconnaissant des fragments communs de peptidoglycanes bactériens : NOD1 reconnaît le diamino-palmitate, propre aux bactéries à Gram négatif. NOD2 reconnaît le muramyldipeptide présent chez les bactéries à Gram négatif et les bactéries à Gram positif.

Les NLRP représentent la famille la plus importante de NLR, ils possèdent un motif pyrine N-terminal (PYCARD) et ont pour molécule adaptatrice ASC (apoptosis-

associated speck-like protein containing a caspase activation and recruiting domain). Lorsqu'ils sont activés de nombreux membres de la famille des NLR, dont NLRP1, NLRP3, NLRP6 et NLRC4, forment des complexes multimoléculaires appelés inflammasomes, capables d'activer des caspases qui activent à leur tour des cytokines comme l'IL-1 β ou l'IL-18 (comme décrit dans la Figure 6).

Lors des syndromes septiques l'activation des inflammasomes et la libération d'IL-1 β participent probablement aux défaillances d'organes. D'autre part, une étude menée par Fahy *et al.* a montré que les taux d'ARNm correspondant à ASC, caspase-1 et NLRP1 sont diminués chez les patients en choc par rapport aux patients critiques non septiques, laissant supposer que les inflammasomes participent aussi à l'immunodépression observée chez ces patients ⁷⁶.

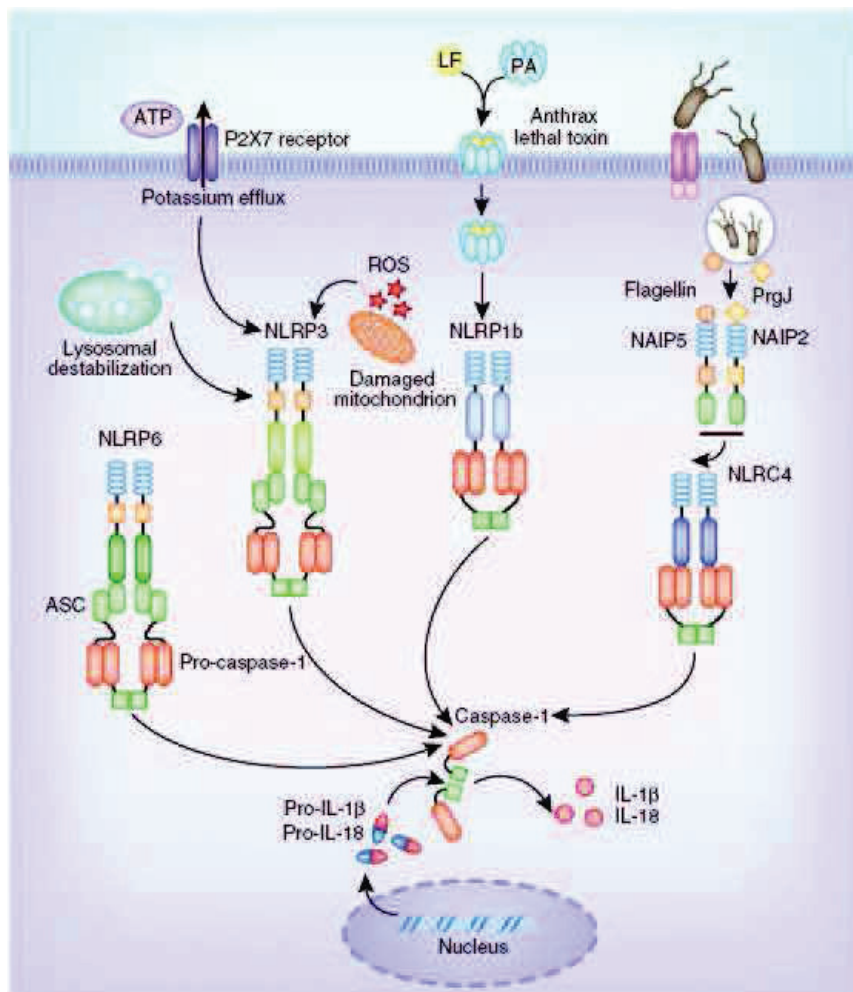


Figure 6 Mécanismes d'activation des principaux inflammasomes NLR, d'après Rathinam *et al.*, Nat. Immunol., 2012

II.1.A.b.ii - RLR et CLR

Les RLR, *i.e.* les hélicases RIG-I (retinoic acid-inducible gene 1) et MDA5 (melanoma differentiation associated protein 5), sont exprimées dans la plupart des cellules et reconnaissent les motifs ARN double brin étrangers au soi. Suite à leur activation, elles activent IRF3 et NFκB via la protéine adaptatrice MAVS (mitochondrial antiviral signaling protein). De plus, une fois liées à l'ARN, elles forment des filaments qui s'oligomérisent avec le domaine de recrutement RLR CARD (caspase recrutement domain) ce qui augmente l'interaction avec MAVS. Ceci aboutit à la formation du complexe SMOC à la surface de la mitochondrie et finalement à la transcription de facteurs qui induisent les interférons de type I, comme décrit dans la Figure 7⁷⁷.

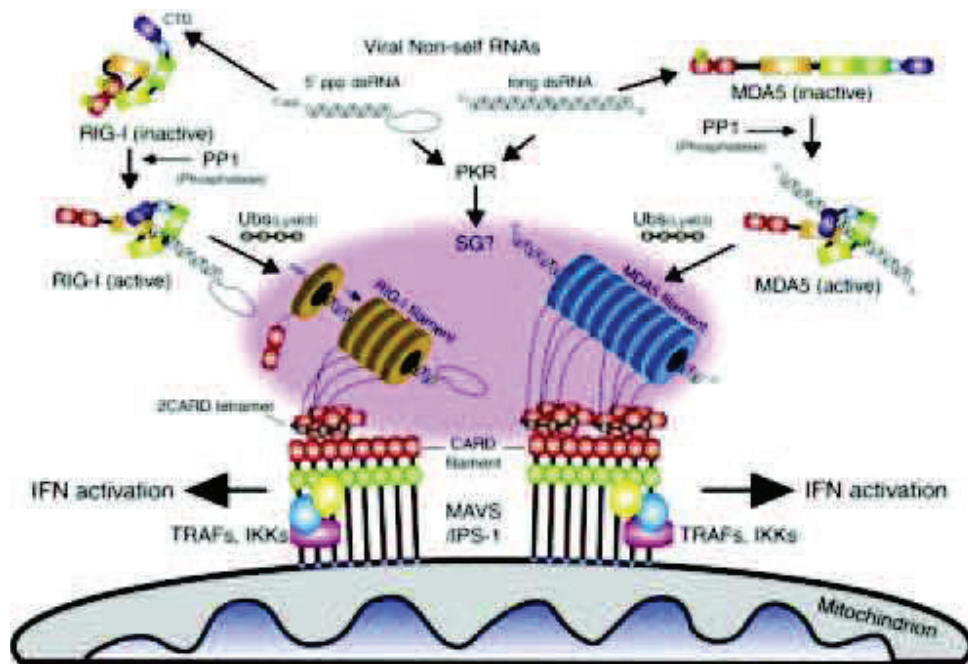


Figure 7 Reconnaissance de l'ARN viral par RIG-I et MDA5 et voies d'activation des interférons, d'après Yoneyama *et al.*, *Curr. Opin. Vir.*, 2015

Les CLR constituent une très large famille de protéines connues pour leur rôle dans la réponse immunitaire anti-fongique et définies par la présence d'au moins un domaine CTLD (C-type lectin-like domain). Récemment d'autres rôles ont été mis en évidence, notamment dans la réponse immunitaire aux mycobactéries, mais aussi dans

l'homéostasie immunitaire au niveau intestinal, l'initiation et la modulation des réponses allergiques, et la réponse immunitaire anti-tumorale ⁷⁸.

II.1.B - Déclenchement de la réponse immuno-inflammatoire

II.1.B.a Cascade immuno-inflammatoire et amplification systémique

Une fois le pathogène reconnu, le système immunitaire s'active au niveau du site de l'infection et déclenche une cascade de phénomènes inflammatoires localisés visant à l'éradication du pathogène.

Tout d'abord l'activation des PRR entraîne la libération de différents médiateurs de l'inflammation : cytokines, chimiokines, et NO (oxyde nitrique).

Certaines cytokines cruciales ont été plus particulièrement étudiées dans le cadre des syndromes septiques. Notamment, le TNF α induit l'activation et la différenciation des macrophages à partir de leurs progéniteurs et prolonge leur durée de vie ^{79,80}. Il induit aussi l'expression de molécules d'adhérence, comme ICAM-1 et VCAM-1, par les cellules épithéliales, favorisant ainsi le recrutement de cellules immunitaires au niveau du site inflammatoire ^{81,82}. L'IL-1, quant à elle, est connue pour être l'un des principaux médiateurs de l'induction de la coagulation par l'inflammation ⁸³. L'IL-1 et le TNF α amplifient tous deux la cascade immuno-inflammatoire en induisant la sécrétion d'autres médiateurs pro-inflammatoires : IL-6, IL-8, MIF (« macrophage migration inhibiting factor »), médiateurs lipidiques, ROS (« reactive oxygen species ») et NO ⁸⁴. L'IL-1 comme le TNF α présentent des concentrations plasmatiques plus élevées chez les patients septiques ⁸⁵⁻⁸⁸.

L'IL-6 est produite par les macrophages, les cellules dendritiques, les lymphocytes et les cellules épithéliales en réponse à leur stimulation par l'IL-1 et le TNF α ⁸⁹⁻⁹¹. Elle active les lymphocytes B et T, le système de la coagulation et module l'hématopoïèse ^{92,93}. Elle peut aussi jouer un rôle inhibiteur en diminuant la sécrétion d'IL-1 et de TNF α et en stimulant la sécrétion de médiateurs anti-inflammatoires (IL-1Ra, sTNFR, IL-10, TGF- β ,

cortisol) ^{94,95}. Sa concentration plasmatique est plus élevée chez les patients septiques ⁹⁶⁻⁹⁸. D'après des études menées sur des modèles de sepsis, sa concentration atteint son maximum après que les concentrations d'IL-1 et de TNF α ont atteint leurs maxima ^{99,100}. L'IL-12, sécrétée majoritairement par les cellules phagocytaires ^{101,102}, induit la sécrétion d'IFN γ par les lymphocytes T et les cellules NK, ce qui favorise l'activité bactéricide des macrophages ¹⁰³. De plus elle induit la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs en cellules Th1 et les protège de l'apoptose induite par la stimulation antigénique ¹⁰⁴. Il a été montré qu'un défaut dans la capacité des macrophages à produire de l'IL-12 augmente le risque de syndrome septique. Par ailleurs, les patients survivant à un sepsis grave présentent une production d'IL-12 plus élevée en réponse à la stimulation des PBMC (« peripheral blood mononuclear cells ») par du LPS ¹⁰⁵⁻¹⁰⁷.

L'IFN γ est principalement produit par les cellules NK, les lymphocytes T_H1 et les lymphocytes T CD8⁺ ¹⁰⁸. Il amplifie la réponse anti-infectieuse. Il est en général indétectable dans le plasma des volontaires sains mais élevé chez les patients septiques ¹⁰⁹.

Enfin, MIF est une cytokine sécrétée à la suite d'une stimulation infectieuse ou inflammatoire, principalement par les macrophages ^{110,111}. Elle agit de manière autocrine en augmentant leur recrutement, en favorisant leur survie et en augmentant leur expression de TLR4 ¹¹²⁻¹¹⁴. De plus elle stimule la sécrétion de TNF α , d'IFN γ et d'IL-1 et active les lymphocytes T ¹¹⁵. Il a été montré que sa concentration sérique est, d'une part plus élevée chez les patients septiques que chez les volontaires sains, et d'autre part, corrélée à l'issue favorable ou non du syndrome septique ^{116,117}.

Ces cytokines agissent de manière synergique et sont capables d'auto-entretenir leur production, conduisant à un phénomène inflammatoire qui s'amplifie de manière autonome.

Par ailleurs, la libération de ces cytokines stimule la synthèse de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales. Les polynucléaires neutrophiles circulants peuvent alors se lier de façon transitoire aux cellules endothéliales avant d'infiltrer les tissus. Le recrutement des polynucléaires neutrophiles est très rapidement suivi par le

recrutement et l'activation de monocytes, macrophages et cellules dendritiques. Ces derniers phagocytent les agents pathogènes et migrent vers les organes lymphoïdes, où ils activent les lymphocytes T et B via la présentation de peptides antigéniques au sein de leurs molécules de CMH-II (complexe majeur d'histocompatibilité de classe II). Les lymphocytes T activés prolifèrent et migrent vers le site infectieux. Les lymphocytes T auxiliaires stimulent l'élimination des pathogènes ingérés par les phagocytes et activent les lymphocytes B, alors que les lymphocytes T cytotoxiques éliminent les cellules infectées. Les lymphocytes B activés sécrètent des anticorps, spécifiques du pathogène. Ces anticorps sont libérés dans la circulation et participent à la neutralisation du pathogène. Une partie des lymphocytes T et B effecteurs se différencie en lymphocytes mémoires, qui permettront une mise en place de la réponse adaptative plus rapide lors d'une nouvelle rencontre du pathogène.

L'ensemble de ces cellules libère des cytokines pro-inflammatoires dans la circulation et participe à l'amplification de l'état inflammatoire. Lorsque les mécanismes de régulation négative de ces phénomènes tardent à se mettre en place, la sécrétion massive de cytokines à l'échelle systémique est qualifiée d'orage cytokinique et on observe un état d'hyper-inflammation systémique.

II.1.B.b Régulation de la réponse immunitaire par le système nerveux central

Lors d'une infection, la réponse immunitaire et le système nerveux interagissent. Des afférences nerveuses et des médiateurs solubles constituent des signaux périphériques qui permettent au cerveau de participer à la régulation de cette réponse immunitaire. Cette régulation se fait via l'axe hypothalamo-hypophysaire et les systèmes nerveux sympathiques et parasympathiques¹¹⁸⁻¹²¹.

Notamment, le TNF α , l'IL-1, l'IL-2, l'IL-6 et le NO augmentent la production de CRH (« corticotropin-releasing hormone ») par l'hypothalamus, ce qui déclenche la production d'acétylcholine (Ach) qui va à son tour induire à sécrétion de glucocorticoïdes par les surrénales. Or les glucocorticoïdes sont de puissants agents anti-

inflammatoires qui inhibent la transcription de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires. Ils potentialisent de plus la sécrétion d'IL-10¹²².

Par ailleurs, l'activation du système parasympathique par des stimuli inflammatoires (notamment via le nerf vague) déclenche la production Ach par les lymphocytes T au niveau de la rate^{123,124}. L'Ach supprime ensuite la production de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires par les macrophages^{125,126} (Figure 8a).

Ces deux systèmes constituent donc deux boucles de rétro-contrôle négatif de l'inflammation.

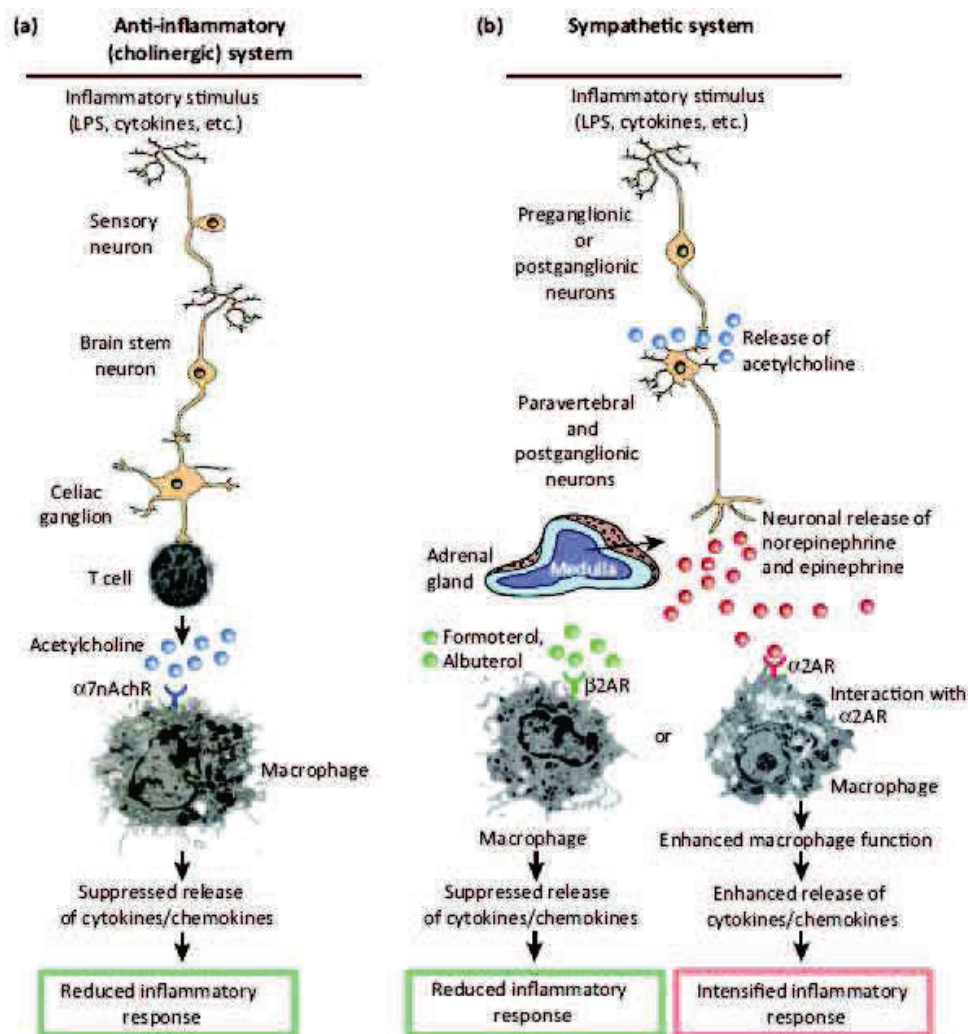


Figure 8 Rôles des systèmes sympathique et parasympathique dans les syndromes septiques, d'après Bosmann et Ward, Trends in Immunology, 2013

L'activation du système sympathique conduit elle aussi à la sécrétion d'Ach, mais cette fois au niveau de la chaîne sympathique latéro-vertébrale. L'Ach déclenche la sécrétion de norépinéphrine (NE) par les neurones. Lorsque la NE se lie aux alpha-récepteurs présents sur les macrophages, elle augmente leur sécrétion de cytokines/chimiokines. Lorsqu'elle se lie aux beta-récepteurs, elle inhibe leur sécrétion de cytokines/chimiokines ¹¹⁸ (Figure 8b). Le système sympathique peut donc agir comme une boucle de rétrocontrôle positif ou négatif.

Lors des syndromes septiques on observe diverses altérations de ces voies de régulation neuro-endocriniennes. Notamment, Barnaby *et al.* ont observé une association entre une activité réduite du nerf vague (évaluée d'après la mesure de la variabilité de la fréquence cardiaque) et la gravité du syndrome chez des patients septiques ¹²⁷. D'autres études ont, elles, montré une altération de la sensibilité des tissus aux glucocorticoïdes ^{128,129}, ce qui laisse supposer une diminution de la régulation négative de la production de cytokines et donc une inflammation favorisée.

II.1.B.c Défaillances d'organes et état de choc

II.1.B.c.i - *Coagulation*

Lors d'une infection on observe l'activation du système de la coagulation, qui entraîne l'occlusion des micro-vaisseaux environnant le foyer infectieux et protège l'organisme en empêchant la propagation des pathogènes. Le système immunitaire interagit avec le système de la coagulation. L'activation des cellules endothéliales et des cellules mononuclées par l'IL-1, le TNF α , ou directement par les produits bactériens, induit l'expression du facteur tissulaire à leur surface, ainsi qu'à la surface des plaquettes ^{130,131}. Ceci conduit à une augmentation de la génération de thrombine.

Lors des syndromes septiques, l'orage cytokinique entraîne un dérèglement du système de la coagulation au niveau systémique. On observe alors l'apparition de micro-thromboses et l'occlusion des capillaires et des micro-vaisseaux sanguins. On parle alors de coagulation intra-vasculaire disséminée (CIVD).

On observe aussi la formation de réseaux de filaments de chromatine extracellulaire produits par les polynucléaires neutrophiles, appelés NET pour « neutrophil extracellular trap ». Ils permettent de limiter la dissémination des micro-organismes pathogènes, mais ils entraînent par ailleurs une augmentation de l'agrégation et l'adhérence des plaquettes, une altération de l'activation de la thrombomoduline par la protéine C et une augmentation de la coagulation ¹³².

II.1.B.c.ii - Système du complément

Durant une infection on observe une activation du système du complément qui conduit à l'augmentation des concentrations plasmatiques de l'anaphylatoxine C5a. C5a peut moduler le recrutement des leucocytes, la coagulation, la réponse immunitaire liée à la voie TLR4 ou encore la sécrétion de cytokines ¹³³⁻¹³⁶.

Plusieurs études ont montré que, lors des syndromes septiques, le facteur C5a participe à la dérégulation de la coagulation, la cardiomyopathie ou les défaillances d'organes ¹³⁷⁻¹³⁹. D'autres études ont montré que l'administration d'un anticorps bloquant C5a diminuait les dérégulations de la coagulation induites lors du sepsis et favorisait le maintien du bon fonctionnement des organes ^{137,140}.

II.1.B.c.iii - Hypotension et état de choc

L'activation massive du système de la coagulation entraîne une consommation importante de protéines de la coagulation (dont l'antithrombine III, de la protéine C et de l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire) ce qui conduit les patients septiques à un état général hypocoagulant ¹⁴¹.

En parallèle, la sécrétion d'IL-1, de TNF α et d'interféron de type I entraîne la production d'iNOS (inducible nitric oxyde synthase) par les cellules immunitaires et les cellules des tissus vasculaires, augmentant la synthèse et le relargage de NO. Or, NO est un puissant agent vasodilatateur, qui entraîne une vasodilatation et une perméabilité accrue des vaisseaux sanguins. La combinaison (i) de l'hypovolémie due à la vasodilatation, (ii) de l'hypovolémie due à la perméabilité accrue des vaisseaux, (iii) d'une défaillance

myocardique, entraîne une hypotension réfractaire au remplissage vasculaire. On parle alors d'état de choc.

II.1.B.c.iv - Métabolisme cellulaire et défaillance multi-viscérale

Le défaut de perfusion tissulaire qui découle en partie de la défaillance du système vasculaire entraîne une hypoxie qui déclenche une modification du métabolisme cellulaire (lipidique, glucidique et protéique). Ces altérations métaboliques conduisent à l'apparition de lésions tissulaires et à la libération de DAMPs qui augmentent le recrutement de cellules immunitaires et aggravent le phénomène hyper-inflammatoire. La modification du métabolisme cellulaire et les lésions tissulaires participent aux défaillances d'organes. Le nombre et la sévérité de ces défaillances diminuent directement la probabilité de survie des patients tout en augmentant la morbidité liée à l'épisode septique, et si quatre organes ou plus sont défaillants le risque de décès atteint 90% ^{84,142}.

II.1.B.d Cas des super-antigènes (SAg)

Les SAg sont des toxines produites en majorité par des bactéries à Gram positif comme *Staphylococcus aureus* ou *Sterptococcus pyogenes*. Ils sont capables d'activer un pool polyclonal de lymphocytes T pouvant représenter jusqu'à 20% de la population totale de lymphocytes T circulants (contre $1/10^5$ ou $1/10^6$ pour un antigène classique). Ils sont responsables des syndromes de choc toxique.

Les SAg se lient en premier à une molécule de CMH-II (complexe majeur d'histocompatibilité de classe II), le plus souvent à la chaîne α , puis interagissent avec la chaîne β de la région variable du TCR (T cell receptor) induisant ainsi l'activation du lymphocyte T (Figure 9).

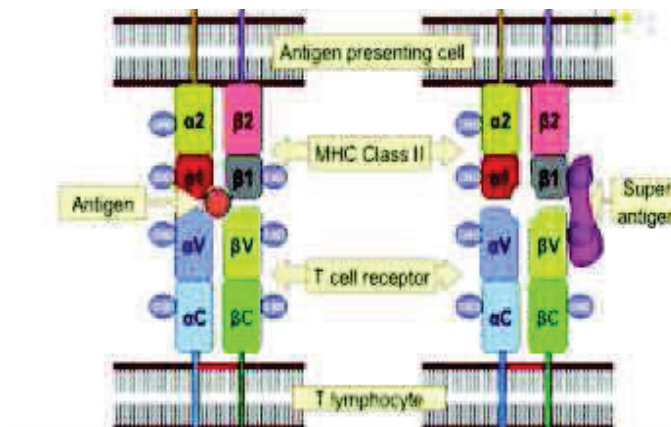


Figure 9 Comparaison entre les modes de liaison des antigènes (à droite) et des super antigènes (à gauche) aux molécules CMH-II et TCR

De plus, les SAg sont capables de ponter les chaînes α et β du CMH-II, entraînant l'activation de la cellule présentatrice d'antigène et donc la sécrétion de cytokines ainsi que l'augmentation de l'expression de molécules de co-stimulation qui vont permettre l'activation complète du lymphocyte T. Les SAg les plus connus sont l'exotoxine TSST-1 (Toxic Shock Syndrome Toxin-1), les entérotoxines de type A et G produites par *S. aureus* et les exotoxines pyrogènes streptococciques produites par *S. pyogenes*.

L'activation des lymphocytes T par les SAg induit la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires : IL-1, IL-2, IL-6, TNF α , IFN- γ , MIP-1 α et β (macrophage inflammatory protein) et MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1). Cette libération importante (de par le nombre de cellules activées) et brutale de cytokines peut mener à des rashes, de la fièvre et dans les cas les plus graves, à des défaillances d'organes, à un état de choc par vasodilatation, au coma, voire au décès.

II.2 - Immunodépression

Pendant longtemps on a décrit l'évolution de la réponse de l'hôte durant les syndromes septiques comme un phénomène uniquement hyper-inflammatoire. Cependant ces dernières années des études ont conduit la communauté scientifique à

considérer cette réponse plutôt comme la succession d'une phase hyper inflammatoire et d'une phase d'immunodépression ^{143,144}. La réponse hyper-inflammatoire se traduit par la sécrétion massive de cytokines pro-inflammatoires et une activation importante des cellules du système immunitaire inné, pouvant avoir des conséquences délétères (acidose, hypercatabolisme, défaillances d'organes, choc). Lors de l'établissement de la réponse anti-inflammatoire, on observe des altérations touchant les cellules du système inné comme les cellules du système adaptatif (apoptose, altérations fonctionnelles et modifications phénotypiques). Ces altérations conduisent à une incapacité à contrôler l'infection initiale et/ou à combattre une infection secondaire. Des études récentes ont montré que la réponse globale de l'hôte est la résultante des réponses pro-inflammatoires et anti-inflammatoires, déclenchées de manière simultanée plutôt que successives (Figure 10) ¹⁴⁵⁻¹⁴⁷.

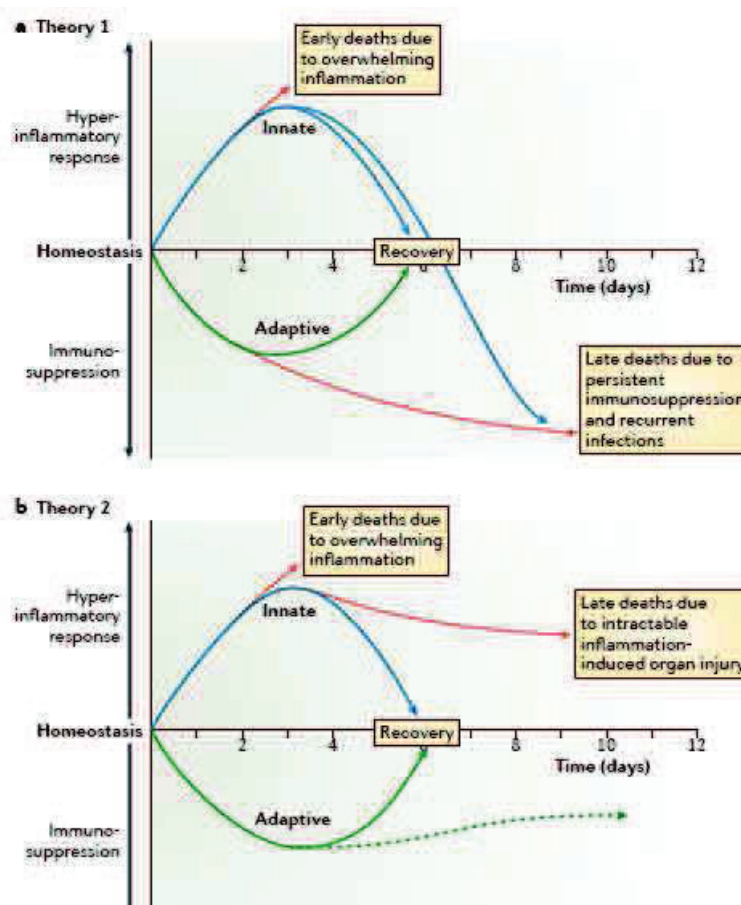


Figure 10 Modélisation de la réponse immunitaire lors des syndromes septiques en fonction du temps, d'après Hotchkiss *et al.*, Nat. Rev. Immunol, 2013

Certains scientifiques font l'hypothèse que les décès précoces seraient dus à la prédominance des phénomènes hyper-inflammatoires, alors que les décès plus tardifs seraient dus à la prédominance de la réponse anti-inflammatoire (Figure 10a) ¹⁴⁸. D'autres font l'hypothèse que les décès tardifs sont plutôt dus à une inflammation persistante causant des défaillances d'organe (Figure 10) ¹⁴⁵. Ces deux hypothèses ont en commun un échec du retour à l'homéostasie conduisant au décès.

II.2.A - Atteintes monocytaires et altération de la réponse innée

II.2.A.a Atteintes monocytaires

Les monocytes sont des acteurs clés de la réponse immunitaire, dont les trois fonctions principales sont la phagocytose des micro-organismes pathogènes, la présentation des antigènes aux lymphocytes T, et la production de cytokines. Les monocytes déclenchent l'activation des lymphocytes T en leur présentant des peptides antigéniques au sein de molécules de CMH-II et en leur fournissant un signal d'activation secondaire et nécessaire via les récepteurs de co-stimulation CD80 et CD86.

Lors des syndromes septiques on observe des altérations phénotypiques (expression des récepteurs membranaires) et fonctionnelles des monocytes (présentation antigénique, production de cytokines).

II.2.A.a.i - Altérations phénotypiques

Les monocytes de patients septiques présentent une diminution de l'expression des molécules de CMH-II, une diminution de l'expression des récepteurs de co-stimulation CD80 et CD86, et une augmentation de l'expression de récepteurs de co-inhibition.

Lors des syndromes septiques, on observe une diminution de l'expression du récepteur au LPS CD14 ¹⁴⁹⁻¹⁵¹ associée à la survie ¹⁵⁰. En parallèle on observe une tendance à l'augmentation de l'expression des TLR, traduisant l'activation des monocytes ^{149,152,153}. Néanmoins cette augmentation est plus faible chez les non-

survivants. Ces deux constats sont donc cohérents avec l'hypothèse d'une association positive entre faible expression monocyttaire des PRR et chances de survie diminuées.

De nombreuses études ont montré une diminution de l'expression monocyttaire de HLA(human leukocyte antigen)-DR (mHLA-DR) lors des syndromes septiques^{85,154-157}. Or, HLA-DR est une molécule de CMH-II. D'autres études ont quant à elles montré l'association entre une valeur basse de mHLA-DR, ou un retour à des valeurs normales tardif, et une augmentation de la mortalité¹⁵⁸⁻¹⁶⁰. Enfin Lukaszewicz *et al.* ont montré, au sein d'une cohorte de patients en service de réanimation, une association négative de l'expression de mHLA-DR avec le développement d'infections secondaires¹⁵⁴. L'ensemble de ces études souligne un lien fort entre expression de mHLA-DR et syndromes septiques, suggérant une possible utilisation de ce paramètre comme biomarqueur.

On observe aussi une diminution de l'expression des récepteurs de co-stimulation CD86 et CD80^{161,162}. Dans une étude sur des patients septiques, Sinistro *et al.* ont mis en évidence une absence d'augmentation de l'expression de ces deux récepteurs en réponse à une stimulation *ex-vivo* des monocytes par du GM-CSF ou du CD40 ligand¹⁶³. De plus, au niveau génétique, une étude menée par Wang *et al.*, portant sur le polymorphisme du gène CD86 au sein de la population chinoise, a montré une association entre deux polymorphismes de CD86 et une susceptibilité accrue de développer un sepsis suite à une pneumonie⁴².

Une étude récente de Chang *et al.* a mis en évidence, en miroir de la diminution de l'expression de CD80/86, une augmentation de l'expression du récepteur de co-inhibition PD-L1, corrélée avec la diminution de l'expression de mHLA-DR¹⁶⁴. De même, Guignant *et al.* ont montré une augmentation de l'expression des récepteurs de co-inhibition PD-L1 et PD-L2 chez des patients après un choc septique par rapport à des patients traumatisés et des volontaires sains, maintenue pendant les premiers jours suivant le choc, et associée à une survenue d'infections secondaires et une mortalité accrues¹⁶⁵. Similairement Pan *et al.* ont montré chez des patients en choc septique une association entre l'augmentation de l'expression monocyttaire de PD-L1 et la gravité du

syndrome d'une part (score de sévérité), et la mortalité d'autre part ¹⁶⁶. Or PD-L1 et PD-L2 interagissent avec le récepteur PD-1 exprimé par les lymphocytes T et inhibent leur activation. L'expression accrue de ces récepteurs participe donc potentiellement à l'établissement de l'immunodépression observée lors des syndromes septiques.

La diminution de l'expression des récepteurs de stimulation/co-stimulation conjointe à l'augmentation de l'expression de récepteur de co-inhibition démontre l'évolution des monocytes vers un phénotype anti-inflammatoire.

II.2.A.a.ii - Altérations fonctionnelles

◆ Présentation antigénique et activation de l'immunité adaptative

Dans une étude menée sur des PBMC humains, Wolk *et al.* ont observé que les lymphocytes T stimulés en présence de monocytes rendus tolérants à l'endotoxine présentaient une prolifération et une production d'IFN γ réduites en réponse à des antigènes de rappel (Candidine, Tuberculine, Toxine tétanique). [Le phénomène de tolérance à l'endotoxine et ses modélisations sont décrits dans le paragraphe II.2.A.a.iii -]. Cette étude, associée aux expressions diminuées de HLA-DR et CD80/86 observées en clinique (cf paragraphe précédent), laisse supposer que les monocytes circulants des patients septiques possèdent une capacité réduite d'activation des lymphocytes T par la présentation antigénique. En accord avec cette hypothèse Manjuck *et al.* ont montré une association entre une diminution des expressions monocytaires d'HLA-DR et de CD86 et une réponse réduite des lymphocytes T à une stimulation par la toxine tétanique chez des patients septiques ¹⁶⁷.

◆ Production de cytokines

Lors des syndromes septiques on observe une modification de la réponse des monocytes à une stimulation *ex-vivo*, notamment concernant la production de cytokines. Plusieurs études ont montré une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α , d'IL-1 β , ou l'IL-6 ^{151,168-170} en réponse à une stimulation

par du LPS ou d'autres stimulants (SEB, PMA, GM-SCF). De plus, on observe une association négative entre cette diminution et la survie ¹⁷¹⁻¹⁷³.

Dans une étude récente, Baffari *et al.* ont montré que les monocytes de patients présentant un sepsis grave produisaient plus d'IL-10 que les volontaires sains en réponse à une stimulation *ex-vivo* par du LPS ¹⁷⁴.

La production de cytokines par les monocytes participe à la régulation de l'ensemble de la réponse inflammatoire : une faible production de cytokines pro-inflammatoires et une production plus importante de cytokines anti-inflammatoires peuvent limiter l'activation des cellules de la réponse adaptative et participer à l'établissement d'un état d'immunodépression.

◆ Phagocytose

Les études menées sur l'évolution la fonction phagocytaire des monocytes durant les syndromes septiques sont peu nombreuses et présentent des résultats discordants. Hirsh *et al.* ont observé une expression plus élevée de CD64 (récepteur de la chaîne Fc des immunoglobulines de type G) sur les monocytes issus de patients septiques, et une activité phagocytaire diminuée des monocytes exprimant CD64 ¹⁷⁵. De même, Skrzeczynska *et al.* ont observé une activité phagocytaire diminuée chez les patients septiques au sein d'une cohorte de nouveaux-nés et de jeunes enfants ¹⁷⁶. Or une capacité phagocytaire diminuée pourrait impliquer une moins bonne élimination des pathogènes. A l'opposé, Döring *et al.*, au sein d'une cohorte d'enfants et de jeunes adultes, et Spittler *et al.*, au sein d'une petite cohorte de patients septiques, ont observé une augmentation de l'activité phagocytaire des monocytes ^{177,178}. Enfin, dans une étude menée sur des patients présentant un sepsis grave, Danikas *et al.* n'ont, eux, observé aucune différence d'activité phagocytaire entre les monocytes de patients septiques et ceux des volontaires servant de contrôle ¹⁵⁰. Les différences observées pourraient s'expliquer en partie par les différences d'âge entre les patients de différentes cohortes évaluées, le type de monocyte étudié (sous-population pro-inflammatoire exprimant CD16), et la gravité du syndrome. Dans l'attente de nouvelles études il n'est pas possible

de conclure quant au devenir de la fonction phagocytaire des monocytes lors des syndromes septiques.

II.2.A.a.iii - Tolérance à l'endotoxine

◆ Définition

La tolérance à l'endotoxine est un état temporaire d'incapacité à répondre à une stimulation par une endotoxine, à l'échelle de la cellule ou de l'organisme, découlant d'une première stimulation par une endotoxine ^{179,180}.

Ce phénomène a été observé pour la première fois en 1946 par Paul Beeson, qui a constaté une diminution de la fièvre vaccinale lors de la vaccination de lapins contre la typhoïde par des injections répétées d'extrait bactérien pyrogène ¹⁸¹. Par la suite d'autres équipes ont observé des phénomènes similaires. Rubenstein *et al.* ont observé le même phénomène avec *Plasmodium cynomogli*, et Greisman *et al.* ont constaté qu'une inoculation de *Salmonella typhosa* entraînait des symptômes réduits lors d'une deuxième stimulation avec des endotoxines ou des bactéries inactivées homologues ou hétérologues (*Pseudomonas*) ^{182,183}. Cette dernière étude met donc en évidence l'induction de tolérance croisée.

D'un point de vue fonctionnel, des études menées au niveau protéique et au niveau transcriptionnel ont montré chez les monocytes/macrophages tolérants à l'endotoxine l'altération de certaines fonctions et le maintien d'autres fonctions ^{180,184-191}. En effet on observe :

- une diminution de la production de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires TNF α , IL-6, IL-12, IL-1 β , CCL3, CCL4 et CXCL10
- une augmentation de la production des cytokines anti-inflammatoires IL-10, TNF β et IL-1RA
- une augmentation de l'expression d'IRAK-M, régulateur négatif de la voie des TLR

- une augmentation de l'expression de gènes associés à des protéines présentant des propriétés microbicides
- une augmentation de la phagocytose et le maintien de la capacité à tuer les pathogènes phagocytés.

Ces observations laissent à penser que la tolérance à l'endotoxine, plus qu'une simple altération des fonctions cellulaires, correspond plutôt à une reprogrammation cellulaire ¹⁹².

D'un point de vue phénotypique on observe une augmentation de l'expression de CD64 et une diminution de l'expression de différentes molécules de CMH-II (HLA-DRs) ainsi que du régulateur des molécules de CMH-II CIITA, et de l'expression de CD86 ^{156,189,193}. La Figure 11 récapitule les caractéristiques fonctionnelles et phénotypiques des monocytes tolérants à l'endotoxine.

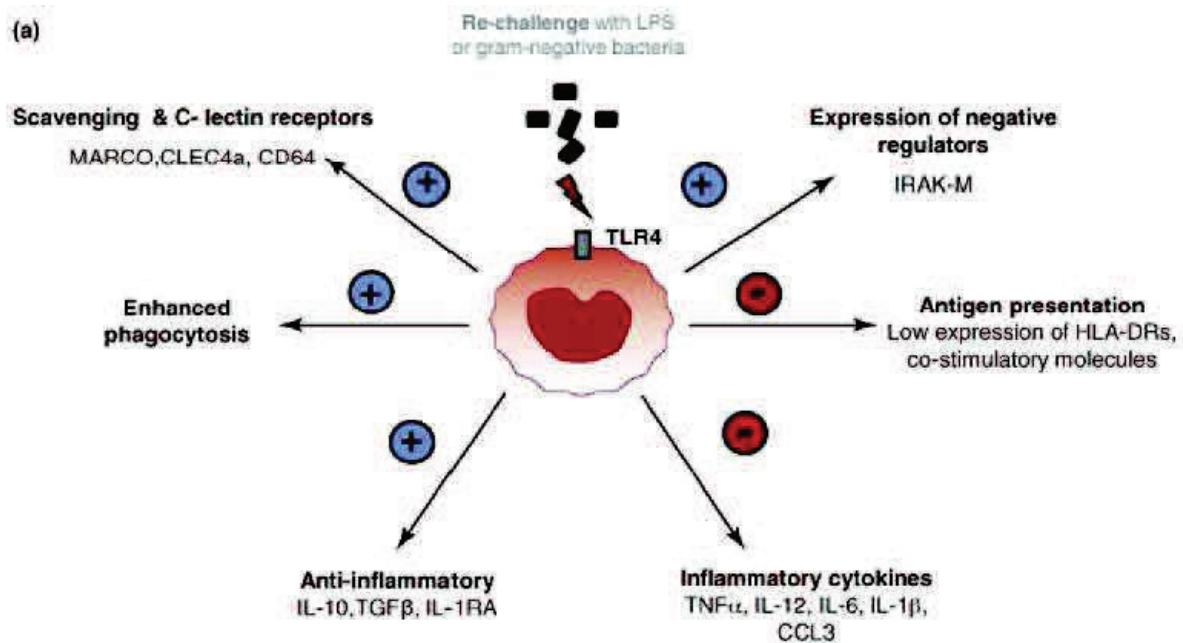


Figure 11 Caractéristiques de la tolérance à l'endotoxine, d'après Biswas *et al.*, Trends Immunol., 2009

◆ Mécanismes impliqués

De façon générale les endotoxines interagissent avec TLR4, ce qui conduit à l'activation de la voie de signalisation impliquant MyD88 et NFκB, comme décrit précédemment (paragraphe II.1.A.b.i) ¹⁹⁴⁻¹⁹⁷.

Lors de la tolérance à l'endotoxine, des études ont montré une altération de la signalisation passant par MyD88 : diminution de la formation du complexe TLR4-MyD88, altération de l'activité d'IRAK-1, défauts d'activation des protéines kinases (MAPK) et de NFκB ^{195,198}. TRIF active des facteurs de transcriptions qui induisent l'expression du TNFα et de l'IFNβ, principaux responsables de la toxicité du LPS. De plus TRIF peut aussi activer IRF3 et induire l'expression de l'IL-10. Or bien que cette voie de signalisation soit cruciale, il existe peu d'informations sur ses potentielles modifications durant la tolérance à l'endotoxine ^{195,199}.

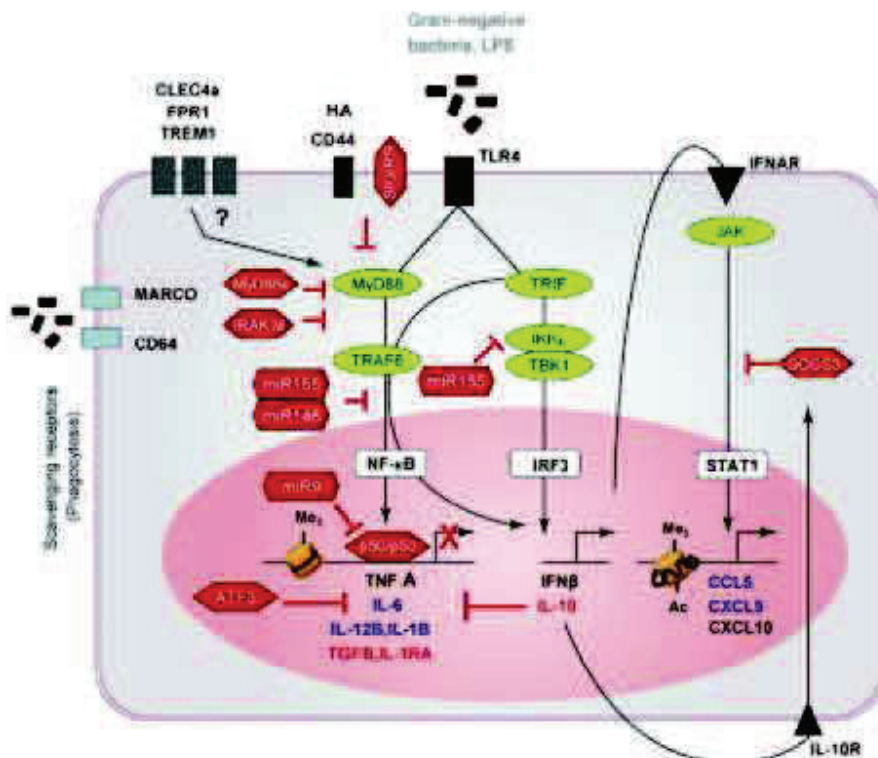


Figure 12 Inhibition des voies de signalisation associées à TLR4 lors de la tolérance à l'endotoxine, d'après Biswas *et al.*, Trends Immunol., 2009

S'additionnant aux altérations des composantes des voies de signalisation associées à TLR4, on observe, au cours de la tolérance à l'endotoxine, l'induction de divers régulateurs négatifs de ces voies de signalisation : SOCS-1, I κ B α , RelB, IRAK-M et MKP-I²⁰⁰⁻²⁰⁴. Enfin, des études ont aussi montré l'implication de différents micro-ARN jouant un rôle inhibiteur à divers niveau des voies de signalisation impliquées²⁰⁵. Ces mécanismes inhibiteurs sont présentés dans la Figure 12.

◆ Modélisation

Le modèle le plus classique de tolérance à l'endotoxine *in vitro* consiste à stimuler des cellules sanguines par une faible dose de LPS allant de 1 à 10ng/mL, puis à laver les cellules avant de les stimuler à nouveau, cette fois par une dose élevée de LPS allant en général de 100 à 1000 ng/mL^{189,206,207}. Les cellules stimulées sont le plus souvent des macrophages, des monocytes ou des PBMC^{208,209}.

La durée de la première phase de stimulation peut varier. Del Fresno *et al.* ont montré qu'une durée d'une heure suffisait pour induire un état de tolérance pouvant durer jusqu'à 5 jours¹⁸⁹.

La concentration de LPS lors de l'induction de la tolérance est, elle, critique : Heremans *et al.* ont montré que des concentrations comprises entre 0,05 et 5 ng/mL étaient capables d'induire non pas une tolérance mais à l'inverse une hyper-réactivité, effet connu sous le nom de réaction Schwartzman²¹⁰.

La production de TNF α est le paramètre de référence pour évaluer l'état de tolérance à l'endotoxine^{184,185,189}.

De manière similaire un modèle humain a été développé, dans lequel des volontaires sains reçoivent une injection intra-veineuse puis les cellules sont prélevées et stimulées *ex-vivo*^{211,212}. Leentjens *et al.* ont développé un deuxième modèle dans lequel des volontaires sains reçoivent deux injections de LPS à une semaine d'intervalle. Dans ce deuxième modèle on observe une immuno-paralysie reflétée par une concentration plasmatique réduite de TNF α ²¹³.

Les monocytes des patients septiques présentent plusieurs caractéristiques de la tolérance à l'endotoxine : diminution de la production de TNF α , d'IL-6, d'IL-12, d'IL-23, phagocytose augmentée, diminution de l'expression de HLA-DR et de CD86. Le modèle de tolérance à l'endotoxine semble donc adéquat pour modéliser *ex-vivo* les altérations monocytaires induites par le sepsis.

Les modèles *ex-vivo*, animaux, ou humains, de tolérance à l'endotoxine, sont donc des outils permettant d'étudier les mécanismes potentiellement impliqués dans les syndromes septiques.

II.2.B - Altérations touchant les autres acteurs de la réponse innée: polynucléaires neutrophiles, cellules dendritiques, cellules NK, lymphocyte T $\gamma\delta$

II.2.B.a Polynucléaires neutrophiles

Les PNN (polynucléaires neutrophiles) font partie de la première ligne de défense de l'hôte. Lors d'une infection, la présence de micro-organismes pathogènes entraîne l'expression de chimiokines et de molécules d'adhésion qui vont permettre le recrutement des PNN au niveau du site inflammatoire et leur infiltration au sein des tissus. Une fois activés, ils phagocytent les micro-organismes pathogènes, libèrent les molécules anti-microbiennes contenues dans leurs granules, et créent des NET. Les NET contiennent des histones et des protéines cytoplasmiques et présentent des propriétés antimicrobiennes et immuno-modulatrices.

Lors des syndromes septiques, on observe dans un premier temps une production très importante de PNN par la moelle osseuse, associée à la libération du pool marginé (neutrophiles adhérant aux cellules épithéliales), ce qui entraîne l'augmentation de la proportion de PNN immatures circulants ^{214,215}. Les caractéristiques fonctionnelles et donc le rôle de ces PNN immatures dans la réponse immunitaire des patients septique restent à définir.

Les PNN circulants présentent également une augmentation de l'expression des marqueurs d'activation CD64^{55,216,217} et CD11b^{218,219}. Les PNN ne présentent donc pas de défaut d'activation lors des syndromes septiques.

Enfin les PNN circulants présentent une durée de vie plus importante, due à un taux d'apoptose plus faible. Or une durée de vie trop importante des PNN peut entraîner des effets délétères en participant à l'amplification de l'inflammation. On observe que leur taux d'apoptose est inversement corrélé à la survie des patients^{220,221}.

Si de nombreuses études ont permis de définir les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des PNN pendant la phase pro-inflammatoire des syndromes septiques, peu d'études se sont intéressées à leur devenir durant la phase d'immunodépression. Dans une étude très récente, Demaret *et al.* ont montré une altération des capacités chimiotactiques des PNN, une diminution du contenu en lactoferrine (molécule antimicrobienne présente dans les granules) ainsi qu'une augmentation du nombre de PNN immatures circulants chez des patients dans les jours suivant un choc septique²²². De plus, dans une étude de 2012, Pillay *et al.* ont observé une population de PNN présentant des propriétés immunosuppressives, *i.e.* capables d'inhiber la prolifération des lymphocytes T, chez des volontaires sains ayant subi une injection de LPS²²³. Ces résultats restent à confirmer mais permettent de supposer que les PNN, à travers une fonctionnalité réduite (diminuant le contrôle des pathogènes), et des propriétés immunosuppressives, seraient eux aussi acteurs de l'immunodépression associée aux syndromes septiques.

II.2.B.b Cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont des cellules présentatrices d'antigènes que l'on peut classer en deux sous-types. Les pDC (« plasmacytoid dendritic cells»), circulantes et capables de produire des interférons de classe I en réponse à la stimulation par un antigène viral. Les mDC (« myeloid dendritic cells») sont infiltrées dans les tissus et migrent vers les organes lymphoïdes secondaires suite à la phagocytose d'éléments pathogènes ou à leur activation par des signaux de danger. Elles peuvent aussi résider

dans les organes lymphoïdes où elles présentent des antigènes étrangers ou des antigènes du soi aux cellules de l'immunité adaptative.

Lors des syndromes septiques la plupart des études montrent une diminution du nombre de mDC et de pDC circulantes, s'expliquant par une apoptose massive de ces cellules, associée à une augmentation du risque de survenue d'infection nosocomiale et une diminution de la survie ²²⁴⁻²²⁶. Weber *et al.* ont observé une augmentation du nombre de pDC dès les premiers jours suivant le diagnostic du syndrome septique ²²⁷. Cependant ils ont observé un nombre de pDC circulantes fortement diminué chez les non-survivants par rapport aux survivants.

On observe aussi une diminution de leur capacité de présentation antigénique à travers la diminution de l'expression de HLA-DR ^{228,229} et de CD86 ^{224,230}.

Poehlman *et al.* ont montré que leur capacité à produire des cytokines est elle aussi affectée. Lors de la stimulation *ex-vivo* de cellules dendritiques ils ont observé une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , TNF α , et IL-6 et une augmentation de la production d'IL-10, cytokine anti-inflammatoire ²²⁸.

Enfin, Faivre *et al.* ont montré que les DC dérivées de monocytes de patients septiques étaient susceptibles d'induire une population de lymphocytes T présentant des propriétés immunosuppressives ²³¹.

L'association positive entre diminution du nombre de DC circulantes et survie laisse penser que les DC auraient un rôle protecteur lors des syndromes septiques. En accord avec cette hypothèse, plusieurs études menées dans des modèles murins de sepsis ont montré que l'amélioration de la fonctionnalité des cellules dendritiques comme la diminution de leur apoptose améliorait la survie ^{232,233}. D'autre part, les modifications fonctionnelles et phénotypiques des cellules dendritiques, similaires à celles des monocytes, correspondent à une diminution de leur capacité à stimuler les lymphocytes T. Elles participeraient donc à l'établissement de l'immunodépression.

II.2.B.c Cellules NK

Les cellules NK (de l'anglais Natural Killer) sont des lymphocytes appartenant à la réponse immunitaire innée, principalement localisés dans les tissus. Elles présentent des propriétés cytotoxiques qui leur permettent d'éliminer des cellules infectées ou des cellules tumorales. De plus elles sont capables de sécréter, dès leur activation, des cytokines pro-inflammatoires stimulant les lymphocytes T et B.

Lors des syndromes septiques on observe une diminution du nombre de cellules NK circulantes, associée à une augmentation de la mortalité ²³⁴⁻²³⁷. On observe aussi une altération de leur capacité à produire des cytokines en réponse à une stimulation *ex-vivo* ^{234,238,238}. Il est donc probable que cette altération fonctionnelle des NK participe à l'établissement de l'immunodépression, en diminuant la stimulation des lymphocytes T et B. De plus, dans la mesure où les cellules NK ont un rôle prépondérant dans la défense antivirale, on peut supposer que la diminution de leur nombre ainsi que l'altération de leurs fonctions pourraient favoriser les réactivations virales lors des syndromes septiques ²³⁴.

II.2.B.d Lymphocytes T $\gamma\delta$

Les lymphocytes T $\gamma\delta$ sont des lymphocytes T dont le récepteur TCR est composé d'une chaîne γ et d'une chaîne δ , contrairement aux lymphocytes T classiques dont le TCR est composé d'une chaîne α et d'une chaîne β . Ils sont situés principalement au niveau de la muqueuse intestinale et présentent des caractéristiques de la réponse innée et des caractéristiques de la réponse adaptative. Bien que l'ensemble du répertoire antigénique reconnu par ces lymphocytes ne soit pas encore complètement déterminé, il est établi qu'ils reconnaissent des antigènes lipidiques et sont capables de libérer immédiatement des cytokines et des chimiokines. Ces médiateurs sont susceptibles d'agir principalement sur les macrophages et les monocytes mais aussi l'ensemble des autres cellules du système immunitaire (IFN γ , IL-17, CXCL10, MIP1 α , RANTES, ...) ²³⁹.

Lors des syndromes septiques le nombre de lymphocytes T $\gamma\delta$ circulants est diminué, et cette diminution est associée à la gravité du syndrome ainsi qu'à la survie ^{240,241}. De par leur rôle de première ligne de défense au niveau intestinal, il est possible que la

diminution de leur nombre constitue une brèche au niveau de cette barrière, qui peut conduire à l'invasion des pathogènes dans la cavité péritonéale et donc favoriser le développement d'infections secondaires ¹⁴³.

II.2.C - Altérations de la réponse adaptative : altérations lymphocytaires induites par le sepsis

Les lymphocytes T et les lymphocytes B sont les acteurs principaux de la réponse immunitaire adaptative. Ils se distinguent des autres lymphocytes par la présence de récepteurs TCR ou BCR à leur surface, qui leur permettent une reconnaissance spécifique des peptides antigéniques microbiens.

II.2.C.a Lymphocytes T (non régulateurs)

Les lymphocytes T sont générés au niveau de la moelle osseuse puis migrent vers le thymus où ils se différencient en lymphocytes T CD4⁺ ou CD8⁺ et achèvent leur développement, avant d'être libérés dans la circulation.

Les lymphocytes T CD4⁺, aussi appelés auxiliaires, sont activés lorsque des cellules présentatrices d'antigènes leur présentent des peptides antigéniques via des molécules de CMH-II. Une fois activés, ils prolifèrent et sécrètent divers panels de cytokines - on parle de réponse T_H1, T_H2, T_H3, T_H17 ou encore T_{FH} -, capables de favoriser différents types de réponses immunitaires.

Les lymphocytes T CD8⁺, aussi appelés cytotoxiques, s'activent quand ils reconnaissent des peptides antigéniques présentés par des molécules de CMH-I. Ils libèrent alors des molécules cytotoxiques (perforine, granzymes, granulysine) qui induisent l'apoptose de la cellule cible. Leur activation entraîne aussi l'expression à leur surface de la protéine Fas ligand (Fas-L) qui, en se liant aux molécules Fas exprimées par les cellules cibles, induit également leur apoptose.

L'activation des lymphocytes T auxiliaires et cytotoxiques requiert plusieurs signaux. La reconnaissance du complexe CMH-peptide antigénique par le TCR et les récepteurs CD4 ou CD8 constitue un premier signal activant la voie de signalisation intracellulaire dépendant du complexe TCR-CD3. Puis, l'interaction des récepteurs CD80 ou CD86, exprimés par cellules présentatrices d'antigène, avec le récepteur CD28, exprimé par les lymphocytes T, induit un deuxième signal, dit de co-stimulation. Enfin, la sécrétion d'IL-2 induite par ces premiers signaux stimule et amplifie l'activation du lymphocyte T. Ces mécanismes sont récapitulés dans la Figure 13.

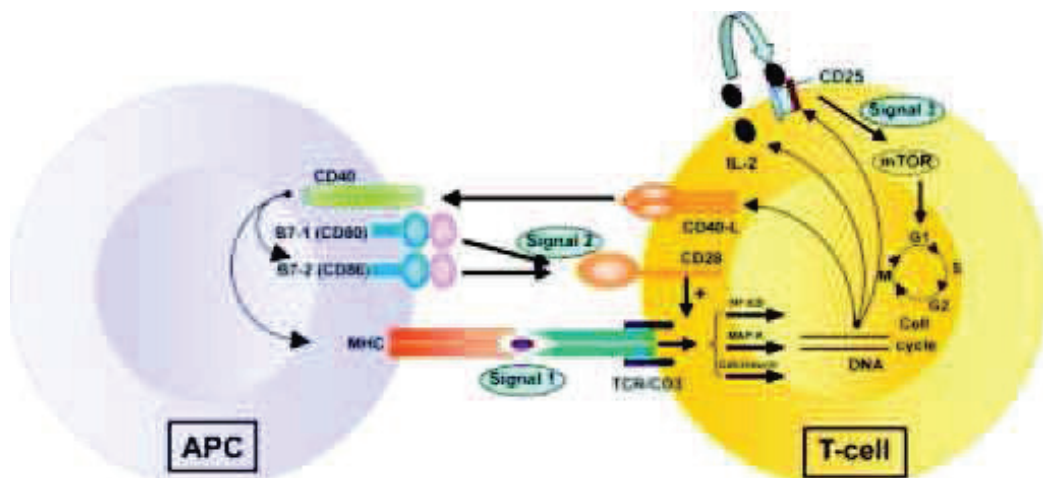


Figure 13 Activation des lymphocytes T par les cellules présentatrices d'antigène, d'après Snanoudj *et al.*, *Biologics*, 2007

II.2.C.a.i - Apoptose et lymphopénie

De nombreuses études ont mis en évidence une importante lymphopénie T chez les patients septiques, pouvant perdurer jusqu'à plusieurs semaines ^{214,242-244}. Des phénomènes apoptotiques, une redistribution des lymphocytes T (au niveau des compartiments sanguin et tissulaire) et une diminution de la production de précurseurs des lymphocytes T par la moelle osseuse sont autant de mécanismes susceptibles de participer, de manière conjointe ou indépendamment, à la mise en place et au maintien de cette lymphopénie.

L'apoptose massive des lymphocytes T, qu'ils soient CD4⁺ ou CD8⁺, explique en partie la lymphopénie T observée.

L'apoptose est une mort cellulaire programmée qui peut être activée par deux voies. La voie extrinsèque est médiée par les récepteurs appartenant à la famille des récepteurs du TNF. C'est l'un des mécanismes qui permet aux lymphocytes T cytotoxiques d'induire l'apoptose de la cellule cible, via l'activation du récepteur Fas. La voie intrinsèque met en jeu la mitochondrie et dépend des interactions entre des protéines pro-apoptotiques comme Bid, Bax et Bak, et des protéines anti-apoptotiques comme Bcl2, BclxL ou Mcl-1. Elle s'active notamment lors de l'apparition d'importants défauts cellulaires, comme une importante dégradation de l'ADN.

Dans une étude de 2014 portant sur 148 patients présentant un sepsis grave, Gomez *et al.* ont montré qu'au moment du diagnostic 37,2% des lymphocytes T CD4⁺ et 20,5% des lymphocytes T CD8⁺ circulants étaient apoptotiques, et que ces pourcentages diminuaient en moyenne de 0,5% et 0,3% par jour (respectivement) durant les 28 jours de suivi des patients ⁸⁵. De manière similaire Tulzo *et al.* et Monserrat *et al.* observent eux aussi une importante apoptose et un retour à des valeurs normales plus rapide pour les lymphocyte T CD4⁺ que pour les lymphocytes T CD8⁺ ^{244,245}. De plus, dans une étude post-mortem, Hotchkiss *et al.* ont observé une apoptose des lymphocytes T CD4⁺ situés au niveau de la rate ²⁴⁶.

Enfin on constate que l'ampleur et la durée l'apoptose des lymphocytes T sont associées à la gravité du syndrome septique et à la survie des patients ^{243,247,248}

D'un point de vue mécanistique, Hotchkiss *et al.* ont montré que les lymphocytes apoptotiques circulants de patients septiques exprimaient des marqueurs correspondants aux voies intrinsèque et extrinsèque de médiation de l'apoptose ²⁴⁸.

Au niveau transcriptionnel, une étude de Weber *et al.* a montré chez des patients présentant un sepsis grave une induction de l'expression des gènes pro-apoptotiques *Bim*, *Bid* et *Bak* chez les lymphocytes T CD4⁺ circulants, en parallèle d'une surexpression marquée de *Bcl-2* et *Bcl-xl* ²⁴⁹. Dans une étude menée sur des patients septiques Hoogerwerf *et al.* ont eux aussi observé un profil pro-apoptotique des lymphocytes T CD4⁺ circulants avec notamment une surexpression des gènes *Bim* et *Bax* ²⁵⁰.

Il est à noter qu'il existe une conséquence indirecte de l'apoptose des lymphocytes T. Lorsque les monocytes/macrophages sont activés en présence de corps apoptotiques, leur sécrétion de cytokines est modifiée et on observe une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-1, IL-12) et une augmentation de la production d'IL-10 ²⁵¹.

L'apoptose massive des lymphocytes T peut donc participer doublement à la mise en place de l'immunodépression induite par le sepsis : à travers la diminution du nombre de lymphocytes T et à travers l'orientation des monocytes/macrophages vers un rôle de régulateur négatif de la réponse immunitaire. Des études de Schwulst *et al.* sur des modèles murins de sepsis ont d'ailleurs montré un effet bénéfique du blocage de l'apoptose lymphocytaire sur la survie ^{252,253}.

II.2.C.a.ii - Altérations fonctionnelles

◆ Prolifération

Plusieurs études rapportent une diminution de la réponse proliférative des lymphocytes T de patients septiques à une stimulation *ex-vivo*. Dans une étude portant sur 30 patients après un choc septique Venet *et al.* ont observé une diminution de la réponse proliférative des lymphocytes T à une stimulation *ex-vivo* de PBMC par différents mitogènes : phytohémagglutinine A (PHA), pokeweed mitogène et concanavaleine A ²⁵⁴. Gomez *et al.*, de manière similaire, ont observé une diminution de la réponse proliférative de lymphocytes T à une stimulation *ex-vivo* par de la PHA chez des patients présentant un sepsis grave ⁸⁵. Roth *et al.* ont, de plus, montré une diminution de cette réponse à la stimulation via un anticorps anti-CD3 chez des patients septiques ²⁵⁵. Enfin Inoue *et al.* ont mis en évidence une diminution de la réponse proliférative des lymphocytes T CD4⁺ stimulés par des billes coatées par des anticorps anti-CD3 et des anticorps anti-CD28 chez des patients septiques ²⁵⁶.

Ces études montrent que la diminution de la réponse proliférative des lymphocytes T est observée à tous les stades de gravité des syndromes septiques. De plus, elle est

observée quel que soit le stimulant utilisé, et non pas de manière spécifique à un ou plusieurs antigènes. Ceci implique une réponse limitée lors d'une stimulation par de nouveaux pathogènes et pourrait donc favoriser le développement d'infections secondaires.

D'autre part cette diminution de la réponse proliférative des lymphocytes T ne favorise pas le retour à une numération normale des lymphocytes T suite à l'apoptose massive observée : ce phénomène participe probablement au maintien de la lymphopénie T observée.

◆ Production de cytokines

Lors des syndromes septiques on observe une modification du profil de cytokines produites par les lymphocytes T. Dans une étude portant sur des patients présentant un sepsis grave, Boomer *et al.* ont observé une diminution de la sécrétion d'IFN γ en réponse à une stimulation par billes coatées par des anticorps anti-CD3 et des anticorps anti-CD28 ²⁵⁷. Similairement Inoue *et al.* ont observé une diminution de la sécrétion d'IL-2 de lymphocytes T de patients septiques en réponse au même stimulant ²⁵⁶. Chang *et al.* et Heidecke *et al.* ont, eux, observé une diminution de la sécrétion de ces deux cytokines lors de la stimulation de lymphocytes T de patients septiques par PMA + ionomycine ou par un anticorps anti-CD3, respectivement ^{164,258}.

Cette altération de la capacité de sécrétion de cytokines pro-inflammatoires est retrouvée chez l'enfant. En effet Muszynski *et al.* ont observé chez des enfants en choc septique une diminution de la sécrétion d'IL-2, d'IFN γ et de TNF α en réponse à une stimulation par de la PHA. Ils ont de plus observé une association entre cette altération et la survenue d'infections nosocomiales ²⁵⁹.

Des études menées sur des modèles murins de sepsis polymicrobien ont de plus montré une augmentation de la production d'IL-10, cytokine immunosuppressive, par les lymphocytes T CD4⁺ ²⁶⁰⁻²⁶².

La diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires est observée quel que soit le stade de gravité du syndrome septique et quel que soit le stimulant testé, à l'instar

de la diminution de la prolifération des lymphocytes T. Or la sécrétion de cytokines permet aux lymphocytes T d'orchestrer la réponse immunitaire en régulant le fonctionnement d'autres cellules immunitaires. L'altération de cette fonction participe donc à l'immunodépression globale observée chez les patients.

II.2.C.a.iii - Altérations phénotypiques

◆ Expression des récepteurs de co-stimulation et de co-inhibition

Deux études de Venet *et al.* ont montré une diminution de l'expression de CD3, molécule clé de l'activation des lymphocytes T, chez des patients à la suite d'un choc septique ^{241,254}. Monserrat *et al.* ont montré une diminution de l'expression de CD28 sur les lymphocytes CD8⁺ circulants de patients après un choc septique, Inoue *et al.* ont observé une diminution de l'expression de CD28 sur les lymphocytes CD4⁺ circulants de patients présentant un sepsis grave.

Enfin Boomer *et al.* ont constaté une diminution de l'expression de CD28 sur les splénocytes T CD4⁺ et CD8⁺ de patients septiques ^{242,243,263}. Une diminution de l'expression de ces récepteurs participe donc probablement à une capacité d'activation potentiellement réduite des lymphocytes T durant les syndromes septiques

Les lymphocytes T expriment des récepteurs qui inhibent leur activation, qualifiés de co-inhibiteurs : cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4), programmed cell death receptor 1 (PD-1), B- and T-lymphocyte attenuator (BTLA), T cell immunoglobulin mucin-3 (TIM-3) ou encore leukocyte activation gene 3 (LAG-3) ²⁶⁴. Plusieurs études ont montré une expression plus importante de PD-1 lors des syndromes septiques ^{164-166,242,243,254}. Cette augmentation d'expression est observée sur les lymphocytes T circulants comme sur les splénocytes ²⁴².

De plus Guignant *et al.* et Pan *et al.* ont montré que l'augmentation de l'expression de PD-1 sur les lymphocytes circulants de patients suite à un choc septiques était associée à un risque accru de développer des infections secondaires ainsi qu'une mortalité plus élevée ^{166,265}.

L'augmentation de l'expression de CTLA-4 a été observée par Venet *et al.*, chez des patients après un choc septiques et par Roger *et al.* chez des patients septiques ^{161,254}. Shubin *et al.* ont observé une expression accrue de BTLA sur les lymphocytes T CD4⁺ de patients septiques par rapport à des patients en SRIS ou volontaires sains, associée à un risque plus élevé de développer une infection secondaire ²⁶⁶

Enfin, Boomer *et al.* ont mis en évidence une augmentation des expressions, par les lymphocytes T, de CTLA-4, de TIM-3 et de LAG-3, 7 jours après le diagnostic d'un sepsis grave ²⁵⁷.

L'augmentation de l'expression de plusieurs récepteurs co-inhibiteurs et la diminution de l'expression de CD3 et CD28 montrent l'ampleur des modifications phénotypiques des lymphocytes T durant les syndromes septiques, et définissent un profil phénotypique d'immunodépression.

◆ Diminution de la diversité du répertoire TCR

Dans une étude récente, Venet *et al.* ont étudié l'évolution de la diversité du répertoire TCR, au niveau génomique, chez des patients présentant un choc septique, entre le premier et le septième jour suivant le choc (J1 et J7). Ils ont observé, à J1, une importante diminution de la diversité du répertoire TCR chez les patients septiques par rapport aux volontaires sains servant de contrôle. A J7, ils ont constaté une restauration importante de cette diversité. Ils ont de plus observé que les patients présentant les restaurations de la diversité du répertoire TCR les moins rapides présentaient un risque accru de survenue d'infection nosocomiale et de décès ²⁶⁷.

II.2.C.b Lymphocytes T régulateurs

Les lymphocytes T régulateurs (Treg) sont des lymphocytes T capables de réguler négativement la réponse immunitaire à travers 3 mécanismes principaux : (i) l'élimination directe de cellules cytotoxiques par contact cellulaire, (ii) l'inhibition de la production de cytokines par les cellules cytotoxiques, en particulier l'IL-2 et le TNF α , (iii) la sécrétion de cytokines immunosuppressives, en particulier l'IL-10 et le TGF β ²⁶⁸.

Monneret *et al.* ont observé une augmentation du pourcentage de lymphocytes Treg circulants chez les patients à la suite d'un choc septique, maintenue uniquement chez les patients non survivants ²⁶⁹. Par la suite Venet *et al.* ont montré que l'augmentation du pourcentage de Treg n'était pas due à une augmentation du nombre absolu de ces lymphocytes mais plutôt à une diminution du nombre de lymphocytes T non régulateurs ²⁷⁰.

Le rôle des lymphocytes Treg dans les syndromes septiques pourrait être crucial car ils sont capables de moduler à la fois la réponse immunitaire innée et la réponse immunitaire adaptative. En particulier, Venet *et al.* ont montré que les lymphocytes Treg contribuaient à l'établissement des altérations fonctionnelles des lymphocytes T décrites précédemment ²⁵⁴, Tiemessen *et al.* ont montré que les lymphocytes Treg étaient capables de modifier l'activation des monocytes et des macrophages ²⁷¹, et Li *et al.* ont montré que les lymphocytes Treg pouvaient inhiber la production d'IFN γ par les lymphocytes T $\gamma\delta$ ²⁷². Ces résultats montrent l'implication des lymphocytes Treg à divers niveaux de l'établissement de l'immunodépression associée aux syndromes septiques.

II.2.C.c Lymphocytes B

Les lymphocytes B sont générés au niveau de la moelle osseuse puis migrent au niveau des organes lymphoïdes secondaires où ils poursuivent leur maturation. Ils résident majoritairement au niveau des follicules lymphoïdes. Leur activation, suite à la reconnaissance d'un antigène par leur BCR, déclenche leur prolifération et leur différenciation en plasmocytes, capables de produire un grand nombre d'anticorps et de les libérer dans la circulation sanguine (réponse immunitaire humorale). En plus de leur rôle de médiateur de la réponse immunitaire humorale ils peuvent aussi jouer un rôle de cellule présentatrice d'antigènes et produire des cytokines immuno-régulatrices.

Lors des syndromes septiques, on observe une diminution à la fois du pourcentage et du nombre absolu de lymphocytes B circulants ^{214,244,255} et de lymphocytes B spléniques ^{242,246}. Dans la mesure où, lors d'une infection, les lymphocytes B prolifèrent

principalement au niveau de la rate plutôt qu'au niveau du site de l'infection, la diminution du nombre de lymphocytes B au niveau de la rate montre que la diminution du nombre de lymphocytes B circulants s'explique plutôt par une diminution globale du pool de lymphocytes B que par un défaut de libération des lymphocytes B spléniques. Monserrat *et al.* ont observé que la diminution de lymphocytes B circulants pouvait être maintenue pendant les 28 jours suivant un choc septique.

Une apoptose importante, décrite par Hotchkiss *et al.* chez des patients septiques ²⁴⁸, ou Zhang *et al.* chez des patients à la suite d'un choc septique ²⁷³, participe à cette diminution globale du nombre de lymphocytes B.

Peu d'études se sont intéressées à la fonctionnalité des lymphocytes B lors des syndromes septiques. Néanmoins Ditschowski *et al.* ont observé une diminution de l'expression de HLA-DR à la surface des lymphocytes B chez les patients développant un sepsis par rapport à ceux qui ne développent pas de sepsis ²⁷⁴.

Lors des syndromes septiques la réponse de l'hôte met en jeu des mécanismes complexes reposant sur l'activation de différents systèmes interconnectés dont le système immunitaire, le système de la coagulation ou encore le système nerveux central. On observe la mise en place de mécanismes immunitaires qui s'opposent. D'une part une hyper-inflammation, qui se traduit notamment par une libération massive de cytokines inflammatoires, et peut conduire à d'importantes défaillances d'organes pouvant conduire au choc et au décès. D'autre part, une immunodépression, qui se traduit par un nombre réduit de cellules effectrices, qui présentent, de plus, une fonctionnalité réduite, et/ou un phénotype immunosuppresseur. La sévérité et la durée de cette immunodépression sont associées à la survenue d'infections secondaires et à une mortalité plus élevée ^{148,275-277}.

Ceci est en particulier vrai pour les lymphocytes T. Ces derniers présentent des altérations fonctionnelles et phénotypiques. D'un point de vue fonctionnel, on constate une diminution de la prolifération et de la production de cytokines pro-inflammatoires

en réponse à une stimulation *ex-vivo*. D'un point de vue phénotypique, on observe une diminution de l'expression des récepteurs d'activation et de co-stimulation, augmentation de l'expression des récepteurs de co-inhibition et diminution de la diversité du répertoire. On parle d'altérations lymphocytaires induites par le sepsis (ALIS). L'importance du rôle des lymphocytes T dans la régulation de la réponse immunitaire pourrait faire des ALIS des cibles thérapeutiques de choix. Cependant les mécanismes conduisant au développement de cette anergie sont à ce jour encore mal connus. La modélisation de ce phénomène permettrait de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques impliqués.

III - Modélisation des altérations lymphocytaires T induites par le sepsis

Il n'existe pas à ce jour de modèle *ex-vivo* des ALIS. Néanmoins il existe des états d'hypo-réactivité lymphocytaire présentant des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles similaires à celles observées lors des syndromes septiques : l'anergie et l'épuisement lymphocytaire. Ces phénomènes ont, eux, été modélisés. Dans cette partie, nous définirons ces deux états lymphocytaires, puis nous présenterons les mécanismes impliqués, leurs modélisations et discuterons de la pertinence d'utiliser ces modèles pour modéliser les ALIS.

III.1 - Définitions

Le terme d'anergie clonale a été utilisé pour la première fois en 1908 par Von Pirquet pour décrire la perte de réponse au test d'hyper-sensibilité retardée à la tuberculose chez des patients atteints par la varicelle ²⁷⁸. Nossal *et al.* ont ensuite repris ce terme pour désigner l'absence de réactivité des lymphocytes B observée chez des souris immunisées par de faibles doses d'antigènes ²⁷⁹. En 1989, Schwartz *et al.* définissent l'anergie des lymphocytes T comme un état d'hypo-réactivité ayant pour caractéristiques principales une incapacité à proliférer et à produire de l'IL-2 en réponse à une stimulation antigénique ²⁸⁰. Dans les années qui ont suivi, le terme d'anergie a été étendu à de très nombreux phénomènes de tolérance dans lesquels les lymphocytes T présentent une réactivité réduite, rendant difficile la classification de ces différents travaux. Dans cette revue nous définissons l'anergie comme une inactivation fonctionnelle des lymphocytes T suite à leur rencontre avec un antigène, associée à une hypo-réactivité persistante ²⁸¹. La persistance de cette hypo-réactivité peut être inférieure à la durée de vie normale de la cellule mais doit excéder le laps de temps correspondant à l'aboutissement d'un processus apoptotique (usuellement de 8 à 24h) afin de pouvoir différencier ces deux réponses physiologiques. De plus cet état est

autonome, c'est-à-dire non maintenu par l'interaction avec d'autres cellules, bien qu'elles puissent participer à l'induction de l'anergie. Cette anergie se caractérise par une réponse proliférative et une production d'IL-2 fortement réduites, ainsi qu'une production d'IFN γ et d'IL-4 diminuées.

L'épuisement lymphocytaire se traduit par une diminution de la fonctionnalité (prolifération, production de cytokines, cytotoxicité) associée à une augmentation de l'expression des récepteurs de co-inhibition comme PD-1^{282,283}. Cet épuisement est principalement observé dans deux contextes cliniques : les infections chroniques et les cancers. Ces deux contextes ont en commun une stimulation persistante des lymphocytes T CD8⁺, due à une exposition prolongée à des antigènes, qu'ils soient issus de pathogènes ou de cellules tumorales.

Le phénomène d'épuisement a été observé pour la première fois par Moskophidis *et al.* qui ont constaté une diminution progressive de la capacité d'expansion des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques d'antigènes viraux chez des souris infectées par le virus causant la chorioméningite lymphocytaire murine (LCMV pour « lymphocyte choriomeningitis murine virus »)²⁸⁴. Depuis, cet épuisement a été observé dans le cadre d'autres infections virales chroniques comme le virus d'immunodéficience humaine (VIH) ou les hépatites B et C.

D'autres équipes ont constaté que cette perte de capacité d'expansion s'accompagnait d'une diminution progressive de la production de cytokines pro-inflammatoires dont l'IL-2, le TNF α et l'IFN γ , successivement^{283,285}. Cette perte de fonctionnalité est associée à une augmentation, elle aussi progressive, de l'expression des récepteurs de co-inhibition PD-1, LAG-3, CD160, 2B4, TIM3, BTLA et CTLA4²⁸⁶. La mise en place des altérations phénotypiques et fonctionnelles lors d'une infection chronique est décrite dans la Figure 14.

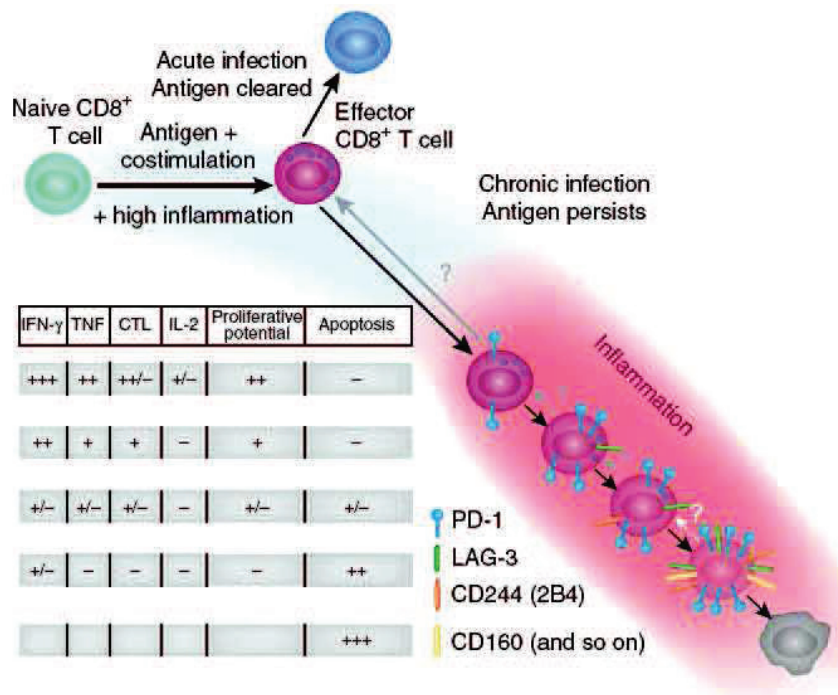


Figure 14 Evolution des marqueurs d'épuisement lymphocytaire T au cours du temps, d'après Wherry *et al.*, Nature, 2011

L'anergie et l'épuisement lymphocytaire sont tous deux des états lymphocytaires associés à une altération de capacité des lymphocytes T à produire des cytokines pro-inflammatoires. Ces états ont été principalement décrits et étudiés chez deux sous-populations distinctes. En effet, l'anergie est quasiment exclusivement décrite chez les lymphocytes T CD4⁺, alors que l'épuisement est décrit chez les lymphocytes T CD8⁺. De plus, la chronologie et l'intensité de ces altérations fonctionnelles diffèrent elles aussi : elles sont maximales et simultanées dès le début de l'anergie, alors qu'elles sont progressives et séquentielles durant l'établissement de l'épuisement lymphocytaire. En l'absence, à notre connaissance, de travaux de recherche concernant l'expression des récepteurs de co-inhibition par les lymphocytes T anergiques, il est impossible de se prononcer quant aux différences phénotypiques entre lymphocytes T anergiques et lymphocytes T épuisés.

III.2 - Mécanismes et modélisation de l'anergie lymphocytaire T

III.2.A - Mécanismes

L'anergie résulte d'une activation partielle des lymphocytes T. Comme décrit précédemment, l'activation complète des lymphocytes T débute par la reconnaissance par le TCR d'un peptide antigénique présenté dans une molécule de CMH. Puis le récepteur de co-stimulation CD28 interagit avec les corécepteurs CD80 ou CD86. Ceci induit l'activation de la phospholipase C gamma 1 (PLC γ -1), de Ras et de la protéine kinase C téta (PKC θ). L'activation de PLC γ -1, Ras et PKC θ entraîne l'activation de MAPK, JNK, PI3K/AKT et I κ B, aboutissant à l'activation de facteurs de transcription. En particulier, elle active les facteurs NFAT, AP-1, CREB et NF κ B qui ont un rôle déterminant dans l'activation du gène *IL-2*²⁸⁷⁻²⁸⁹. L'IL-2 sécrétée se lie à son récepteur (IL-2R) qui active PI3K/AKT. AKT active mTOR et entraîne la dégradation de p27kip21, déclenchant l'entrée en phase G1 du cycle cellulaire. L'activation de la voie AKT/mTOR permet aussi à la cellule d'adapter son métabolisme, en favorisant la voie de la glycolyse, afin de produire l'énergie nécessaire à la prolifération et à la production de cytokines^{290,291}. Enfin mTOR peut réprimer, ou réguler la dégradation des gènes responsables de la maintenance de l'anergie^{292,293}.

L'activation du TCR conduit à l'activation de PIP2, puis d'IP3, et à l'augmentation du taux de calcium intracellulaire. Cette augmentation de la concentration calcique active la calcineurine (CaN) qui active le facteur de transcription NFAT. En l'absence d'activation de co-facteurs de transcription comme AP-1 (activés suite à l'engagement de CD28), NFAT active un ensemble de gènes liés à l'anergie. Ces gènes augmentent notamment la production d'E3 ubiquitin ligases (Cbl-b, GRAIL, Itch, Deltex) qui s'opposent à la signalisation liée au TCR²⁹⁴. En particulier, GRAIL induit une augmentation de l'ubiquitination de la chaîne ζ du CD3, entraînant la dégradation du complexe TCR/CD3 par le protéasome²⁹⁵. Ces mécanismes sont récapitulés dans la Figure 15.

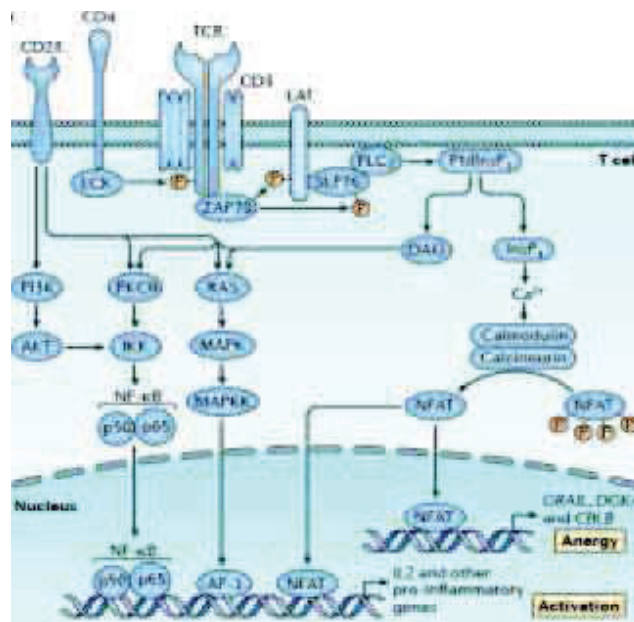


Figure 15 Voies de signalisation intracellulaires associées à l'activation des lymphocytes T, d'après Pollizzi *et al.*, Nat Rev. Immunol., 2014

Il est possible d'induire l'anergie des lymphocytes T malgré l'activation du TCR et de CD28, soit en interférant avec les composants des voies de signalisation situées en aval, soit en bloquant la signalisation d'IL-2R, récepteur de l'IL-2. Par exemple, le blocage de mTOR par la rapamycine induit un état anergique ²⁹⁶. L'activation de mTOR peut aussi être inhibée par la modification de facteurs environnementaux : nutriments, glucose, cytokines ^{297,298} (Figure 16).

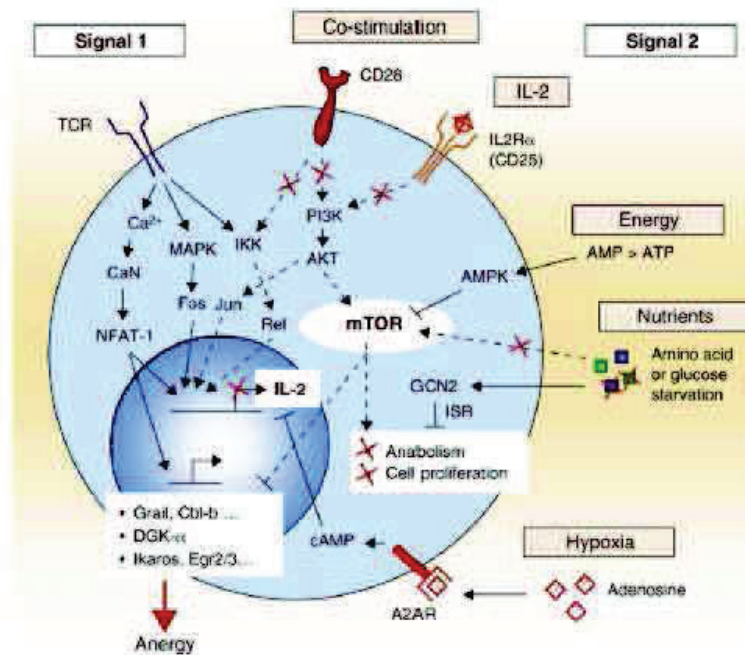


Figure 16 Inhibition des signaux secondaires d'activation des lymphocytes T, d'après Chappert *et al.*, *Curr Opin. Immunol.*, 2010

III.2.B - Modélisation

III.2.B.a Absence de co-stimulation

Historiquement un des premiers modèles d'anergie clonale fut décrit par Quill & Schwartz en 1987. Dans ce modèle des molécules de CMH sont purifiées, intégrées dans des membranes lysosomales, elles-mêmes fixées sur des membranes planes. Des peptides antigéniques sont ensuite ajoutés et se fixent au sein des molécules de CMH. Puis les lymphocytes T CD4⁺ sont ajoutés et incubés pendant 48h²⁹⁹. Pendant l'incubation on observe une augmentation de la taille des lymphocytes T -suggérant une activation cellulaire-, mais pas de prolifération ou de production d'IL-2. Lors d'une nouvelle stimulation par des cellules présentatrices d'antigène, on n'observe pas de réponse proliférative ni de sécrétion d'IL-2.

Un modèle lui aussi basé sur l'activation du TCR en l'absence de co-stimulation a été développé par Otten *et al.* ³⁰⁰. Dans ce modèle, des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques des antigènes OVA (peptides obtenus en digérant de l'ovalbumine par de la trypsine) sont incubés en présence de peptides OVA et de cellules accessoires fixées par du paraformaldéhyde. Lors d'une nouvelle stimulation par un mélange de peptides OVA et de cellules accessoires irradiées, les lymphocytes T CD8⁺ ne prolifèrent pas mais conservent une activité cytotoxique importante.

Dans ces deux modèles l'anergie observée est clonale. De plus, dans la mesure où l'IL-2 joue un rôle prépondérant dans l'induction de la prolifération lymphocytaire et que les productions d'autres cytokines ou d'autres fonctionnalités (cytotoxicité) sont peu affectées, on peut considérer que cette anergie clonale est plus un état de prolifération inhibée que d'hypo-réactivité globale.

Une autre famille de modèles repose sur la stimulation artificielle du complexe TCR/CD3 par un anticorps anti-CD3 en l'absence de co-stimulation ³⁰¹. Un exemple de ce modèle consiste à incuber des lymphocytes T CD4⁺ en présence d'anticorps anti-CD3 fixés à une membrane plane ³⁰². On observe une apoptose de 40 à 60% des cellules et une anergie des cellules restantes : absence de prolifération et de sécrétion d'IL-2 en réponse à une stimulation mitogénique (PHA, Con A). Cette anergie n'est donc pas clonale.

D'autres modèles d'anergie reposent sur la stimulation des lymphocytes T en présence de cellules présentatrices d'antigènes et d'inhibiteurs de récepteurs de co-signalisation. Dans une étude de 2001, Wells *et al.* décrivent un modèle dans lequel l'induction de l'anergie consiste à incuber des splénocytes murins en présence d'un anticorps anti-CD3 et d'une chimère CTLA4-Ig qui permet de bloquer l'interaction CD28/CD80-86. Les lymphocytes T CD4⁺ prolifèrent en réponse à cette première stimulation mais ne prolifèrent pas en réponse à une deuxième stimulation par des cellules présentatrices d'antigène irradiées en présence d'anticorps anti-CD3 ³⁰³.

III.2.B.b Stimulation sub-optimale du TCR

Par la suite d'autres types de modèles ont été développés, basés non pas sur une stimulation du TCR sans co-stimulation mais plutôt sur une stimulation sub-optimale du TCR en présence de co-stimulation.

L'un de ces modèles repose sur la présentation par des cellules présentatrices d'antigènes de peptides antigéniques dont l'un des acides aminés, situé au niveau de leur épitope, a été muté³⁰⁴⁻³⁰⁷. Cette mutation entraîne une diminution de l'affinité du TCR pour le complexe CMH-peptide muté, résultant en une stimulation du TCR de plus courte durée. Dans ce modèle, on observe une perte de la réponse proliférative et de la sécrétion d'IL-2 en réponse à une deuxième stimulation par le peptide non muté. Néanmoins les mécanismes impliqués semblent différer des modèles décrits dans le paragraphe précédent : ils n'impliquent pas l'activation de Zap-70 mais impliquent une diminution de la phosphorylation des chaînes ϵ et ζ du CD3, indiquant une altération très précoce de la signalisation du TCR³⁰⁷.

III.2.B.c Activation en présence d'IL-10

Groux *et al.* ont développé deux modèles d'anergie reposant sur l'activation de lymphocytes T CD4⁺ en présence d'IL-10³⁰⁸. Dans le premier modèle des lymphocytes T CD4⁺ sont incubés pendant 10 jours en présence d'IL-10 et de monocytes irradiés, leur réactivité est ensuite testée en réponse à une stimulation par des PBMC irradiés. Les lymphocytes T CD4⁺ obtenus ne prolifèrent pas en réponse à une nouvelle stimulation par les monocytes issus du même donneur que ceux utilisés lors de l'induction de l'anergie. Ils présentent en revanche une réponse proliférative normale lors de la stimulation par des PBMC issus d'un troisième donneur. Cette anergie est donc oligoclonale.

Dans le deuxième modèle, les lymphocytes T CD4⁺ sont incubés pendant 10 jours en présence d'IL-10 et d'anticorps anti-CD3 fixés sur plaque. L'anergie lymphocytaire est ensuite évaluée en réponse à une stimulation par des anticorps anti-CD3 fixés sur plaque ou à un cocktail d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28 solubles. Lors de la seconde

stimulation on observe une réponse proliférative fortement ou totalement inhibée, associée à une diminution de la production de nombreuses cytokines : IL-2, IFN γ , mais aussi IL-10, TNF α , IL-5 ou GM-CSF. Les expressions de CD3 et de CD28 augmentent lors de la deuxième stimulation, traduisant une réactivité non complètement abolie chez les cellules anergiques.

III.2.B.d Modulation de la voie CaN/NFAT

Il est également possible d'induire un état anergique des lymphocytes T en augmentant artificiellement le taux de calcium intracellulaire, ce qui active la voie CaN/NFAT et induit donc l'expression de gènes liés à l'établissement et la maintenance de l'anergie comme décrit précédemment. Pour ce faire, on peut incuber des lymphocytes T en présence d'ionomycine, un ionophore qui facilite l'entrée du calcium dans la cellule³⁰⁹⁻³¹¹. Dans ce modèle on observe une diminution de la prolifération des lymphocytes T CD4⁺³¹⁰ associée à une diminution très importante de la transcription et de la sécrétion d'IL-2³¹¹ en réponse à une stimulation par un cocktail d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28.

III.2.C - Pertinence vis-à-vis de la modélisation des ALIS

L'altération de la réponse proliférative et de la production d'IL-2 en réponse à une activation de la signalisation associée au TCR sont deux caractéristiques communes à l'anergie telle que définie dans cette revue et aux ALIS. De plus on observe lors des syndromes septiques une altération de l'expression des molécules de co-stimulation des cellules présentatrices d'antigènes, il est donc probable que les modèles mettant en jeu une activation du TCR en l'absence de co-stimulation récapitulent une partie des mécanismes impliqués dans l'induction des ALIS. Cependant lors des syndromes septiques on observe une diminution de la prolifération et de la production de cytokines en réponse à une stimulation par des antigènes de rappel mais aussi par des mitogènes, ce qui implique que cette anergie n'est pas spécifique d'un antigène donné. Les modèles

d'anergie clonale, dans lesquels l'anergie n'est observée qu'en réponse à certains antigènes, ne sont donc pas pertinents.

De plus les lymphocytes T de patients septiques sont anergiques en réponse à une stimulation mitogénique (PHA, PMA+ionomycine)^{85,254,255} alors que dans la plupart des modèles décrits précédemment une stimulation PMA+ionomycine restaure la réponse proliférative et la production de cytokines à des niveaux similaires aux lymphocytes non anergiques.

Enfin, à l'exception du modèle d'anergie clonale décrit par Otten *et al*, l'ensemble des modèles décrits dans cette revue ont été uniquement évalués sur des populations de lymphocytes T CD4⁺, ce qui ne permet pas de s'avancer quant à leur application sur des populations de lymphocytes T CD8⁺. Groux *et al*. ont même montré dans des travaux ultérieurs que l'activation de lymphocytes T CD8⁺ par des anticorps anti-CD3 fixés sur plaque en présence d'IL-10 (deuxième modèle décrit paragraphe III.2.B.c) n'avait pas d'effet sur la réactivité de ces lymphocytes³¹².

Or, lors des syndromes septiques des altérations ont été mises en évidence chez chacune de ces populations^{85,243,257}.

III.3 - Mécanismes et modélisation de l'épuisement lymphocytaire T

III.3.A - Mécanismes

Plusieurs études ont mis en évidence un rôle majeur de PD-1 dans l'épuisement de lymphocytes T CD8⁺³¹³⁻³¹⁶. Youngblood *et al*. ont montré que la stimulation antigénique chronique des lymphocytes T CD8⁺ induisait des modifications épigénétiques au niveau du locus de *Pdcd1*, entraînant une expression élevée et persistante de PD-1 à la surface des lymphocytes T CD8⁺ spécifique du virus^{317,318}.

D'un point de vue mécanistique, la signalisation activée par l'interaction de PD-1 avec PD-L1 peut soit réprimer directement la signalisation induite lors de l'activation du TCR³¹⁹, soit induire l'expression de gènes inhibant l'activation des lymphocytes T, comme *BATF*³²⁰.

Bien que PD-1 ait un rôle prépondérant, les autres récepteurs de co-inhibition exprimés par les lymphocytes T CD8⁺ épuisés, dont LAG-3, 2B4 et TIM3, participent aussi à l'établissement de cet état, de manière synergique, en activant des voies de signalisation partiellement redondantes ²⁸⁶, comme décrit dans la Figure 17. L'activation de ces récepteurs conduit notamment à la sécrétion d'IL-10 et de TGFβ qui activent des cellules immunosuppressives, comme les lymphocytes T régulateurs ou les cellules myéloïdes suppressives, et stimulent la production des interférons de type I (IFNα et IFNβ) ³²¹⁻³²³.

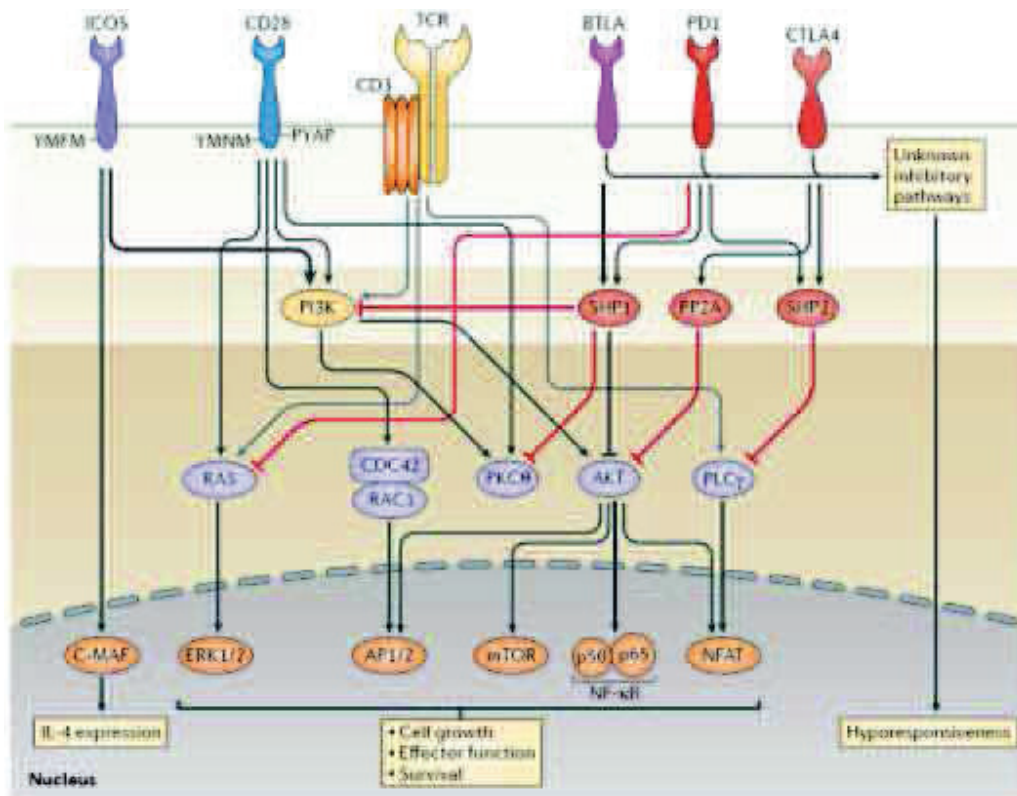


Figure 17 Récepteurs de co-inhibition et signalisation associée, d'après Chen & Flies, Nature, 2013

Divers facteurs déterminent l'étendue de l'épuisement des lymphocytes T CD8⁺ : la charge virale, la durée de l'infection et la diminution ou la perte de signaux pro-inflammatoires provenant des lymphocytes T CD4⁺ ^{285,286,324}. Plusieurs études portant sur des transferts de lymphocytes T CD8⁺ épuisés dans des souris non infectées ont montré que l'épuisement observé était maintenu même en l'absence de la stimulation antigénique l'ayant déclenché, laissant penser à une reprogrammation lymphocytaire plutôt qu'à une simple perte de fonctionnalité.

Il est à noter que, l'apparition tardive de virus mutants, qui laisse supposer la maintenance d'une pression de sélection par les lymphocytes T CD8⁺ ^{325,326}, et l'augmentation du nombre de lymphocytes T CD8⁺ HIV-spécifiques lors de l'arrêt des traitements antirétroviraux ^{327,328}, laissent penser que l'épuisement des lymphocytes T CD8⁺ est un état réversible.

Concernant le contexte clinique des cancers, certains lymphocytes T CD8⁺ présents dans l'environnement tumoral présentent des caractéristiques d'épuisement : diminution de la production de cytokines, augmentation de l'expression de PD-1, LAG-3, 2B4, TIM3, CTLA4, signalisation intracellulaire similaire à celles observées chez les lymphocytes T CD8⁺ épuisés dans le contexte des infections virales chroniques ³²⁹⁻³³⁴. De plus, une analyse génomique menée par Baitsch *et al.* a mis en évidence des similarités entre les profils de lymphocytes T CD8⁺ infiltrés au sein de métastases de patients ayant développé un mélanome et les profils de lymphocytes T CD8⁺ issus de souris infectées par une souche LCMV donnant une forme chronique d'infection ³³⁰.

Il est à noter que les lymphocytes T CD8⁺PD1^{high} observés dans le contexte des cancers présentent une activité cytotoxique égale ou supérieure à leurs homologues CD8⁺PD1^{low} ³³⁰, et qu'il existe une corrélation positive entre la présence de lymphocytes T CD8⁺PD1^{high} infiltrés dans les tumeurs et un pronostic favorable ³³⁵⁻³³⁷, ce qui indiquerait un rôle protecteur des lymphocytes T CD8⁺PD1^{high} dans ces contextes.

Confirmant l'importance de l'augmentation de l'expression des récepteurs de co-inhibition, de nombreuses études sur des modèles animaux ont montré que le blocage de ces récepteurs, seuls ou en combinaison, permettait de restaurer l'immunité

antivirale ou anti-tumorale ^{333,334,338-340}. Plusieurs essais cliniques ont donné des résultats prometteurs, qu'ils concernent des anticorps bloquant CTLA-4 ^{341,342} ou bloquant PD-1 ³⁴³⁻³⁴⁵. Un anticorps monoclonal bloquant CTLA4, l'Ipilumab, a obtenu une autorisation de mise sur le marché pour le traitement du mélanome ³⁴⁶.

III.3.B - Modélisation

A notre connaissance il n'existe pas à proprement parler de modèle *ex-vivo* d'épuisement lymphocytaire.

Concernant les infections chroniques, le modèle le plus couramment utilisé est le modèle murin d'infection par le LCMV ³⁴⁷. Ce modèle est particulièrement intéressant car il existe plusieurs souches de LCMV menant à des évolutions différentes de l'infection. La souche Armstrong est une souche donnant une infection aiguë alors que la souche Clone 13 donne, elle, une infection chronique. La possibilité de comparer les lymphocytes T issus de souris infectées avec l'une ou l'autre des souches permet de différencier les caractères relevant d'une réponse classique de ceux relevant de l'épuisement lymphocytaire. De nombreux modèles animaux ont été développés pour modéliser d'autres infections dont notamment des modèles l'hépatite B, des modèles VIH (utilisant des souris humanisées), ou encore des modèles du tuberculose ou de malaria ³⁴⁸⁻³⁵². Il existe aussi quelques études menées sur des prélèvements de patients atteints de ces infections chroniques ^{353,354}.

L'épuisement induit par la stimulation chronique des cellules tumorales est lui étudié soit à travers des modèles animaux, principalement murins et couvrant la plupart des cancers (mélanome, carcinome tête et cou, leucémie myéloïde chronique, cancer ovarien, cancer du poumon, ...) ³⁵⁵⁻³⁵⁹, soit directement à partir de biopsies de patients atteints de cancer ³⁶⁰⁻³⁶³.

Dans les deux cas, on note que les lymphocytes T CD8⁺, acteurs principaux de la réponse antivirale ou anti-tumorale, constituent la population d'intérêt et que peu d'informations sont disponibles concernant le devenir des lymphocytes T CD4⁺ dans ces contextes.

III.3.C - Pertinence des modèles d'épuisement lymphocytaire vis-à-vis des ALIS

La diminution de la capacité d'expansion, la diminution de production d'IL-2 et d'IFN γ , l'augmentation de l'expression de PD-1 et CTLA-4, et le caractère progressif de l'établissement de ces changements sont des caractéristiques communes à l'épuisement et aux ALIS. On peut donc supposer que des mécanismes communs régissent ces deux états lymphocytaires.

Néanmoins l'épuisement des lymphocytes T est décrit très majoritairement chez les lymphocytes T CD8⁺, et rien ne permet de supposer que ces résultats puissent être étendus aux lymphocytes T CD4⁺. Or comme nous l'avons signalé précédemment, lors des syndromes septiques l'ensemble des lymphocytes T CD4⁺ et lymphocytes T CD8⁺ présentent des caractéristiques d'anergie.

De plus les échelles de temps sont extrêmement différentes : lors des syndromes septiques les lymphocytes T anergiques sont observés dès les premiers jours, voir les premières heures du syndrome, alors que les lymphocytes T épuisés ne sont observés, au mieux, que plusieurs semaines, voire plusieurs mois après le début de l'infection ou du développement de la tumeur.

A ce jour aucun des modèles d'anergie ou d'épuisement précédemment décrits ne récapitule l'ensemble des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des ALIS, comme mis en relief dans le Tableau 3.

Néanmoins il est probable que les mécanismes mis en jeu dans ces états lymphocytaires soient retrouvés, en partie, dans l'induction des ALIS.

Ces modèles pourraient donc servir de base à la construction d'un modèle d'induction des ALIS, et la connaissance des mécanismes associés à l'anergie et l'épuisement permettra d'orienter l'étude des mécanismes associés aux ALIS.

	Anergie					Epuisement	ALIS
	Absence co-stimulation (1)	Absence co-stimulation (2)	Stimulation sub-optimale	IL-10	Modulation voie CaN/NFAT		
Induction	Stimulation par complexe CMH-II/antigène	Stimulation par anticorps anti-CD3	Stimulation par peptides mutés e moindre affinité	Stimulation par anti-CD3+ IL-10	ionomycine	Exposition chronique à des cellules présentant des peptides antigéniques	?
Altération en réponse à	Stimulation par le même antigène + APC irradiées	Antigène ou ConA + APC	Stimulation par peptide non muté	Stimulation par anticorps anti-CD3+anti-CD28	Stimulation par anticorps anti-CD3+anti-CD28	Stimulation par les peptides antigéniques du virus/de la tumeur	Lectines (PHA, ConA), anti-CD3+anti-CD28,
Reponse proliférative	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Fonctionnalité							
Production IL-2	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Production autres cytokines	Non	IFNy, IL-4	?	IFNy, IL-10, TNFα, IL-5, GM-CSF	?	IFNy	IFNy
Phénotype							
Expression CD3, CD28	Diminuée (CD3)	?	?	Augmentation CD3 et CD28	?	?	diminuée
Expression CTLA-4, PD-1	?	?	?	?	?	augmentée	augmentée
Sous-population lymphocytaire affectée	CD4 et CD8, clonaux	CD4	CD4 clonaux	CD4	CD4	CD8 oligoclonaux	CD4 et CD8
Echelle de temps	Jours	Jours	Jours	Jours	Jours	Semaines/Mois	Jours

Tableau 3 Comparaison des principales caractéristiques de l'anergie de l'épuisement, et des ALIS

IV - CONCLUSION

Malgré une amélioration constante de la prise en charge thérapeutique des patients, les syndromes septiques restent associés à une mortalité encore bien trop élevée. Ils touchent chaque année des millions de patients à travers le monde et représentent un coût financier élevé pour la société.

La physiopathologie de ces syndromes repose sur l'interaction de systèmes complexes, au cœur desquels le système immunitaire joue un rôle déterminant. En effet les patients septiques développent une phase hyper-inflammatoire qui peut être délétère, en conduisant à des défaillances d'organes, à un état de choc et à des décès qualifiés de précoces. En parallèle de cette hyper-inflammation, des mécanismes de régulation négative se mettent en place et peuvent conduire à une immunodépression systémique, associée à la survenue d'infections secondaires, à des réactivations virales et à des décès plus tardifs. Cette immunodépression se traduit par une diminution importante du nombre de cellules immunitaires circulantes et des altérations fonctionnelles et phénotypiques touchant les cellules de la réponse innée comme celles de la réponse adaptative.

En particulier les lymphocytes T présentent des altérations lymphocytaires induites par le sepsis (ALIS) qui se caractérisent par (i) une diminution de la prolifération, (ii) une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-2, IFN γ) et une augmentation de la production de cytokines anti-inflammatoires, (iii) une diminution de l'expression des récepteurs d'activation et de co-stimulation (CD3, CD28) et une augmentation de l'expression des récepteurs inhibiteurs (CTLA-4, PD-1), (iv) une diminution de la diversité du répertoire des TCR. La durée et l'intensité des ALIS sont associées à la gravité du syndrome, à un risque de développement d'infections secondaires plus élevé et à une mortalité plus importante. L'ALIS pourrait constituer une cible thérapeutique de choix.

Néanmoins pour pouvoir développer des thérapies immunoajuvantes ciblant ces ALIS, il est crucial de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques impliqués et de disposer d'outils permettant de caractériser ces altérations. Or dans la mesure où les

tests fonctionnels actuels requièrent une quantité importante de cellules, la lymphopénie des patients septiques rend l'étude clinique particulièrement difficile. La modélisation des ALIS permettrait d'avoir un outil d'exploration permettant l'atteinte de ces deux objectifs. A ce jour il n'existe pas de modèle d'induction des ALIS. Néanmoins le développement d'un tel modèle pourrait s'appuyer sur les modèles d'anergie et d'épuisement, deux états lymphocytaires partageant plusieurs caractéristiques fonctionnelles et phénotypiques proches des ALIS.

Les travaux présentés ici visent à l'amélioration de la compréhension des mécanismes mis en jeu lors du développement des ALIS à travers le développement d'un modèle *ex-vivo* récapitulant les caractéristiques principales de ces altérations, et reposant sur des outils de caractérisation améliorés.

TRAVAIL PERSONNEL

I - Présentation du projet de thèse

L'importante mortalité associée aux syndromes septiques pousse la communauté scientifique à chercher à mettre en place de nouvelles stratégies thérapeutiques. Il existe une association entre l'intensité et la durée de l'immunodépression observée chez les patients septiques d'une part, et, la gravité du syndrome, une augmentation de la survenue d'infections secondaires et une mortalité plus élevée d'autre part. Ce constat a orienté les travaux de recherche vers le développement de thérapies immuno-adjuvantes. En particulier, le rôle central des lymphocytes T dans la réponse immunitaire suggère que les ALIS pourraient constituer une cible thérapeutique intéressante. Cependant il n'existe pas d'outil permettant sa caractérisation en routine clinique et les mécanismes impliqués dans les ALIS sont encore mal connus à ce jour. Notre travail vise à développer des outils de caractérisation des ALIS, et à améliorer la compréhension des mécanismes physiopathologiques à l'œuvre dans l'établissement des ALIS.

Nous présentons successivement trois articles relatifs à la réalisation de ce projet, portant sur :

- l'optimisation et la caractérisation d'une nouvelle technique d'évaluation de la réponse proliférative des lymphocytes T à une stimulation *ex-vivo*, en cytométrie en flux
- l'étude de l'effet, sur les lymphocytes T, de la préincubation des PBMC en présence de LPS, simulant une infection bactérienne gram négatif
- l'étude de l'effet, sur les lymphocytes T, de la préincubation des PBMC en présence d'IL-10, cytokine immuno-régulatrice présentant des taux plasmatiques élevés chez les patients septiques.

II - Flow cytometric evaluation of lymphocyte transformation test based on 5-ethynyl-2'deoxyuridine incorporation as a clinical alternative to tritiated thymidine uptake measurement

II.1 - Contexte

L'évaluation de la réponse lymphocytaire est un outil d'importance dans divers contextes cliniques comme le diagnostic des immunodéficiences primaires, le suivi du statut immunitaire des patients après une greffe de moelle-osseuse ou encore l'identification de certaines hypersensibilités retardées (au béryllium notamment). Le test de référence repose sur l'incorporation de thymidine tritiée au sein de l'ADN au cours de sa réplication. Ce test présente une forte sensibilité et une bonne reproductibilité, néanmoins il présente des défauts importants : nécessité de manipuler de la radioactivité, coût de traitement des déchets élevés, pénibilité. De nouvelles techniques de détection de la prolifération lymphocytaire ont été développées, notamment en cytométrie en flux, et pourraient offrir une alternative intéressante au test en thymidine tritiée. En particulier un nouveau test repose sur l'incorporation de 5-éthynyl-2'deoxyuridine (EdU) au sein de l'ADN au cours de sa réplication, suivie du couplage d'une sonde fluorescente à l'EdU et de la détection des cellules prolifératives par cytométrie en flux

II.2 - Description de l'étude

Le but de cette étude était d'optimiser le protocole expérimental du test EdU, notamment pour une utilisation en routine clinique, d'évaluer ses performances analytiques (sensibilité, reproductibilité), et de comparer les résultats obtenus avec ce test ou avec le test de référence sur des échantillons de volontaires sains et sur des échantillons cliniques.

II.3 - Conclusion

Le test EdU présente de bonnes performances analytiques ainsi qu'une forte corrélation avec le test de référence en thymidine tritiée. De plus il est utilisable en routine clinique. Il constitue donc une alternative intéressante pour la mesure de la réponse proliférative des lymphocytes T en recherche comme en clinique.



Technical note

Flow cytometric evaluation of lymphocyte transformation test based on 5-ethynyl-2'-deoxyuridine incorporation as a clinical alternative to tritiated thymidine uptake measurement



Fanny Poujol^a, Guillaume Monneret^{a,b}, Arnaud Friggeri^c, Thomas Rimmelé^d, Christophe Malcus^b, Françoise Poitevin-Later^b, Alexandre Pachot^a, Alain Lepape^c, Julien Textoris^{a,d}, Fabienne Venet^{a,b,*}

^a BioMérieux, Joint Research Unit, bioMérieux-Hospices Civils de Lyon, Hôpital Edouard Herriot, Lyon, France

^b Cellular Immunology Laboratory, Hôpital Edouard Herriot, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

^c Intensive Care Units, Centre Hospitalier Lyon-Sud, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

^d Intensive Care Units, Hôpital Edouard Herriot, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 September 2014

Received in revised form 16 October 2014

Accepted 17 October 2014

Available online 28 October 2014

Keywords:

Lymphocyte

Proliferation

EdU

[³H]-Thymidine

Flow cytometry

ABSTRACT

In clinical laboratories, the evaluation of lymphocyte proliferative response (lymphocyte transformation test—LTT) is routinely performed by the measurement of [³H]-thymidine uptake after stimulation. In this study we evaluated the performances of a recently developed non-radioactive test based on the detection by flow cytometry of 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) incorporation for the measurement of LTT in routine lab conditions. After definition of optimal protocol parameters, EdU incorporation test showed good repeatability and reproducibility. Moreover, this assay was flexible enough to fit important clinical laboratory constraints (delayed stimulation, low number of cells and delayed analysis after staining). Importantly, correlations between results obtained with EdU and [³H]-thymidine incorporation assays were excellent both in healthy volunteers and pediatric and septic patients. In particular, the two techniques identified patients presenting with altered LTT. Upon confirmation in a larger cohort of patients, EdU incorporation assay may be a relevant non-radioactive candidate for LTT in clinic.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

Abbreviations: AF-488, alexa fluor® 488; APC, allophycocyanin; BrdU, 5-bromo-2'-deoxyuridin; ConA, concanavalin A; CV, coefficient of variation; CFSE, carboxyfluorescein succinimidyl ester; cpm, count per minute; EdU, 5-ethynyl-2'-deoxyuridine; LTT, lymphocyte transformation test; OKT3, anti-CD3 OKT3 clone antibody; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; PHA, phytohemagglutinin.

* Corresponding author at: Cellular Immunology Laboratory, Hôpital E. Herriot, Hospices Civils de Lyon, Pavillon E-5 place d'Arsonval, 69437 Lyon Cedex 03, France. Tel.: +33 4 72 11 95 46.

E-mail addresses: fanny.poujol@biomerieux.com (F. Poujol), guillaume.monneret@chu-lyon.fr (G. Monneret), arnaud.friggeri@chu-lyon.fr (A. Friggeri), thomas.rimmele@chu-lyon.fr (T. Rimmelé), christophe.malcus@chu-lyon.fr (C. Malcus), francoise.poitevin@chu-lyon.fr (F. Poitevin-Later), alexandre.pachot@biomerieux.com (A. Pachot), alain.lepape@chu-lyon.fr (A. Lepape), julien.textoris@biomerieux.com (J. Textoris), fabienne.venet@chu-lyon.fr (F. Venet).

1. Introduction

Beyond its interest in research, the evaluation of lymphocyte proliferative response to mitogens and recall antigens (usually known as lymphocyte transformation test, LTT) remains important in many clinical contexts. In particular, assessing lymphocyte functionality is routinely performed in the diagnosis of primary immunodeficiencies, in the follow-up of immune functions recovery after bone marrow transplantation and in the diagnosis of certain delayed type hypersensitivities (e.g., hypersensitivity to beryllium) (Lindegren, 2004; de Vries, 2012; Barna et al., 2003).

The most widely used assay in clinic labs relies on detection of [³H]-thymidine incorporation into DNA during cell replication. Due to its good sensibility and reproducibility, the [³H]-thymidine incorporation assay is considered as the

gold standard for cell proliferation measurement in clinic (Rew & Wilson, 2000; Bading & Shields, 2008) and is recommended by experts for the diagnosis of lymphocyte proliferation defects (Lindegren, 2004; de Vries, 2012). However, [³H]-thymidine is a radioactive base detected by scintillation measurement. Consequently, measuring its incorporation is a toxic, cumbersome, and expensive assay. As in many countries, French medical authorities aim to reduce radioactivity use in hospital labs. There is thus a crucial need for its replacement by a less cumbersome and toxic assay.

Few years ago a new DNA base analog (5-ethynyl-2'-deoxyuridine—EdU) has been developed (Buck et al., 2008). Similarly to [³H]-thymidine, it is incorporated into replicating DNA. However, as it can be linked to a fluorescent dye, its incorporation into cells can be detected by flow cytometry. This test could therefore represent a non-radioactive alternative to [³H]-thymidine assay in routine immunology labs.

Up to date, only few studies evaluated EdU flow cytometric incorporation assay for LTT, and the majority was performed for research purpose only (cell line, animal models...) (Yu et al., 2009; Sun et al., 2012). The goal of this study was therefore to evaluate EdU incorporation assay performances for the measurement of LTT in routine lab conditions and to compare its results with [³H]-thymidine incorporation measurement in clinical samples.

2. Material and method

2.1. Patients and healthy donors

Heparinized peripheral blood was obtained from healthy volunteers from the Etablissement Français du Sang (Lyon, France) ($n = 48$), from septic shock patients 3 to 4 days after septic shock onset ($n = 8$), and from patients with T cell disorder suspicion (out of routine work from the immunology lab, $n = 3$). According to Etablissement Français du Sang, standardized procedures for blood donation, informed consent was obtained from healthy volunteers and personal data for blood donors were anonymized at time of blood donation and before blood transfer to our research lab. To note, Bacillus Calmette–Guérin (BCG) immunization has been mandatory in France till 2007, all adult healthy volunteers are thus immunized against BCG. Septic patients belong to a global study on intensive care unit (ICU)-induced immune dysfunctions approved by our Institutional Review Board for ethics (“Comité de Protection des Personnes”) and registered at Ministère Français de la Recherche et de l'Enseignement (#DC-2008-509).

2.2. Cell culture

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained by Ficoll gradient centrifugation and diluted to a concentration of 1×10^6 cells/mL in complete medium: RPMI 1640 (Eurobio, Montpellier, France) supplemented with 10% SAB (AB human serum, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 2 mM L-Glutamine (Eurobio, Montpellier, France), 2 µg/mL Fungizone (Gibco, Life technologies, Carlsbad, CA, USA), 20 U/mL penicillin and 20 µg/mL streptomycin (Peni 10 000 UI/Strepto 10 000 ug, Eurobio, Montpellier, France). For each culture condition, triplicates were performed. PBMC were seeded in 200 µL of

complete medium in 96-wells plates, with or without stimulants at different concentrations, for 48 h to 120 h at 37 °C in humidified 5% CO₂ atmosphere. Because of the low number of cells available, this protocol was adapted for patients' PBMC testing. In particular, cell cultures were performed in either duplicate or triplicate, and PBMC were seeded in 100 µL of complete medium, other parameters being constant.

Different stimuli were tested: anti-CD2/CD3/CD8 antibodies coated beads (T cell activation/expansion kit, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), phytohemagglutinin (PHA, Oxoid Limited, Basingstoke, UK), concanavalin A (ConA, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), pokeweed mitogen (PWM, lectin from *Phytolacca americana*, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), phorbol 12-miristate 13-acetate (PMA, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), anti-CD3 antibody (OKT3 clone, Tonbo biosciences, San Diego, CA, USA), and tuberculin (Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark).

2.3. [³H]-Thymidine proliferation assay

Ten µCi/mL [³H]-Thymidine (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) was added 24 h before harvesting cells on fiberglass filters by means of an automated cell harvester (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Incorporated radioactivity was measured as counts per minute (cpm) in a scintillation beta counter (PerkinElmer, Waltham, MA, USA).

2.4. EdU labeling and flow cytometry

After cell stimulation, EdU diluted in cell media was added to PBMC and incubated from 2 h to 14 h at 37 °C in humidified 5% CO₂ atmosphere.

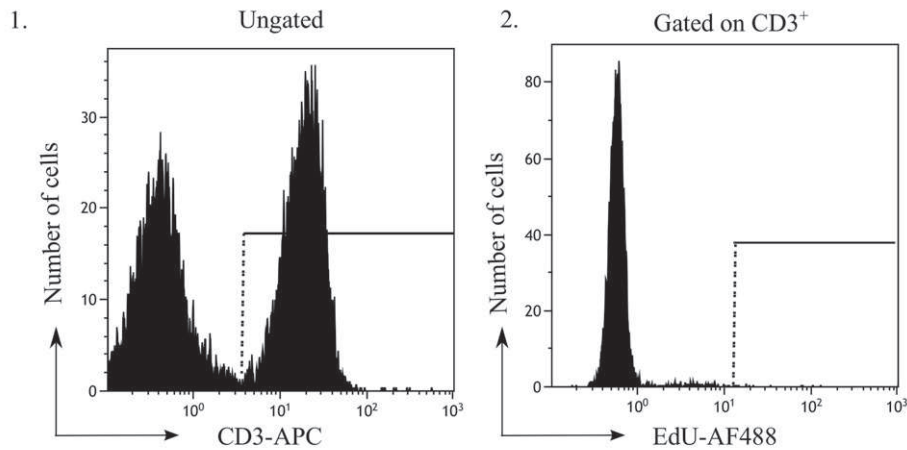
Cells were then stained with allophycocyanin (APC)-labeled anti-CD3 monoclonal antibody (Beckman Coulter, Brea, CA, USA), fixed and EdU was activated according to the manufacturer's instructions, with modifications according to protocol optimization performed in this study. In particular, for reaction volume optimization, cells were incubated with either 500 µL, 250 µL or 100 µL of “Click-iT® reaction cocktail” (containing Alexa Fluor® 488 azide, component A Click-iT EdU flow cytometry kit, Life technologies, Carlsbad, CA, USA). For fixative solution evaluation, cells were fixed with 100 µL of either the manufacturer's kit fixative or alternative IOTest®3 fixative solution (Beckman Coulter, Brea, CA, USA).

Flow cytometry analyses were performed on a Navios flow cytometer (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). CD3⁺ cells were first selected among total events based on a monoparametric CD3-APC histogram (Fig. 1A1–B1). Then the percentage of EdU⁺ cells among CD3⁺ cells, along with the geometric means of fluorescence intensity (MFI) of EdU-AF488 in this population, were measured on a monoparametric histogram as shown in Fig. 1A2–B2. For every experiment, a minimum of 5×10^3 CD3⁺ cells was recorded. Data were analyzed using Kaluza software (version 1.2, Beckman Coulter, Brea, CA, USA).

2.5. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism (version 5.03, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) software. Correlations were evaluated according to Spearman

A) Non stimulated cells



B) PHA-stimulated cells

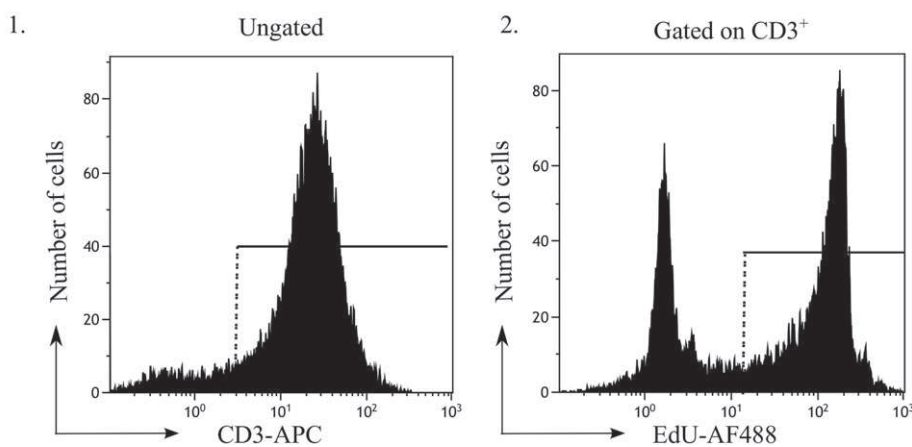


Fig. 1. Flow cytometry gating strategy. Results from one representative experiment are shown. Peripheral blood mononuclear cells were either non-stimulated (A) or stimulated with 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ phytohemagglutinin (PHA) for 72 h (B), before incubation with 10 μM EdU for 2 h. CD3⁺ cells were first selected (A1–B1) out of total acquired events. The percentages of EdU⁺ cells were then determined among gated CD3⁺ cells (A2–B2).

or Pearson correlation calculation methods. A p value <0.05 was considered as statistically significant.

3. Results

3.1. Protocol optimization

Before evaluating the assay performances; optimal protocol for EdU labeling had to be set up.

First, we determined optimal EdU incorporation concentrations. While the manufacturer's recommendations were to incubate cells with 10 μM EdU, we tested several lower (5, 2, 1, 0.5 μM) and higher (50, 100 μM) concentrations. When decreasing concentrations below 10 μM , we observed a rapid decrease in the percentage of proliferating cells and EdU MFI (Fig. 2). Moreover, at these low concentrations, poorer discrimination between proliferating and non-proliferating CD3⁺ T cells was apparent (Fig. 2C). When increasing concentrations, we did not observe any significant improvement in percentages or MFI

of proliferating cells (Supplementary Fig. 1). Therefore we chose 10 μM as the EdU concentration used in our protocol.

Regarding cell incubation length with EdU, the manufacturer's recommendations were to use 2 h of cell contact with EdU before cell staining. Nonetheless, we wondered whether, by increasing this duration, we would be able to better detect cell proliferation. After 2 h, 6 h or 14 h incubation with EdU (Fig. 3), we noticed that proliferating T cell percentage increased as EdU incubation length increased. However, this was associated with the erratic apparition of a non-specific fluorescence peak (data not shown). Moreover as the percentage of labeled cells was already significant after 2 h incubation (more than 60% of the CD3⁺ T cells), we decided to keep 2 h of EdU incorporation in our protocol.

Regarding stimulation length, either 48 h or 72 h cell incubation with stimulants was tested. We observed a higher percentage of proliferative T cells after 72 h of stimulation as compared with 48 h (Supplementary Fig. 1). Longer stimulations (96 h) led to a strong decrease in T cell proliferative response (data not shown). Therefore, in further experiments, cells were stimulated during 72 h before EdU incorporation measurement.

We then evaluated the possibility of increasing the number of stainings per kit. The fixative solution and the reaction cocktail are limiting components of the kit provided

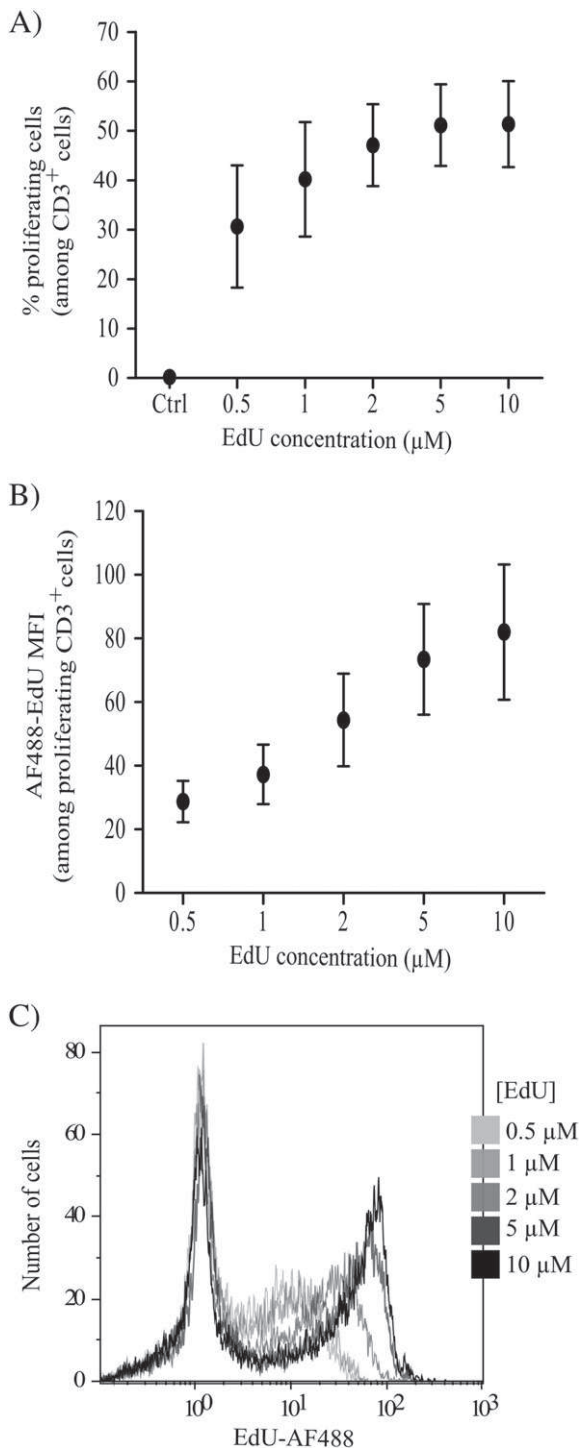


Fig. 2. Decreasing EdU concentration. Peripheral blood mononuclear cells were stimulated with 4 μg/mL phytohemagglutinin for 72 h and incubated with increasing concentrations of EdU for 2 h ($n = 4$ donors). (A)—Percentages of EdU + cells among CD3⁺ cells. (B)—EdU means of fluorescence intensity (MFI) in proliferating CD3⁺ cells. Results are presented as means \pm standard deviations. C—One representative overlay for EdU-AF488 MFI.

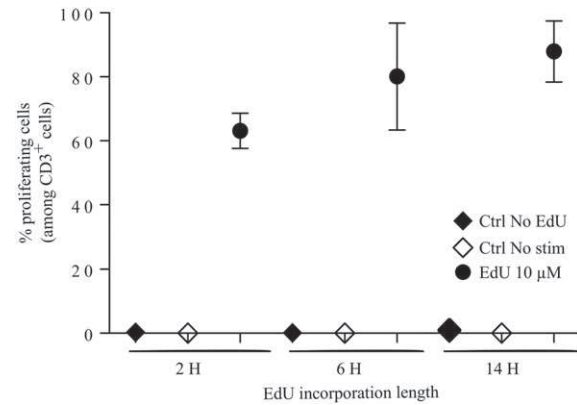


Fig. 3. Increasing incubation length with EdU. Peripheral blood mononuclear cells were stimulated for 72 h with anti-CD2/CD3/CD28 antibodies coated beads and incubated for 2 to 14 h with 10 μM EdU ($n = 5$ donors). Controls were unstimulated cells incubated with 100 μM EdU (open diamonds), stimulated cells incubated without EdU (black diamonds). Results are presented as percentages of CD3⁺EdU⁺ cells among T cells (means \pm standard deviations).

by the manufacturer. First, we tested in similar stimulation conditions an alternative fixative solution containing formaldehyde. Results are presented in Supplementary Fig. 2A–B. We observed that the change of fixative solution did not modify percentages or EdU-AF488 MFI of proliferating T cells. Therefore, in further experiments, we used this alternative fixative reagent instead of the kit's fixative solution. Regarding reaction cocktail volume, while the manufacturer's recommendations were to use 500 μL of this solution; we first tested the reduction to a lower volume of 250 μL per tube, then, in a second set of experiments, of 100 μL per tube. We did not observe any difference regarding percentages of proliferating cells or EdU-AF488 MFI when using 500 μL or 250 μL reaction cocktail (data not shown). However, while the percentages of proliferating lymphocytes were overall not affected, the reduction of this volume to 100 μL was associated with a significant reduction of EdU-AF488 MFI in proliferating cells. This led to a lower resolution between proliferating and non-proliferating T cells (Supplementary Fig. 2C–D). Therefore in further experiments, a volume of 250 μL reaction cocktail was systematically used.

Thus our final optimal protocol for cell stimulation and EdU staining was defined. After 72 h stimulation with mitogens, PBMC were incubated with 10 μM EdU for 2 h, labeled with APC-labeled anti-CD3 antibodies, fixed with alternative fixative solution, permeabilized and incubated with 250 μL of reaction cocktail, before being analyzed on flow cytometer.

3.2. Repeatability and reproducibility

Using this protocol, we next designed an experiment to assess both repeatability and reproducibility. Briefly, as shown in Fig. 4A, responses to PHA and OKT3 stimulations were compared between 3 different experiments. After PBMC purification and an overnight cell seeding, cell stimulations were either started on Day 1 or on Day 2 (after one additional day in cell media at 37 °C, 5% CO₂). On Day 4, EdU protocol was either performed at T0 or at T0 + 4 h. Moreover, each condition was performed with 4 to 5 technical replicates and

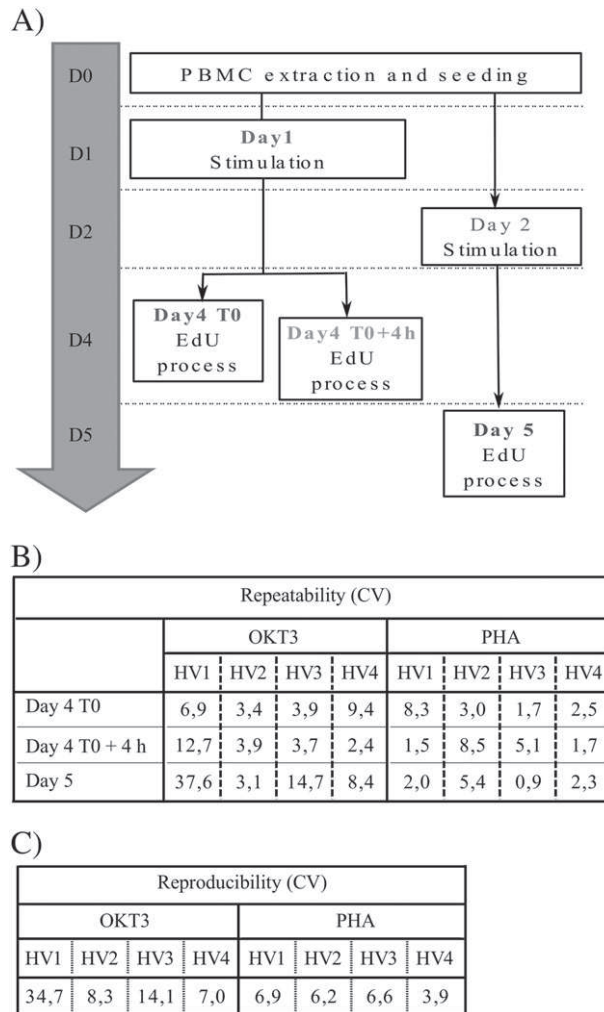


Fig. 4. Evaluation of repeatability and reproducibility. (A) After cell purification, stimulations (PHA or anti-CD3 OKT3 antibody) started on Day 1 or Day 2 (one additional seeding day). On Day 4, EdU protocol was performed at T0 or T0 + 4 h. Five replicates were performed for each condition ($n = 4$ healthy volunteers—HV1 to HV4) (B) Coefficient of variations (CV) for intra-replicate repeatability. C. CV for intra-experiments reproducibility.

on 4 healthy volunteers. For repeatability experiments (intra-replicates variations), coefficients of variation (CV) were <15% for OKT3 (except for one outlier) and <9% for PHA stimulations (Fig. 4B). Reproducibility CV (intra-experiments variations) were excellent for both OKT3 and PHA stimulations (respectively <14%—except for one outlier—and <7%, Fig. 4C). Moreover, beyond the good quality of the technique, these results further show that cell stimulation can be delayed by at least a day after cell purification without any alteration of the proliferative response.

3.3. Cell staining stability

To address clinical laboratories time constraints (such as non-working days or flow cytometer availability) we evaluated the stability of EdU cell staining after 3 or 7 days of storage at 4 °C in the dark. PBMC from 2 healthy volunteers were stimulated for 72 h with either OKT3 or PHA, stained and stored at 4 °C in capped flow cytometry tubes. Each tube was processed three times with the same flow cytometer: at

Day 0 (same day as staining), Day 3 and Day 7 (Supplementary Fig. 4). We did not observe any significant modification of the percentages of proliferating T cells or any decrease in EdU-AF488 MFI in proliferating cells between the three time points. Therefore we concluded that EdU staining is stable for at least a week when cells are stored at 4 °C away from light. Taken together, the possibility to delay, first, cell stimulation for at least 24 h, and second, cytometer processing of labeled cells for at least a week, makes this test flexible enough to comply with clinical laboratories constraints.

3.4. Minimum cell number per test

Finally, considering the very low number of cells often available in clinical samples, especially in pediatrics, we wondered if we could reduce the minimum number of cells per test. We tested 4 different cell concentrations, corresponding to 25×10^3 to 200×10^3 cells in a constant volume of 200 μ L per well. PBMC were then stimulated with either OKT3 or PHA for 72 h before being processed according to the

protocol described above. Results are shown in Supplementary Fig. 5. When decreasing the number of cells per test, we did not observe any decrease in the percentages of proliferating T cells or any dispersion of the replicates, whatever the stimulation. Therefore we concluded that the number of cells per well could be lowered to a minimum of 25 000 cells in 200 μ L of culture media.

3.5. Comparison with [3 H]-thymidine incorporation assay

3.5.1. Healthy volunteers

In order to perform a comparison-of-method study between EdU and [3 H]-thymidine incorporation assays; we compared cell proliferations measured by both techniques in parallel on blood samples from healthy volunteers ($n = 30$). Cells were stimulated with increasing concentrations of the most commonly used stimulants: mitogens (PHA, ConA, PWM, PMA), specific T cell stimulant (OKT3) and recall antigen (tuberculin). Stimulation conditions and experimental design are described in Supplementary Fig. 6. Briefly, PBMC were extracted and seeded on Day 0, stimulated on Day 1 with increasing doses of stimulants, incubated for 48 h (e.g., PHA) to 120 h (tuberculin). EdU staining was performed on the same day as [3 H]-thymidine harvesting and scintillation measurement. For each stimulant, the experiment was repeated on 4 to 6 different healthy donors.

Fig. 5 shows the results of the comparison-of-methods study between [3 H]-thymidine and EdU incorporation assays. We observed a strong correlation between cell proliferations measured with the two techniques. Indeed the Spearman correlation coefficient r was equal to 0.9084 ($p < 0.0001$). We therefore concluded that there was a good correlation between results obtained with [3 H]-thymidine assay and EdU incorporation measurement in healthy volunteers.

3.5.2. Patients

Following excellent results obtained on healthy volunteers' blood samples, we next evaluated EdU flow cytometry assay in

patients' samples. We compared results obtained with both technique on blood samples taken either from septic patients ($n = 8$), or from pediatric patients with suspicion of primary immunodeficiencies (from routine workload, $n = 3$, immunological data described in Table 1).

PBMC were stimulated with PHA and, based on the thresholds routinely used in our clinical lab for [3 H]-thymidine assay, patients were qualified either as low responders or responders, as shown in Fig. 6A. Importantly, we observed that patients' classification was similar with both techniques.

In addition, we compared the PHA-induced T cell proliferation from septic patients with responses of healthy volunteers. In accordance with previous results obtained with [3 H]-thymidine assay (Venet et al., 2012; Guignant et al., 2011), septic patients presented with decreased T cell proliferation compared to healthy volunteers (Fig. 6B). Therefore we concluded that EdU flow cytometry technique is likely to provide identical diagnostic conclusion as the [3 H]-thymidine-based technique.

4. Discussion

The main goal of this study was to assess whether LTT performed by flow cytometry based on EdU incorporation assay could replace the gold standard technique based on [3 H]-thymidine incorporation in clinical laboratories conditions.

Therefore we first defined optimal protocol for EdU assay. It consisted in PBMC stimulation (2×10^5 cells/well) during various incubation times depending on proliferative agents, then on DNA labeling with 10 μ M EdU during 2 h, followed by CD3 cell surface staining, fixation and activation with 250 μ L reaction cocktail before flow cytometry processing. Using this protocol, we obtained good repeatability and reproducibility results for such manual technique. Moreover, we showed the flexibility of this technique regarding stimulation initiation (which can be delayed by 24 h after cell purification) and flow cytometer processing (which can be delayed by 7 days after cell staining); which will facilitate the implementation of

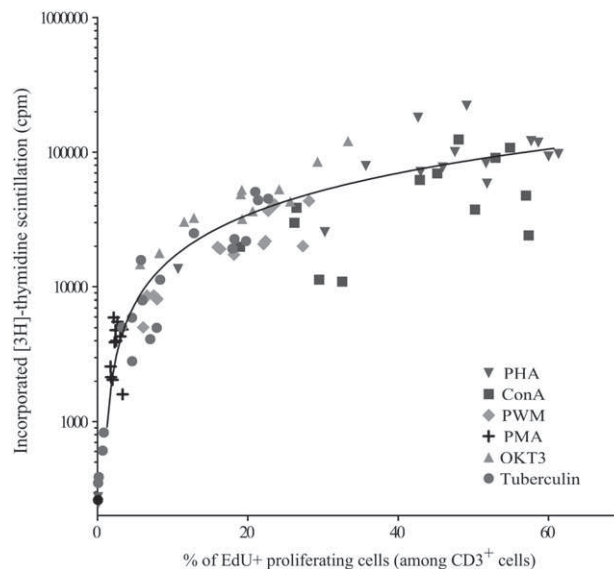


Fig. 5. Comparison-of-method study between [3 H]-thymidine and EdU incorporation assays. For experimental conditions see Supplemental Fig. 6. Each point represents the mean of a triplicate for one stimulation condition in one healthy volunteer ($n = 30$ donors). Regression curve is shown. Cpm: counts per minute.

Table 1
Immunological data of pediatric patients with suspicion of primary immunodeficiencies.

	Age	Sex	Lymphocytes	T lymphocytes			B lymphocytes	NK cells	Diagnostic
				CD3 ⁺	CD3 ⁺ CD4 ⁺	CD3 ⁺ CD8 ⁺	CD20 ⁺	CD3 ⁻ CD16 ⁺ and/or CD56 ⁺	
Patient 1	16	F	1 698 30	1 409 83	679 42	713 40	170 10	119 7	Congenital hypogammaglobulinemia
Normal values			1400–4170	1100–2750	550–1600	400–1050	250–550	135–750	
Patient 2	10	M	1 405 60	1 180 84	843 60	295 21	141 10	56 4	No immunological deficit
Normal values			1440–5340	1060–3370	420–1930	410–1380	230–1130	145–600	
Patient 3	1,5	M	5 540 52	3 379 61	2 271 41	831 15	1496 27	609 11	Undetermined
Normal values			3430–8700	2025–4775	1325–3225	600–1930	580–2570	200–900	

Data were obtained by flow cytometry technique using internal calibrator for absolute values, expressed as number of cell per microliter of blood. Numbers in italic font are percentages. Lymphocyte percentage is expressed as percentage of circulating white blood cells; CD3, CD4 and CD8 T lymphocytes, B lymphocytes and NK cells, as percentage of lymphocytes; ages are expressed in years. Matched age absolute normal values are indicated.

this test in clinical labs that do not function 24/7. In addition, we demonstrated that this protocol can be performed on a very low number of cells (down to 25 000 PBMC), which is a crucial parameter when dealing with limited blood volumes (pediatric samples) or lymphopenic blood samples (bone marrow transplants). Most importantly, in our hands, comparison-of-methods study between this EdU protocol and [³H]-thymidine assay on healthy volunteers' samples provided very good results. When working on clinical samples, we similarly observed that results from this EdU assay led to an identical patients' classification in low responders and responders as the gold-standard [³H]-thymidine assay. Interestingly, we also confirmed, with this novel technique, the previously observed reduced proliferative response in septic shock patients compared with healthy volunteers (Venet et al., 2012; Guignant et al., 2011).

Overall, these results show that the EdU incorporation assay allows for the measurement of LTT response with similar performances as [³H]-thymidine assay in routine lab conditions. Moreover, as this test uses a non-radioactive technique; it represents a considerable advantage over the [³H]-thymidine assay at a time when radioactivity is being progressively banned from hospital labs. Therefore, the EdU incorporation assay probably represents a robust non-radioactive alternative test to the [³H]-thymidine assay for LTT evaluation in clinic.

Previous studies compared EdU flow cytometry assay with [³H]-thymidine incorporation test (Yu et al., 2009; Sun et al., 2012). However both were conducted on murine splenocytes. Our study is thus the first to evaluate EdU incorporation assay on human circulating T lymphocytes. This could explain the minor discrepancies observed between our results and previous works regarding optimal protocol conditions. In addition, we optimized the EdU protocol in order to fit with clinical routine lab constraints, such as reducing time to results. This could lead to protocol adaptations that would not have been necessary in basic research conditions. Finally, our work is the first to evaluate this technique in clinical samples from patients with suspected immunodeficiencies.

Several techniques have been developed to measure cell proliferation: detection of cell cycle specific antigens like Ki-67, cell division tracking through DNA incorporating dyes, such as propidium iodide, or through membrane dyes, such as

PKH26. The two most commonly used flow cytometry techniques for lymphocyte proliferation measurement in research laboratories are the 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) and the carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) incorporation based assays.

In the first technique, BrdU is a thymidine analog; which is incorporated into DNA during cell proliferation similarly to [³H]-thymidine or EdU. However, as opposed to EdU; which is detected through a azide-coupled fluorochrome reactions (small molecules that only require cell membrane permeabilization and can bind to EdU on hellicoidal DNA (Buck et al., 2008; Ranall et al., 2010)), its detection requires antigen retrieval by acid (Gonchoroff et al., 1986), heat (Dolbeare et al., 1985), UV exposure (Hammers et al., 2002), or DNase treatment (Gonchoroff et al., 1986; Rothausler & Baumgarth, 2006) and permeabilization of both cell and nucleus membranes to allow for anti-BrdU antibodies entry into the cells. It is usually dedicated to cell cycle analysis rather than LTT measurement.

In the second technique, CFDA-SE, a cell-permeant molecule, enters the cells, where intra-cellular esterases turn it into CFSE, a fluorescent and less membrane-permeant molecule able to covalently bind amino groups. Cell proliferation is then measured through the halving of the cell fluorescence consequent to each cell division (Lyons & Parish, 1994). Because of its mechanism, CFSE labels every cell present in the culture, including cell populations that may be different from the population of interest. As a consequence, the detection of a low proliferative response of a small cell subpopulation in a complex sample may be difficult by using this technique. This is exemplified by the spectral properties of CFSE that can make peak resolution challenging (Begum et al., 2013). For these reasons, CFSE approach is more commonly used for experimental approaches, in particular to evaluate the number of cell divisions during proliferation. With that said, analytical characteristics (e.g., repeatability, reproducibility, stability of fluorescence overtime...) of CFSE staining for LTT evaluation in clinical samples are not known. A comparison of methods between CFSE and EdU techniques for LTT should be performed in a future study.

Other techniques such as the quantification of blast formation after stimulation have been tested in clinic (Marits et al., 2014). Compared with BrdU, CFSE, or EdU assays, this protocol is

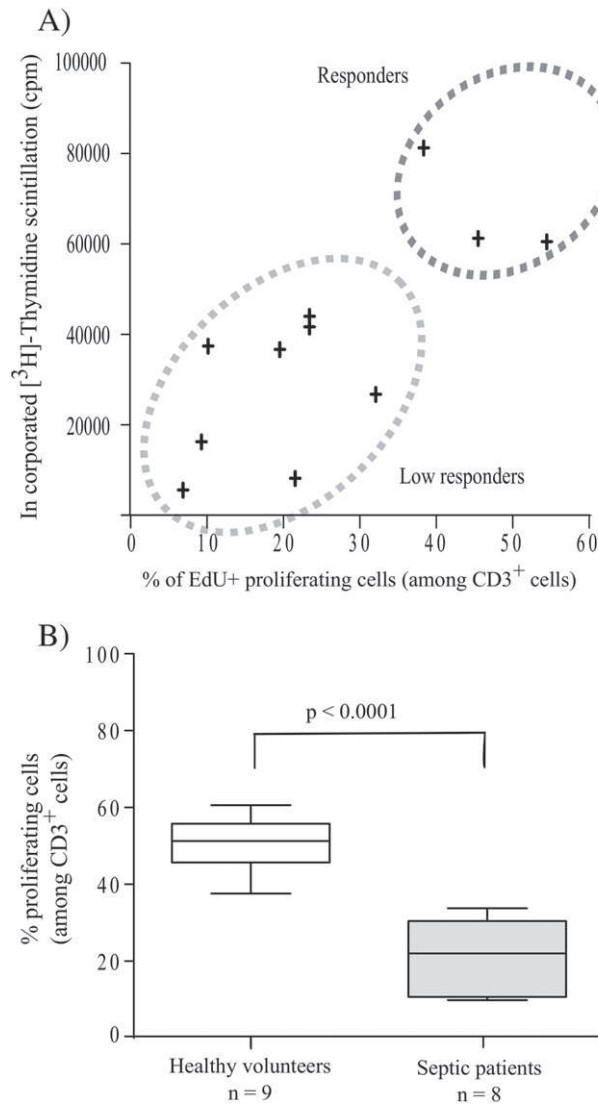


Fig. 6. Results on clinical samples. Peripheral blood mononuclear cells were stimulated with PHA ($n = 8$ septic shock, 3 pediatric patients). (A)–Proliferations measured by [³H]-thymidine and EdU incorporation assays were compared. Each symbol = mean of a replicate in one patient. Cpm: counts per minute. (B) Percentages of proliferating cells in septic patients vs healthy donors (box-plots). Statistics: Mann–Whitney test.

simpler and shorter. However, depending on the stimulant, it could be up to 3 days longer than the EdU assay. Furthermore, lymphocyte proliferation is only evaluated through cell increase in size during blast formation that can be detected as an increase in forward scatter by flow cytometry. Obviously, this is not as specific to cell proliferation as base incorporation into DNA as in EdU protocol. Additionally, as for CFSE assay, analytical performances (repeatability, reproducibility) still need to be evaluated.

A drawback of EdU protocol might be its cost. Indeed, in our hands, it remains slightly higher than the cost of the [³H]-thymidine assay, when taking into account cell culture, testing reagents, instruments and machines, waste management, and technician handling time. However, this drawback is likely to be minimized, as the technique is still recent and its cost may be reduced in a close future if this assay is implemented in routine

labs. Moreover the many advantages of this assay (especially the absence of radioactivity) make the additional cost worth it. Another aspect that needs to be evaluated is the possibility to perform EdU incorporation assay in whole blood, as it would represent an easier and faster approach. This needs to be evaluated in a further study.

In conclusion, with good analytical performances and a high correlation with the gold standard technique of [³H]-thymidine uptake, we demonstrated that EdU incorporation assay is a relevant non-radioactive candidate for LTT evaluation in clinic. Upon validation in larger cohorts of patients, we anticipate that routinely replacing the [³H]-thymidine gold standard technique by this new innovative flow cytometry technique in clinical immunology laboratories is a reasonable strategy.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2014.10.006>.

Acknowledgments

This work was supported by funds from bioMérieux (FP, AP, JT) and the Hospices Civils de Lyon to GM, AF, TR, CM, FPL, AL, FV. FP, AP, and JT are bioMérieux employees. The authors would like to thank Anne Portier from the Immunology Laboratory of Hôpital E. Herriot, Lyon, for help in performing [³H]-thymidine assays.

References

- Bading, J.R., Shields, A.F., 2008. Imaging of cell proliferation: status and prospects. *J. Nucl. Med.* 49 (Suppl. 2), 64S.
- Barna, B.P., Culver, D.A., Yen-Lieberman, B., Dweik, R.A., Thomassen, M.J., 2003. Clinical application of beryllium lymphocyte proliferation testing. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 10, 990.
- Begum, J., Day, W., Henderson, C., Purewal, S., Cerveira, J., Summers, H., et al., 2013. A method for evaluating the use of fluorescent dyes to track proliferation in cell lines by dye dilution. *Cytometry* 83, 1085.
- Buck, S.B., Bradford, J., Gee, K.R., Agnew, B.J., Clarke, S.T., Salic, A., 2008. Detection of S-phase cell cycle progression using 5-ethynyl-2'-deoxyuridine incorporation with click chemistry, an alternative to using 5-bromo-2'-deoxyuridine antibodies. *BioTech.* 44, 927.
- de Vries, E., 2012. European Society for Immunodeficiencies (ESID) members, patient-centred screening for primary immunodeficiency, a multi-stage diagnostic protocol designed for non-immunologists: 2011 update. *Clin. Exp. Immunol.* 167, 108. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2249.2011.04461.x>.
- Dolbeare, F., Beisker, W., Pallavicini, M.G., Vanderlaan, M., Gray, J.W., 1985. Cytochemistry for bromodeoxyuridine/DNA analysis: stoichiometry and sensitivity. *Cytometry* 6, 521.
- Gonchoroff, N.J., Katzmann, J.A., Currie, R.M., Evans, E.L., Houck, D.W., Kline, B.C., et al., 1986. S-phase detection with an antibody to bromodeoxyuridine. Role of DNase pretreatment. *J. Immunol. Methods* 93, 97.
- Guignant, C., Lepape, A., Huang, X., Kherouf, H., Denis, L., Poitevin, F., et al., 2011. Programmed death-1 levels correlate with increased mortality, nosocomial infection and immune dysfunctions in septic shock patients. *Crit. Care* 15, R99.
- Hammers, H.J., Saballus, M., Sheikzadeh, S., Schlenke, P., 2002. Introduction of a novel proliferation assay for pharmacological studies allowing the combination of BrdU detection and phenotyping. *J. Immunol. Methods* 264, 89.
- Lindegren, L.K. Mary Lou, 2004. Applying public health strategies to primary immunodeficiency diseases: a potential approach to genetic disorders. *MMWR* 53, 1.
- Lyons, A.B., Parish, C.R., 1994. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J. Immunol. Methods* 171, 131.
- Marits, P., Wikström, A.-C., Popadic, D., Winqvist, O., Thunberg, S., 2014. Evaluation of T and B lymphocyte function in clinical practice using a flow cytometry based proliferation assay. *Clin. Immunol.* 153, 332.
- Ranall, M.V., Gabrielli, B.G., Gonda, T.J., 2010. Adaptation and validation of DNA synthesis detection by fluorescent dye derivatization for high-throughput screening. *BioTech.* 48, 379.
- Rew, D.A., Wilson, G.D., 2000. Cell production rates in human tissues and tumours and their significance. Part 1: an introduction to the techniques of measurement and their limitations. *Eur. J. Surg. Oncol.* 26, 227.
- Rothaeusler, K., Baumgarth, N., 2006. Evaluation of intranuclear BrdU detection procedures for use in multicolor flow cytometry. *Cytometry* 69A, 249.
- Sun, Y., Sun, Y., Lin, G., Zhang, R., Zhang, K., Xie, J., et al., 2012. Multicolor flow cytometry analysis of the proliferations of T-lymphocyte subsets in vitro by EdU incorporation. *Cytometry* 81, 901.
- Venet, F., Foray, A.-P., Villars-Méchin, A., Malcus, C., Poitevin-Later, F., Lepape, A., et al., 2012. IL-7 restores lymphocyte functions in septic patients. *J. Immunol.* 189, 5073.
- Yu, Y., Arora, A., Min, W., Roifman, C.M., Grunebaum, E., 2009. EdU incorporation is an alternative non-radioactive assay to [³H]thymidine uptake for in vitro measurement of mice T-cell proliferations. *J. Immunol. Methods* 350, 29.

III - Altered T lymphocyte proliferation upon LPS challenge *ex-vivo*

III.1 - Contexte

Diverses études ont montré que certains ligands des TLR étaient capables d'activer les lymphocytes T. Or l'implication de ces ligands dans l'induction des ALIS a été peu étudiée à ce jour. Il a été établi que la pré-incubation de PBMC (priming) en présence de LPS induit un état de tolérance monocytaire similaire à celui observé chez les patients septiques (tolérance à l'endotoxine). La possibilité qu'un priming LPS induise des altérations lymphocytaires similaires aux ALIS n'a pas été évaluée.

III.2 - Description de l'étude

Cette étude avait pour but d'évaluer *ex-vivo* si les fonctions des lymphocytes T étaient affectées par une incubation avec du LPS (mimant une infection bactérienne), afin de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques impliqués dans l'induction des ALIS. Nous avons donc évalué l'effet d'un priming LPS de PBMC sur la prolifération et la production de cytokines des lymphocytes T en réponse à divers stimuli.

III.3 - Conclusion

Nous avons montré que le priming LPS n'avait pas d'impact direct sur la fonctionnalité des lymphocytes T. Néanmoins ce priming agit sur les monocytes en diminuant leur capacité d'activation des lymphocytes T : ce modèle récapitule probablement des mécanismes indirects en jeu dans l'induction des ALIS.

RESEARCH ARTICLE

Altered T Lymphocyte Proliferation upon Lipopolysaccharide Challenge *Ex Vivo*

Fanny Pujol¹, Guillaume Monneret^{1,2}, Alexandre Pachot¹, Julien Textoris^{1,3‡}, Fabienne Venet^{1,2‡*}

1 BioMérieux, Joint Research Unit, Hospices Civils de Lyon—bioMérieux, Hôpital Edouard Herriot, Lyon, France, **2** Immunology Laboratory, Hospices Civils de Lyon, Hôpital Edouard Herriot, Lyon, France, **3** Anesthesiology and Intensive care department, Hospices Civils de Lyon, Hôpital Edouard Herriot, Lyon, France

‡ These authors are co-senior authors on this work.

* fabienne.venet@chu-lyon.fr



CrossMark
click for updates

Abstract

Context

Sepsis is characterized by the development of adaptive immune cell alterations, which intensity and duration are associated with increased risk of health-care associated infections and mortality. However, pathophysiological mechanisms leading to such lymphocyte dysfunctions are not completely understood, although both intrinsic lymphocyte alterations and antigen-presenting cells (APCs) dysfunctions are most likely involved.

Study

The aim of the current study was to evaluate whether lipopolysaccharide (LPS, mimicking initial Gram negative bacterial challenge) could directly impact lymphocyte function after sepsis. Therefore, we explored *ex-vivo* the effect of LPS priming on human T lymphocyte proliferation induced by different stimuli.

Results

We showed that LPS priming of PBMCs reduced T cell proliferative response and altered IFN γ secretion after stimulation with OKT3 but not with phytohaemagglutinin or anti-CD2/CD3/CD28-coated beads stimulations. Interestingly only LPS priming of monocytes led to decreased T cell proliferative response as opposed to LPS priming of lymphocytes. Importantly, LPS priming was associated with reduced expression of HLA-DR, CD86 and CD64 on monocytes but not with the modification of CD3, CTLA4, PD-1 and CD28 expressions on lymphocytes. Finally, IFN γ stimulation restored monocytes accessory functions and T cell proliferative response to OKT3.

Conclusion

We conclude that LPS priming does not directly impact lymphocyte functions but reduces APC's capacity to activate T cells. This recapitulates *ex vivo* indirect mechanisms

OPEN ACCESS

Citation: Pujol F, Monneret G, Pachot A, Textoris J, Venet F (2015) Altered T Lymphocyte Proliferation upon Lipopolysaccharide Challenge *Ex Vivo*. PLoS ONE 10(12): e0144375. doi:10.1371/journal.pone.0144375

Editor: Gernot Zissel, Universitätsklinikum Freiburg, GERMANY

Received: August 28, 2015

Accepted: November 17, 2015

Published: December 7, 2015

Copyright: © 2015 Pujol et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: This work was supported by funds from bioMérieux (FP, AP, JT) and the Hospices Civils de Lyon to GM and FV. FP, AP, and JT are bioMérieux employees. This commercial affiliation only provided support in the form of salaries for authors (FP, JT, AP), but did not have any additional role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The specific roles of these authors are articulated in the 'author contributions' section.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

participating in sepsis-induced lymphocyte alterations and suggests that monocyte-targeting immunoadjuvant therapies in sepsis may also help to improve adaptive immune dysfunctions. Direct mechanisms impacting lymphocytes being also at play during sepsis, the respective parts of direct versus indirect sepsis-induced lymphocyte alterations remain to be evaluated in clinic.

Introduction

Septic syndromes represent a major healthcare problem worldwide accounting for a high number of deaths every year [1,2].

Sepsis is characterized by the development of a phase of immunosuppression affecting both innate and adaptive immunity. In particular, T cells are deeply altered. After a massive apoptosis, the remaining T cells are anergic, display lower proliferation and secretion of pro-inflammatory cytokine after *ex-vivo* stimulation. In addition, circulating lymphocytes in septic patients present an exhausted phenotype, characterized by lower levels of CD3 and co-stimulatory molecule, increased expression of co-inhibitory receptors such as PD-1 (programmed cell death receptor-1) or CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte associated protein 4) [3,4]. Many studies have demonstrated an association between intensity and length of sepsis-induced T cell anergy and/or lymphopenia and increased risk of HAI (healthcare associated infections) and mortality [5,6]. This constitutes the rationale for innovative therapeutic interventions (such as rhIL-7 (recombinant human interleukin-7) or anti-PD-1/PD-L1 (PD-1 ligand) antibodies) targeting these lymphocyte alterations that are now considered in the treatment of septic patients [7].

However, pathophysiological mechanisms leading to such lymphocyte dysfunctions are not completely understood. In particular, a potential direct effect of the initial infectious challenge on lymphocyte effector functions has never been evaluated in the context of sepsis.

Therefore, the aims of the current study were to explore lymphocyte functions after LPS (lipopolysaccharide, mimicking initial Gram negative infection) challenge *ex-vivo* in order to improve our understanding of sepsis-induced T cell alterations pathophysiology and to establish a lymphocyte functional tests that would help patients' stratification in clinical trials. Therefore, we evaluated the effect of LPS priming on lymphocyte proliferation and cytokine production induced by different stimuli *ex-vivo*.

Material and Methods

Healthy volunteers

Whole blood samples were purchased from the Etablissement Français du Sang (EFS) (n = 50 different donors, aged 21 to 65, 39 men and 11 women). According to EFS standardized procedures for blood donation, written informed consent was obtained from HVs (healthy volunteers) and personal data for blood donors were anonymized at time of blood donation and before blood transfer to our research lab. This work belongs to a global study on ICU-induced immune dysfunctions which has been approved by our Institutional Review Board for ethics ("Comité de Protection des Personnes Sud- Est II", Ref 2014-003).

Cell isolation and seeding

PBMC (peripheral blood mononuclear cells) were obtained by Ficoll gradient centrifugation. Monocyte depleted PBMC were obtained using RosetteSep™ Human Monocyte Depletion

Cocktail (Stem Cell, Vancouver, Canada), according to manufacturer's instructions. T cells were isolated through negative selection using the RosetteSep™ Human T Cell Enrichment Cocktail (Stem Cell), according to manufacturer's instructions. Monocytes were isolated through positive CD14 selection, using CD14 MicroBeads, MS columns and MiniMACS™ Separator, according to manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany).

Cell culture

Cells were diluted to working concentration (1×10^6 cells/mL unless otherwise stated) in complete culture medium: RPMI 1640 (Eurobio, Les Ulis, France) supplemented with 10% SAB (AB human serum, Life technologies, Carlsbad, CA, USA), 2 mM L-Glutamine (Eurobio), 2 μ g/mL Fungizone (Gibco, Life technologies), 20 U/mL penicillin and 20 μ g/mL streptomycin (Peni 10000 UI/Strepto 10000 μ g, Eurobio), and incubated at 37°C in humidified 5% CO₂ atmosphere.

LPS priming. Cells were treated overnight with either medium or various concentration of LPS (from 0.01 to 1000 ng/mL) mix of gel filtration chromatography purified LPS from *Escherichia coli* O111:B4, O55:B5, O124:B8, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA).

IFN γ treatment. Following LPS priming, PBMC were washed with PBS, re-suspended in complete medium, treated with either medium or 100 ng/mL of human recombinant interferon gamma-1b (IFN γ , Immukin, Boehringer Ingelheim, Germany) and incubated at 37°C in humidified 5% CO₂ atmosphere. For proliferation assay, T cell stimulant was added simultaneously with IFN γ .

T cell proliferation assay

T cells were stimulated 72h at 37°C in humidified 5% CO₂ atmosphere with one of the following stimulants: anti-CD2/CD3/CD8 antibodies-coated beads (α CD2/3/28-Abs coated beads, T cell activation/expansion kit, Miltenyi Biotec, 1 bead for 2 cells), 4 μ g/mL phytohemagglutinin (PHA, Oxoid), 25 ng/mL anti-CD3 antibody (OKT3, mouse monoclonal IgG2a, κ , Tonbo Biosciences, San Diego, CA, USA).

T cell proliferation was then evaluated using the Click-iT® flow cytometry assay (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), as previously described [8]. Flow cytometry analyses were performed on a Navios flow cytometer (Beckman Coulter). CD3⁺ cells were first selected among total events based on a monoparametric CD3-allophycocyanin (APC) histogram (APC labeled anti-CD3 antibody, mouse monoclonal IgG1, clone UCHT1, Beckman Coulter). Then the percentage of EdU⁺ cells among CD3⁺ cells were measured on a monoparametric EdU-AF488 histogram. For every experiment, a minimum of 2.5×10^3 CD3⁺ cells was recorded. Data were analyzed using Kaluza software (version 1.2, Beckman Coulter).

IFN γ concentration dosage in cell supernatants

After PBMC culture, culture plates were centrifuged, supernatants harvested and stored at -80°C. All tested supernatants were thawed simultaneously and the Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 8-plex Assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) was performed on 50 μ L of each supernatant in duplicates, according to manufacturer's instructions, and processed with a BioPlex 200 (Bio-Rad). Results were analyzed with the BioPlex Manager software 6.1.

Flow cytometry immunophenotyping

Multiparametric flow cytometry panels were used to characterize expressions on monocytes and lymphocytes of various receptors. Antibodies were: PC7 (PE (phycoerythrin)-cyanin7)

labeled anti-CD64 antibody (mouse monoclonal IgG1, clone 22, Beckman Coulter), PB (pacific blue) labeled anti-CD14 antibody (mouse monoclonal IgG2a, clone RMO52, Beckman Coulter), PE-labeled anti-CD86 antibody (mouse monoclonal IgG2b, κ, clone IT2.2, Biolegend, San Diego, CA, USA), Allophycocyanin-labeled anti-CD80 antibody (mouse monoclonal IgG1, clone MAB104, Beckman Coulter), PC7 labeled anti-HLA-DR antibody (human leukocyte antigen-DR) (mouse monoclonal IgG2a, κ, clone L243, Biolegend), PE labeled anti-PD-1 antibody (goat polyclonal IgG, R&D systems, Minneapolis, MN, USA), PC7 labeled anti-CD28 antibody (mouse monoclonal IgG1, clone CD28.2, Beckman Coulter), APC-labeled anti-CTLA4 antibody (mouse monoclonal IgG1, κ, clone L3D10, Biolegend, San Diego, CA, USA), and PB labeled anti-CD3 antibody (mouse monoclonal IgG1, clone UCHT1, Beckman Coulter). Corresponding isotypic antibodies labeled with the same fluorophores and purchased from the same suppliers were used as controls. Regarding monocyte receptor evaluation, CD14⁺ cells were first selected among total events based on a bi-parametric CD14-PB/side scatter plot. Then the MFI (means of fluorescence intensity) of each parameter on CD14⁺ cells were measured on mono-parametric histograms. For every experiment, a minimum of 2.5x10³ CD14⁺ cells was recorded.

Regarding T cell receptor expression evaluation, CD3⁺ cells were first selected among total events based on a bi-parametric CD3-PB/side scatter plot. Then the MFI of each parameter on CD3⁺ cells were measured on mono-parametric histograms. For every experiment, a minimum of 2.5x10³ CD3⁺ cells was recorded.

Statistics

For each individual, technical replicates (a minimum of 2 per measurement) were summarized by their means. Such individual values are presented in the figures. In addition, for each condition, individual values are summarized on the plots by a horizontal line representing the mean of a given condition. Non parametric Wilcoxon matched paired signed rank test was used to evaluate the significance of quantitative measurements (the effect of the priming of T cells, monocytes or both on T cell proliferative response to OKT3, the restorative effect of IFN γ on decreased lymphocyte proliferation after LPS priming). Differences between groups were considered statistically significant for *P*-values lower than 0.05. Regarding dose-response effect of LPS priming on T cell proliferative response or production of IFN γ , the goodness of fit of the dose-response curve obtained was assessed through fitting the experimental data to a dose-response model for an inhibitor. The adequacy of the fit is measured by the r^2 . An $r^2 > 0.5$ was considered as a strong adequacy between observed data and the model therefore showing a dose-response effect. Anova analysis was performed to evaluate (i) the impact of LPS stimulation and the dose of LPS on T cell proliferative response; (ii) the impact of LPS stimulation, stimulation time, and interaction of both on monocyte expression of HLA-DR, CD64, CD86 and CD80. A statistically significant impact of the variables was considered for *P*-values lower than 0.05.

Results

Decreased lymphocyte effector functions after LPS priming

Sepsis-induced lymphocyte anergy is characterized by decreased effector functions (*i.e.* proliferation and cytokine production) in response to *ex vivo* stimulation [7,9]. Therefore, we tested the effect of LPS priming (mimicking initial Gram negative infectious challenge) on lymphocyte effector functions after incubation with different stimuli (PHA, anti-CD2/CD3/CD28-coated beads and OKT3) on cells from healthy donors [10–12].

First, lymphocyte proliferative response was evaluated. We did not observe any effect of LPS-priming on PHA- or anti-CD2/CD3/CD28-coated beads-induced lymphocyte proliferation independently of LPS concentration used during the priming phase (Fig 1A and 1B). In contrast, LPS priming induced a strong decrease in T cell proliferative response after OKT3 stimulation (Fig 1C). Importantly, this decrease was dose-dependent ($r^2 = 0.78$) of LPS concentration (Fig 1C).

In order to exclude a putative dose effect of proliferation stimuli on these initial observations; we tested the effect of LPS priming on lymphocyte proliferation induced by lower stimuli concentrations. As shown in Fig 2A and 2B, no effect of LPS priming was observed on lymphocyte proliferation induced by PHA or anti-CD2/CD3/CD28-coated beads regardless of their concentrations levels. In marked contrast, after LPS priming, we observed a complete suppression of T cell proliferative response induced by OKT3 ($P < 10^{-8}$), for every tested concentration (Fig 2C).

Based on these preliminary results, we evaluated another important aspect of sepsis-induced lymphocyte anergy, the decreased cytokine production [13,14]. Hence, IFN γ concentrations were measured in culture supernatants of LPS-primed PBMCs after OKT3 stimulation. As shown in Fig 3, in addition to the reduced proliferation, we also observed a dose-dependent ($r^2 = 0.53$) effect of LPS priming on the reduction of IFN γ secretion induced after OKT3 stimulation.

Therefore, in this first set of experiments, we have shown that OKT3-induced lymphocyte proliferation and IFN γ production were altered after LPS priming *ex vivo*.

Monocytes mediate the decreased lymphocyte proliferation after LPS priming

In order to understand the putative mechanisms leading to decrease T cell proliferation, we investigated which cell populations could be involved in LPS-priming effect. In particular, we wanted to know if LPS priming acts directly on T cell to affect their proliferation or may require interactions with other cells such as antigen presenting cells (APC). This aspect has never been investigated before.

Therefore, the effect of LPS priming on OKT3-induced proliferation was first tested on isolated T cells in comparison with PBMCs from the same donor. We did not observe any evidence that OKT3 induces proliferation on isolated T cells. In the contrary, PBMCs stimulated with OKT3 were induced to proliferate, but LPS priming decreased their proliferative responses (Fig 4A). This result shows that OKT3 stimulation requires the presence of accessory cells to induce T cell proliferation in accordance with the literature [15–17].

Among accessory cells, we next investigated the role of monocytes in our model. T cell proliferative responses induced by OKT3 were thus evaluated in monocyte-depleted PBMCs cultures. Consistently with our previous results, we observed that OKT3 stimulation did not induce any T cell proliferation if monocytes were depleted, while PBMC proliferations as well as the inhibitory effect of LPS priming on these proliferative responses from the same donors were conserved (Fig 4B). This highlights the central role of monocytes in this model and suggests that the reductive effect of LPS priming on OKT3-induced lymphocyte proliferation might be mostly mediated by monocytes.

To confirm this aspect, we designed experiments in which purified T cells and purified monocytes were first primed separately by LPS before being co-cultured to evaluate OKT3-induced proliferation (Fig 4C). We observed that T cell proliferative response to OKT3 was decreased only when monocytes were primed with LPS, while LPS priming of purified T cells

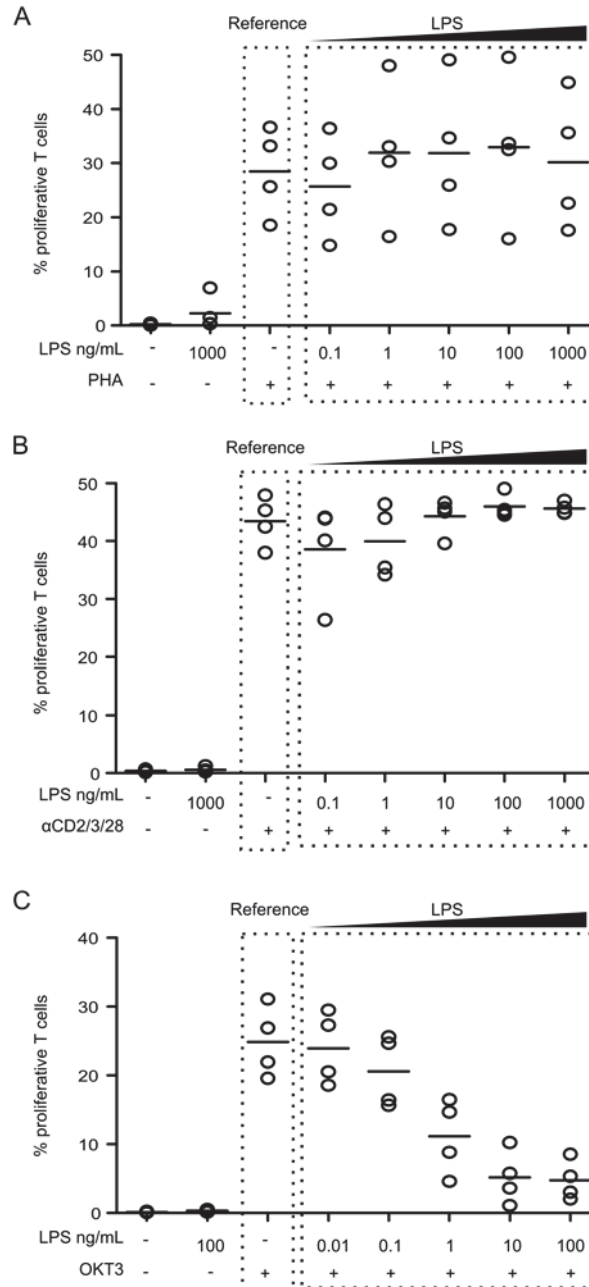


Fig 1. LPS dose-dependently decreases T cell proliferative response to OKT3. PBMC were primed overnight with LPS concentrations ranging from 0.01 ng/mL to 100 ng/mL (in case of OKT3 stimulation) or from 0.1 ng/mL to 1000 ng/mL (in case of anti-CD2/CD3/CD28-coated beads and PHA stimulations). Then PBMC were stimulated with 4 μ g/mL PHA (A), 0.5×10^6 anti-CD2/CD3/CD28-coated beads/mL (B), or 25 ng/mL OKT3 (C) for 72h. T cell proliferation was measured by flow cytometry and results are expressed as percentages of proliferating cells among total T cells. Each experiment was performed on n = 3 to 4 HV. Technical replicates were summarized by the mean for each individual. For each condition, individual values are summarized on the plots by a horizontal line representing the mean of a given condition.

doi:10.1371/journal.pone.0144375.g001

had no effect (Fig 4D). This confirms that LPS priming affects monocytes to reduce OKT3-induced T cells proliferation in our model.

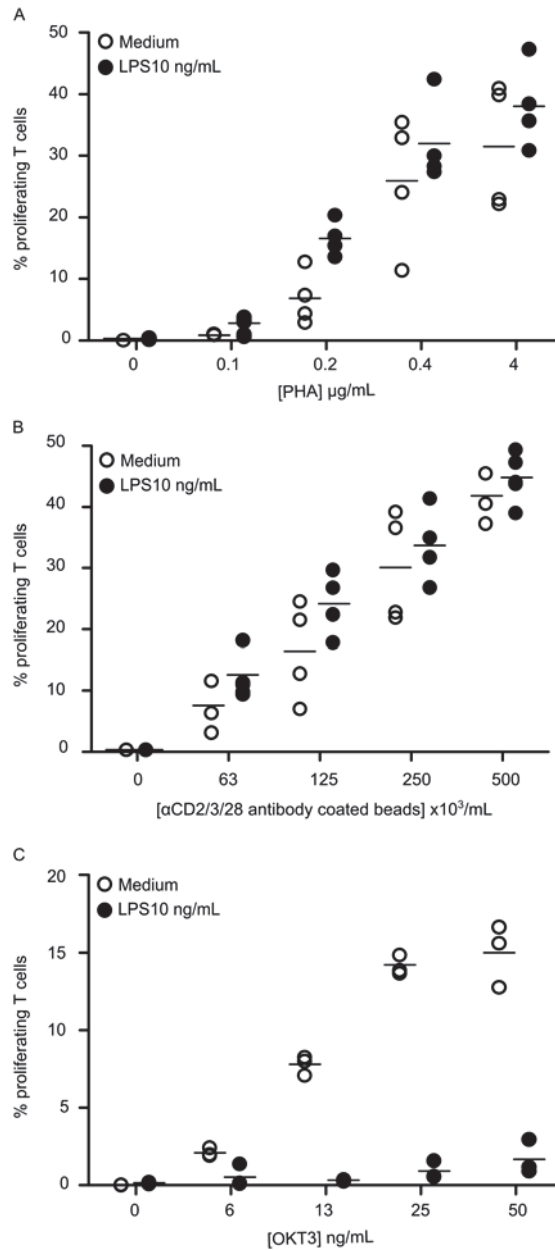


Fig 2. LPS decreases only T cell proliferative response to OKT3. PBMC were first treated with medium (white points) or primed with 10 ng/mL LPS (black points), then cells were stimulated with 0.1 to 4 $\mu\text{g/mL}$ PHA (A), or 63×10^3 to 500×10^3 anti-CD2/CD3/CD28-coated beads/mL (B), or 5 to 50 ng/mL OKT3 (C) for 72h. T cell proliferation was measured by flow cytometry and results are expressed as percentages of proliferating cells among total T cells. Each experiment was performed on $n = 4$ HV. Technical replicates were summarized by the mean for each individual. For each condition, individual values are summarized on the plots by a horizontal line representing the mean of a given condition.

doi:10.1371/journal.pone.0144375.g002

Finally, to evaluate how LPS priming of monocytes could participate in their reduced capacity to induce OKT3-mediated proliferation; we measured CD64, HLA-DR, CD86, and CD80 expressions on these cells during incubation with LPS. Indeed, it has been shown that co-stimulations through MHC II molecules, CD80 and CD86 co-receptors as well as Fc γ RI (CD64)

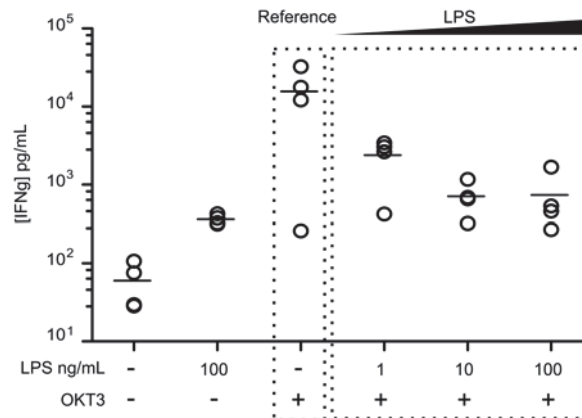


Fig 3. LPS dose-dependent reduction of IFN γ secretion by T cells in response to OKT3 stimulation. PBMC were primed overnight with 1 ng/mL, 10 ng/mL or 100 ng/mL LPS. Then PBMC were stimulated with 25 ng/mL OKT3 for 72h before the supernatant was recovered for IFN γ measurement. Each experiment was performed on $n = 4$ HV. Technical replicates were summarized by the mean for each individual. For each condition, individual values are summarized on the plots by a horizontal line representing the mean of a given condition.

doi:10.1371/journal.pone.0144375.g003

presentation participate in OKT3-induced proliferation [15,17,18]. We observed that CD64 and CD86 expressions were significantly decreased on monocytes during LPS priming ($P < 0.05$) whereas CD80 expression was not modified (Fig 5A). HLA-DR was not decreased during priming (Fig 5A2) but significantly decreased during the following days (data not shown). This suggests that these decreased co-stimulatory molecules expressions after LPS priming may participate in the lowered T cell proliferative response observed after OKT3 stimulation of primed PBMCs. To note, LPS priming had no effect on CD28, CTLA4, PD-1 and CD3 expressions on T lymphocytes (Fig 5B).

Taken together, these results showed that LPS priming acts on monocytes to impair OKT3-induced lymphocyte proliferation through an alteration of monocytes' accessory cell functions. Importantly, in this model, LPS priming does not appear to have any direct effect on lymphocytes.

Ex vivo restoration of lymphocyte proliferation after LPS priming

Finally, we tested the effect of an immunoadjuvant therapy (*i.e.* IFN γ), known to restore monocyte functions, on lymphocyte proliferative response and monocytes accessory cell functions *ex vivo* after LPS priming.

As shown in Fig 6, we observed that IFN γ treatment significantly improved OKT3-induced T cell proliferative response after LPS priming (while IFN γ treatment alone did not affect T cell proliferative response to OKT3, data not shown). In addition, we observed that this was associated with increased CD64, HLA-DR and CD80 monocyte expressions (Fig 7).

This confirms that, after LPS priming, IFN γ treatment can improve T cell proliferative response through the restoration of monocyte's accessory functions.

Discussion

The pathophysiology of sepsis associates a complex interplay between pro- and anti-inflammatory responses alternatively predominating overtime [7]. Indeed, while initial overwhelming pro-inflammatory response occurs after septic shock (responsible for organ dysfunctions and

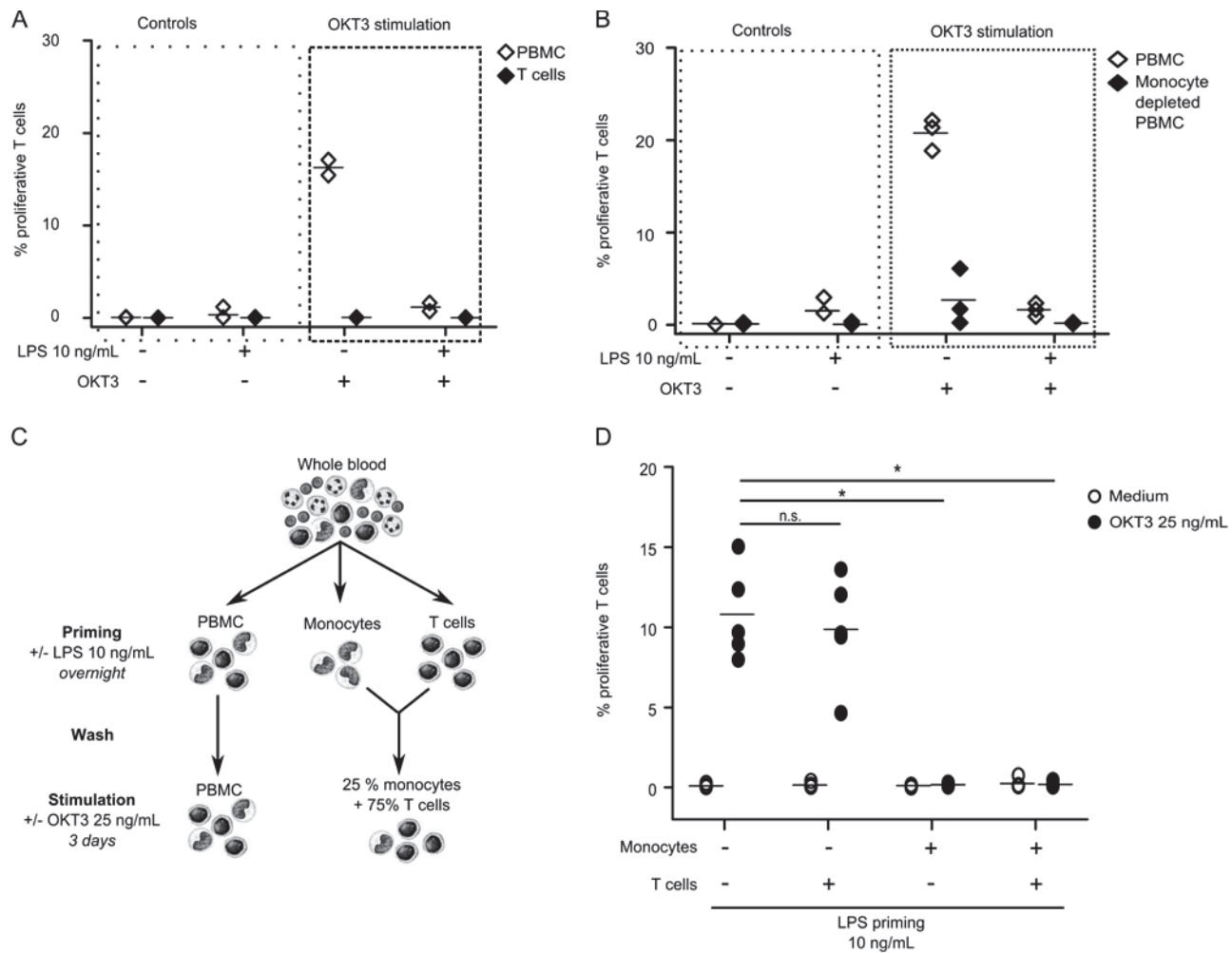
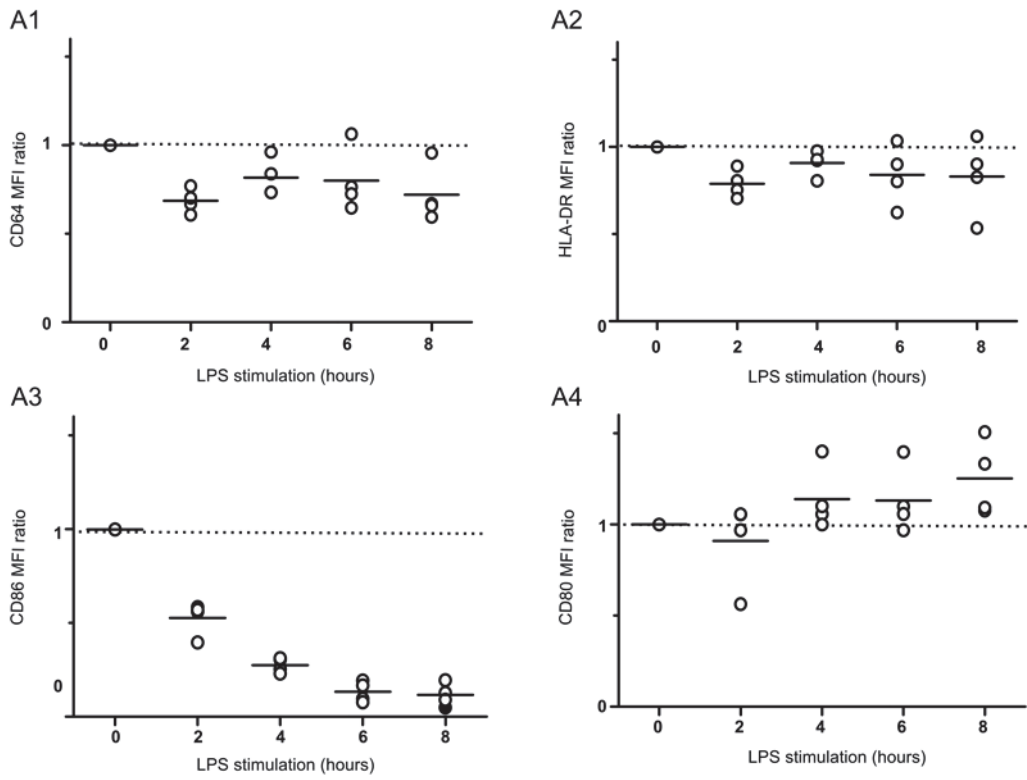


Fig 4. Monocytes mediate LPS induced decrease of T cell proliferative response to OKT3. PBMC (open diamonds) and T cells (A—black diamonds) or monocyte depleted PBMC (B— black diamonds) were, first, primed overnight by 10 ng/mL LPS, then, stimulated 72h with 25 ng/mL OKT3. T cell proliferation was measured by flow cytometry and results are expressed as percentages of proliferating cells among total T cells. This experiments were performed on $n = 2$ or 4 HV. Technical replicates were summarized by the mean for each individual. For each condition, individual values are summarized on the plots by a horizontal line representing the mean of a given condition. C- T cells and monocytes were isolated from each HV and were incubated separately overnight in medium alone or with 10 ng/mL LPS. After thorough PBS wash of each fraction, primed or unprimed T cell fractions were mixed with primed or unprimed monocyte fractions (0.5×10^6 monocytes/mL and 1.5×10^6 T cells—every combination was tested), and stimulated or not with 25 ng/mL OKT3 for 72h before T cell proliferation measurement. T cell proliferation was measured by flow cytometry and results are expressed as percentages of proliferating cells among total T cells. Similar experiment with total PBMC from each HV was performed in parallel as control. D- Results on purified monocytes and lymphocytes are presented. The different experiment conditions of LPS priming of monocytes and / or T cells are underlined under the graph. Open circles represent results for cell culture conditions with no T cell stimulation. Black circles represent results after 25 ng/mL OKT3 stimulation for 72h. The experiment was performed on $n = 5$ HV. Technical replicates were summarized by the mean for each individual. For each condition, individual values are summarized on the plots by a horizontal line representing the mean of a given condition.

doi:10.1371/journal.pone.0144375.g004

early deaths); anti-inflammatory mechanisms rapidly develop in patients that survive this initial peak of cytokine production. If persisting overtime, such compensatory immune response might become deleterious, as it could lead to major immune alterations [13,14]. Indeed, during sepsis, immune dysfunctions affecting both the innate and the adaptive immune responses have been described. Importantly, several clinical studies showed that the intensity and duration of sepsis-induced immune alterations are associated with increased risk of death and HAI. This represents the rationale for novel clinical trials testing immuno-adjuvant therapies in septic patients that present with such immune alterations [7].

A - Cell membrane receptor expression on CD14+ monocytes



B - Cell membrane receptor expression on CD3+ T cells

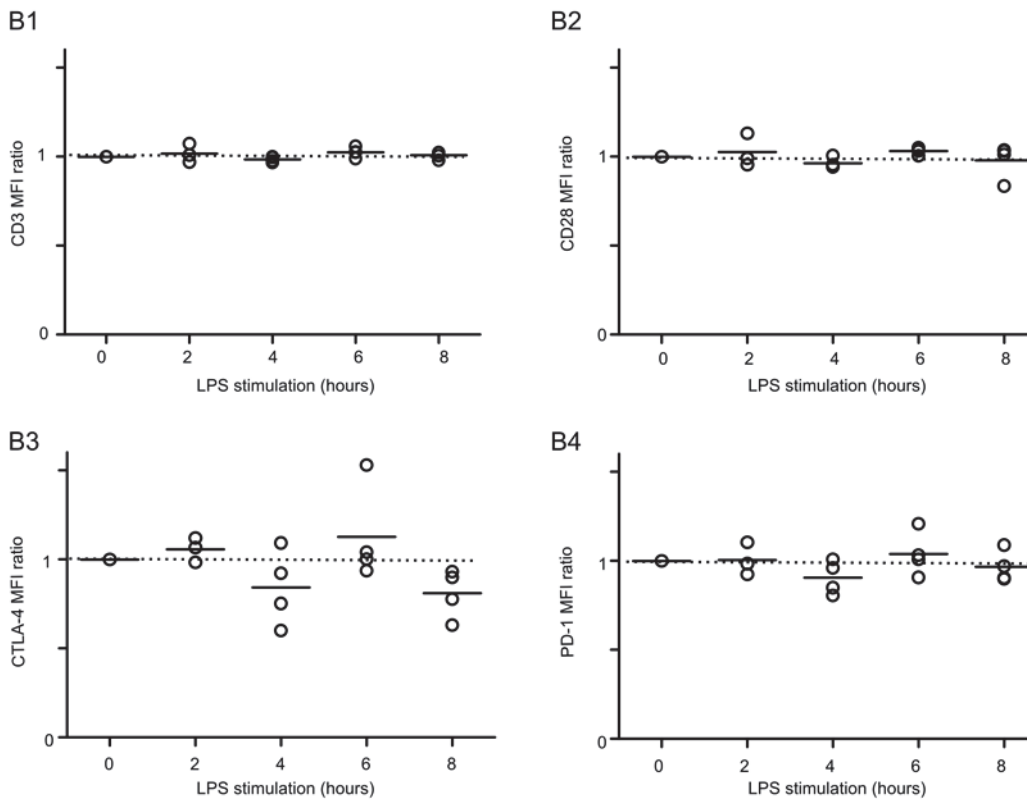


Fig 5. LPS priming alters monocyte T cell accessory cell function but not T cell receptor expression. PBMC were treated with medium or 10 ng/mL LPS and flow cytometry phenotyping was performed every 2h for 8h. Four markers were studied on monocytes (A): CD64 (A1), HLA-DR (A2), CD86 (A3) and CD80 (A4). For each marker, mean fluorescence intensities (MFI) on CD14⁺ cells were measured. Four markers were studied on T cells (B): CD3 (B1), CD28 (B2), CTLA-4 (B3) and PD-1 (B4). For each marker, mean fluorescence intensities (MFI) on CD3⁺ cells were measured. MFI ratio were calculated as follow = MFI of LPS treated cells divided by the MFI of the medium-treated cells at the same time point. The experiments were performed on *n* = 4 HV. Technical replicates were summarized by the mean for each individual. For each condition, individual values are summarized on the plots by a horizontal line representing the mean of a given condition.

doi:10.1371/journal.pone.0144375.g005

In particular, sepsis-induced lymphocyte alterations are characterized by (i) a marked decrease in circulating cell number due to increased apoptosis, (ii) phenotypic alterations such as increased co-inhibitory receptor, decreased CD3 and co-stimulatory receptor expressions, (iii) reduced TCR diversity, (iv) increased proportion of regulatory T cells and, (iv) functional alterations such as decreased proliferation and cytokine production *ex vivo* [4,5,14,19]. This last aspect is characteristic of lymphocyte energy / exhaustion with similarities with lymphocyte alterations described after chronic viral infections [3]. Importantly, several observational studies in clinic showed an association between the intensity and duration of sepsis-induced lymphocyte alterations and increased risk of death or HAI in patients [13,20,21].

Mechanisms leading to such lymphocyte alterations are not completely understood. However, preliminary studies in patients showed that both antigen-specific and mitogen-mediated lymphocyte responses are altered after septic shock. Indeed, Manjuck *et al.* showed the decreased proliferative response to recall antigen stimulations (tetanus toxoid or candidin) in patients with sepsis in association with a loss of HLA-DR and CD86 expressions on monocytes [22]. In addition, the decreased proliferation of septic patients' lymphocytes after a non-specific direct stimulation through TCR (anti-CD2/CD3/CD28-Abs coated beads [23]) or to mitogen stimulation (PHA [24,25]) has been described. Therefore, both intrinsic lymphocyte alterations as well as antigen-presenting cells dysfunctions are most likely involved in sepsis-induced lymphocyte dysfunctions. In that context, the exploration of these aspects *ex vivo* could help to

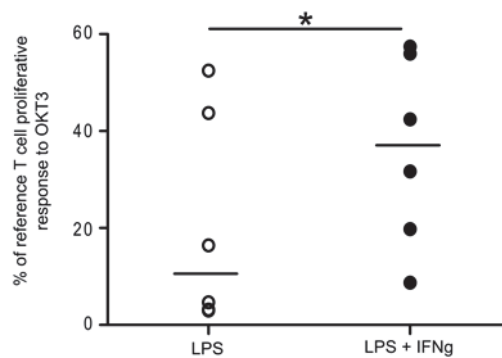


Fig 6. IFN γ partially restores T cell proliferative response to OKT3. PBMC were treated or not overnight with 10 ng/mL LPS, washed and then treated simultaneously or not with 100 ng/mL IFN γ and 25 ng/mL OKT3 for 72 h before T cell proliferation measurement (Black circles: cells primed with LPS and treated with IFN γ +OKT3; open circles: cells primed with LPS and treated with OKT3 but with no IFN γ treatment). T cell proliferation was measured by flow cytometry and results are expressed as percentages of proliferating cells among total T cells. In addition, results are normalized versus proliferation measured after OKT3 stimulation without any LPS priming or IFN γ treatment (control condition). Results are expressed as percentages to the reference proliferative response. The experiments were performed on *n* = 6 HV. Technical replicates were summarized by the mean for each individual. For each condition, individual values are summarized on the plots by a horizontal line representing the median of a given condition.

doi:10.1371/journal.pone.0144375.g006

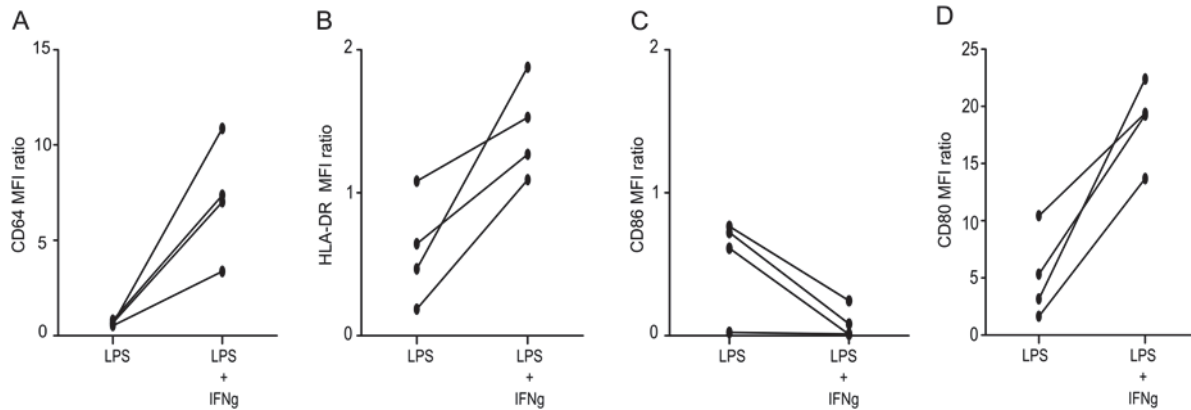


Fig 7. IFN γ partially restores monocyte accessory cell function. PBMC were incubated for 12h with medium or 10 ng/mL LPS, washed, and treated with medium or 100 ng/mL IFN γ . MFI of either CD64 (A), HLA-DR (B), CD86 (C) or CD80 (D) on CD14⁺ cells were measured, and MFI ratios calculated by dividing the MFI of treated cells by the MFI of control cells (no treatment). The experiment was performed on $n = 4$ HV. Technical replicates were summarized by the mean for each individual.

doi:10.1371/journal.pone.0144375.g007

understand the pathophysiology of sepsis-induced lymphocyte dysfunctions. This represents the goal of the current study.

In this set of experiments, we investigated whether LPS priming (mimicking initial infectious challenge) could directly act on lymphocytes to affect their effector functions. Indeed, although TLR activation is the hallmark of the innate immune response, recent evidence demonstrates that adaptive immune cells use these innate signaling pathways as well [26].

We showed that LPS priming of PBMCs led to a reduced T cell proliferative response and altered IFN γ secretion only after OKT3 stimulation, while no effect of LPS priming was observed on PHA and anti-CD2/CD3/CD28 coated beads-induced lymphocyte responses. This suggests that LPS does not act directly on T cells to reduce their effector functions but may impact lymphocyte responses through their interactions with APCs even in a non-antigen specific manner. Here we present evidence for the indirect effect of LPS on T cells. We provide the first report showing that only LPS priming of monocytes led to decreased T cell proliferative response (although the possible impact of positive versus negative purification techniques of monocytes should be evaluated) as opposed to direct LPS priming of purified lymphocytes. Importantly, LPS priming effect was associated with decreased HLA-DR, CD86 and CD64 expressions on monocytes but no change in CD28, CTLA4, PD-1 or CD3 expressions on T cells. Finally, IFN γ stimulation of monocytes restored their accessory functions (*i.e.* increased CD64, CD80 and HLA-DR expressions) and T cell proliferative response to OKT3.

Importantly, this highlights that, depending on the stimuli used to induce lymphocyte effector functions, APC-mediated T cell dysfunctions or intrinsic lymphocyte alterations could be evaluated. Indeed, the 3 stimuli evaluated in the current study use different mechanisms to promote T cell effector functions. PHA is a lectin that aggregates TCRs at T cell surface, thus leading to lymphocyte activation [27,28]. Anti-CD2/CD3/CD28-coated beads mimic TCR stimulation and induce T cell activation with no need for help from APC. Finally, OKT3 is an anti-CD3 antibody that stimulates TCR with the need for an interaction with APC but in a non-antigen specific manner. Indeed the mitogenic activity of OKT3 clone is dependent on monocyte accessory functions. In particular, it correlates with the capacity of the Fc portion of this antibody to interact with FcRs that are present on phagocytes [16,29] and requires interactions with co-stimulatory molecules such as CD80/CD86 or even HLA-DR [17,18]. This

supports the importance to evaluate in parallel several stimuli in clinic to decipher intrinsic versus extrinsic/APC-mediated lymphocyte dysfunctions.

Our results show that LPS priming does not directly impact lymphocyte effector functions in our model. Numerous studies have investigated the effect of TLR4 ligands such as LPS on lymphocyte effector functions [26]. Several different models were evaluated (*in vivo* experiments in mice [30–33], *ex vivo* studies on purified cells [34,35], on various cell populations (cell lines [36]; PBMC [37,38], purified CD4⁺ T cells [39–41]) with various experimental conditions (for example: LPS dosage ranging from 10ng [30] to 250µg [33]). In addition, a number of different read-outs were evaluated: (i) cell proliferation [42]; (ii) cell activation [30], (iii) cell survival / apoptosis [33], (iv) cytokine production [41] or (v) cell adherence [43]. Depending on the experimental set-up, either an activating or an inhibitory effect or the absence of any effect of LPS on lymphocytes was observed. In particular, most of the studies that observed a stimulatory effect of LPS on T cells were performed in mice *in vivo*; a different experimental set-up compared with our current study. Indeed, if considering only studies performed with primary human cells *ex vivo*, results are less clear. Indeed, while some authors did not observe any effect of LPS on T cells [40]; some authors reported either a direct stimulating effect of LPS on T cells [38], a stimulating effect mediated by monocytes [37] or, conversely, a direct [44] or monocyte-mediated [45] inhibitory effect. Here again, different experimental conditions (work on purified cells or mixed cell populations, different LPS dosages . . .) could explain these discrepant results. In addition and most importantly, studies showing an immunoadjuvant effect of LPS on T cell functions evaluated the simultaneous incubation of LPS with T cell stimuli. In our current experimental protocol, we tested whether a priming phase of T cells with LPS could impact a subsequent stimulation of lymphocytes. This experimental design was derived from the model of endotoxin tolerance that has been shown to recapitulate *ex vivo* monocyte-induced immune dysfunctions [10].

With that said, our results are in accordance with previous studies that reported no direct effect of LPS on T cells [39–41,46]. In particular, Komai-Koma *et al.* did not observe any effect of LPS on proliferation and cytokine production of anti-CD3 activated human T cells [40]. To note, our current experimental protocol (EdU incorporation after 72h of stimulation) does not permit the evaluation of an “early” stimulating effect of LPS on TCR-induced proliferation. This specific point now needs to be evaluated in a dedicated study with the use of another read-out for cell proliferation such as CFSE incorporation.

Interestingly, stimulation of other TLRs such as TLR2 has been repeatedly reported to improve T cell proliferation and cytokine production in mice and humans [26,40]. Therefore, despite our negative results, such direct effect of TLR ligands in sepsis-induced lymphocyte alterations could not be excluded and this remains to be evaluated by, for example, studying the effect of other TLRs and PAMPs or DAMPS stimulations. For example, Dominguez-Villar *et al.* set-up a model of T cell exhaustion by treating CD4⁺ T cells with Imiquimod, a TLR7 agonist, and observed a decrease of proliferation and of IFN γ production in response to soluble anti-CD3 and anti-CD28 stimulations. This model was developed to study aspects of lymphocyte exhaustion after chronic viral infections (*i.e.* HIV) which shares characteristics with sepsis induced T cell anergy [47].

In our model, LPS acts on monocytes/APCs to reduce their capacity to activate T cells. This is clearly relevant with the pathophysiology of sepsis in which monocyte alterations have been shown to participate in sepsis-induced lymphocyte dysfunctions [22,48]. Other groups have reported similar results. For example, the study by Yaqub *et al.* showed, in a whole blood model, that LPS stimulation could reduce T cell effector functions induced by TCR/CD3 or SEB stimulations through the production of PGE2 [49,50]. Interestingly in a second study by this group, the authors showed that this effect was indeed mediated by monocyte production of

PGE2 after LPS stimulation [50]. Similarly, Wolk *et al.* showed that LPS priming of mononuclear cells down-regulated MHC II molecules and CD86 expressions, as observed in the current study, in association with diminished T-cell proliferation and IFN γ production in response to presentation of different recall antigens [45]. In the current study, we extend these previous results by showing that not only antigen-specific but also antigen non-specific monocyte-mediated lymphocyte activation (after OKT3 stimulation) is altered after bacterial challenge; an aspect that was not evaluated in Wolk's work. This is important since it allows for the study of monocyte accessory cell functions / co-stimulatory molecule expressions role in sepsis-induced lymphocyte alterations. This might be of major interest in a context of already starting clinical trials testing treatments targeting such immune checkpoints in clinic [51,52], and knowing that such therapies are considered in the treatment of septic shock patients that present with immune alterations [53,54]. In addition, from a technical perspective, the proliferative response induced by OKT3 is of a larger proportion than that induced by recall antigens, which facilitates its evaluation in particular in a case of a reduced effect.

Finally, similar results have also been observed after monocyte stimulation with other TLR ligands. For example, Nakagawa *et al.* stimulated PBMC of healthy volunteers with peptidoglycan prepared from *S. aureus* and observed a loss of T cell IFN γ production and proliferation in response to fixed anti-CD3 antibody plus soluble anti-CD28 antibody stimulation [55]. They demonstrated that this effect required cell-to-cell contact of T cells with peptidoglycan-stimulated monocytes.

Notably, our results also suggest that therapies that restore APC functions (such as IFN γ as tested here) probably have a positive effect not only on innate immunity but also on adaptive immune cells after sepsis. This may be of major importance and may have participated in the positive effect observed for such treatments in the preliminary clinical studies testing these interventions [56–58]. However, this aspect has not been investigated in these clinical trials, but should be considered in the forthcoming clinical studies testing immunoadjuvant therapies.

However, it is highly possible that other mechanisms directly targeting lymphocytes could also participate in sepsis-induced lymphocyte alterations. One can speculate on the roles of immunosuppressive cytokines, apoptosis increasing molecules and/or glucocorticoids. However, this still deserves to be demonstrated in clinic, in particular regarding the respective parts of direct versus indirect mechanisms of sepsis-induced lymphocyte alterations. To that purpose and as discussed above, we would recommend that both direct T cell stimuli (such as PHA) and molecules that require interactions with monocytes to induce lymphocyte proliferation (such as OKT3) should be evaluated in parallel in the forthcoming clinical studies evaluating sepsis-induced lymphocyte alterations in clinic.

In this study, we show that LPS priming does not directly impact lymphocyte effector functions. However such stimulation could act on monocytes/APCs to reduce their capacity to activate T cells. Interestingly, this negative regulation of lymphocyte proliferation was restored *ex vivo* by APC-targeting drugs such as IFN γ . We think that our results recapitulate *ex vivo* the part played by sepsis-induced innate immune cell dysfunctions in sepsis-induced lymphocyte alterations. Further work is now necessary to study the respective parts of direct versus indirect mechanisms of sepsis-induced lymphocyte alterations in clinic and to develop complementary *ex vivo* models recapitulating other mechanisms directly leading to sepsis-induced lymphocyte alterations. The ultimate goal would be to be able to assess *ex vivo* the various candidate molecules targeting these dysfunctions.

Acknowledgments

The authors would like to thank Dr Sophie Blein for her great help in the statistical analysis of these results.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: FP GM JT FV. Performed the experiments: FP. Analyzed the data: FP FV JT. Contributed reagents/materials/analysis tools: JT AP. Wrote the paper: FP FV. Critical discussion of the results: AP GM JT FV. Text editing: AP GM JT.

References

1. Deutschman CS, Tracey KJ. Sepsis: current dogma and new perspectives. *Immunity*. 2014 Apr 17; 40(4):463–75. doi: [10.1016/j.immuni.2014.04.001](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.04.001) PMID: [24745331](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24745331/)
2. Angus DC, van der Poll T. Severe Sepsis and Septic Shock. *N Engl J Med*. 2013 Aug 29; 369(9):840–51. doi: [10.1056/NEJMra1208623](https://doi.org/10.1056/NEJMra1208623) PMID: [23984731](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23984731/)
3. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol*. 2011 Jun; 12(6):492–9. PMID: [21739672](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21739672/)
4. Boomer JS, Shuherk-Shaffer J, Hotchkiss RS, Green JM. A prospective analysis of lymphocyte phenotype and function over the course of acute sepsis. *Crit Care* 2012 Jun 28; 16(3):R112. doi: [10.1186/cc11404](https://doi.org/10.1186/cc11404) PMID: [22742734](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22742734/)
5. Guignant C, Lepape A, Huang X, Kherouf H, Denis L, Poitevin F, et al. Programmed death-1 levels correlate with increased mortality, nosocomial infection and immune dysfunctions in septic shock patients. *Crit Care*. 2011; 15(2):R99. doi: [10.1186/cc10112](https://doi.org/10.1186/cc10112) PMID: [21418617](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21418617/)
6. Drewry AM, Samra N, Skrupky LP, Fuller BM, Compton SM, Hotchkiss RS. Persistent lymphopenia after diagnosis of sepsis predicts mortality. *Shock* 2014 Nov; 42(5):383–91. doi: [10.1097/SHK.0000000000000234](https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000234) PMID: [25051284](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25051284/)
7. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2013 Dec; 13(12):862–74. doi: [10.1038/nri3552](https://doi.org/10.1038/nri3552) PMID: [24232462](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24232462/)
8. Poujol F, Monneret G, Friggeri A, Rimmelé T, Malcus C, Poitevin-Later F, et al. Flow cytometric evaluation of lymphocyte transformation test based on 5-ethynyl-2'-deoxyuridine incorporation as a clinical alternative to tritiated thymidine uptake measurement. *J Immunol Methods*. 2014 Dec 15; 415:71–9. doi: [10.1016/j.jim.2014.10.006](https://doi.org/10.1016/j.jim.2014.10.006) PMID: [25450005](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25450005/)
9. Venet F, Lukaszewicz A-C, Payen D, Hotchkiss R, Monneret G. Monitoring the immune response in sepsis: a rational approach to administration of immunoadjuvant therapies. *Curr Opin Immunol*. 2013 May 28; 25(4):477–83. doi: [10.1016/j.coi.2013.05.006](https://doi.org/10.1016/j.coi.2013.05.006) PMID: [23725873](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23725873/)
10. Turrel-Davin F, Venet F, Monnin C, Barbalat V, Cerrato E, Pachot A, et al. mRNA-based approach to monitor recombinant gamma-interferon restoration of LPS-induced endotoxin tolerance. *Crit Care* 2011; 15(5):R252. doi: [10.1186/cc10513](https://doi.org/10.1186/cc10513) PMID: [22027436](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22027436/)
11. Allantaz-Frager F, Turrel-Davin F, Venet F, Monnin C, De Saint Jean A, Barbalat V, et al. Identification of Biomarkers of Response to IFN γ during Endotoxin Tolerance: Application to Septic Shock. Caldwell CC, editor. *PLoS ONE*. 2013 Jul 11; 8(7):e68218. doi: [10.1371/journal.pone.0068218](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068218) PMID: [23874546](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23874546/)
12. Fontaine M, Planel S, Peronnet E, Turrel-Davin F, Piriou V, Pachot A, et al. S100A8/A9 mRNA induction in an ex vivo model of endotoxin tolerance: roles of IL-10 and IFN γ . *PloS One*. 2014; 9(6):e100909. doi: [10.1371/journal.pone.0100909](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100909) PMID: [24956170](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24956170/)
13. Boomer JS, To K, Chang KC, Takasu O, Osborne DF, Walton AH, et al. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA* 2011 Dec 21; 306(23):2594–605. doi: [10.1001/jama.2011.1829](https://doi.org/10.1001/jama.2011.1829) PMID: [22187279](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22187279/)
14. Muszynski JA, Nofziger R, Greathouse K, Steele L, Hanson-Huber L, Nateri J, et al. Early adaptive immune suppression in children with septic shock: a prospective observational study. *Crit Care*. 2014; 18(4):R145. doi: [10.1186/cc13980](https://doi.org/10.1186/cc13980) PMID: [25005517](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25005517/)
15. Schwab R, Crow MK, Russo C, Weksler ME. Requirements for T cell activation by OKT3 monoclonal antibody: role of modulation of T3 molecules and interleukin 1. *J Immunol*. 1985 Jan 9; 135(3):1714–8. PMID: [3926880](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3926880/)
16. Chang TW, Testa D, Kung PC, Perry L, Dreskin HJ, Goldstein G. Cellular origin and interactions involved in gamma-interferon production induced by OKT3 monoclonal antibody. *J Immunol*. 1982 Feb; 128(2):585–9. PMID: [6172498](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6172498/)

17. Kawakami K, Yamamoto Y, Kakimoto K, Onoue K. Requirement for delivery of signals by physical interaction and soluble factors from accessory cells in the induction of receptor-mediated T cell proliferation. Effectiveness of IFN-gamma modulation of accessory cells for physical interaction with T cells. *J Immunol.* 1989 Mar 15; 142(6):1818–25. PMID: [2493498](#)
18. Manzo C, Ruggiero G, Vecchio L del, Racioppi L, Pirozzi G, Temponi M, et al. Monoclonal antibody OKT3-induced T cell proliferation: Differential role of HLA class II determinants expressed by T cells and monocytes. *Cell Immunol.* 1990 Jan; 125(1):79–91. PMID: [1688405](#)
19. Venet F, Foray A-P, Villars-Méchin A, Malcus C, Poitevin-Later F, Lepape A, et al. IL-7 restores lymphocyte functions in septic patients. *J Immunol.* 2012 Nov 15; 189(10):5073–81. doi: [10.4049/jimmunol.1202062](#) PMID: [23053510](#)
20. Monneret G, Venet F, Kullberg B-J, Netea MG. ICU-acquired immunosuppression and the risk for secondary fungal infections. *Med Mycol.* 2011 Apr 1; 49(S1):S17–23.
21. Heininger A, Haerberle H, Fischer I, Beck R, Riessen R, Rohde F, et al. Cytomegalovirus reactivation and associated outcome of critically ill patients with severe sepsis. *Crit Care.* 2011; 15(2):R77. doi: [10.1186/cc10069](#) PMID: [21362193](#)
22. Manjuck J, Saha DC, Astiz M, Eales LJ, Rackow EC. Decreased response to recall antigens is associated with depressed costimulatory receptor expression in septic critically ill patients. *J Lab Clin Med.* 2000 Feb; 135(2):153–60. PMID: [10695660](#)
23. Inoue S, Suzuki K, Komori Y, Morishita Y, Suzuki-Utsunomiya K, Hozumi K, et al. Persistent inflammation and T cell exhaustion in severe sepsis in the elderly. *Crit Care.* 2014; 18(3):R130. doi: [10.1186/cc13941](#) PMID: [24962182](#)
24. Venet F, Chung C-S, Kherouf H, Geeraert A, Malcus C, Poitevin F, et al. Increased circulating regulatory T cells (CD4(+)CD25 (+)CD127 (-)) contribute to lymphocyte anergy in septic shock patients. *Intensive Care Med.* 2009 Apr; 35(4):678–86. doi: [10.1007/s00134-008-1337-8](#) PMID: [18946659](#)
25. Gomez HG, Gonzalez SM, Londoño JM, Hoyos NA, Niño CD, Leon AL, et al. Immunological characterization of compensatory anti-inflammatory response syndrome in patients with severe sepsis: a longitudinal study*. *Crit Care Med.* 2014 Apr; 42(4):771–80.
26. Reynolds JM, Dong C. Toll-like receptor regulation of effector T lymphocyte function. *Trends Immunol.* 2013 Oct; 34(10):511–9. doi: [10.1016/j.it.2013.06.003](#) PMID: [23886621](#)
27. Lohrmann HP, Novikovs L, Graw RG. Cellular interactions in the proliferative response of human T and B lymphocytes to phytomitogens and allogeneic lymphocytes. *J Exp Med.* 1974 Jun 1; 139(6):1553–67. PMID: [4598019](#)
28. Miller K. The stimulation of human B and T lymphocytes by various lectins. *Immunobiology.* 1983 Aug; 165(2):132–46. PMID: [6354918](#)
29. Cole MS, Anasetti C, Tso JY. Human IgG2 variants of chimeric anti-CD3 are nonmitogenic to T cells. *J Immunol.* 1997 Jan 10; 159(7):3613–21. PMID: [9317161](#)
30. Tough DF, Sun S, Sprent J. T cell stimulation in vivo by lipopolysaccharide (LPS). *J Exp Med.* 1997 Jun 16; 185(12):2089–94. PMID: [9182680](#)
31. Lahn M, Kalataradi H, Mittelstadt P, Pflum E, Vollmer M, Cady C, et al. Early preferential stimulation of gamma delta T cells by TNF-alpha. *J Immunol.* 1998 Jun 1; 160(11):5221–30. PMID: [9605117](#)
32. Maxwell JR, Ruby C, Kerkvliet NI, Vella AT. Contrasting the roles of costimulation and the natural adjuvant lipopolysaccharide during the induction of T cell immunity. *J Immunol.* 2002 May 1; 168(9):4372–81. PMID: [11970979](#)
33. McAleer JP, Zammit DJ, Lefrançois L, Rossi RJ, Vella AT. The Lipopolysaccharide Adjuvant Effect on T Cells Relies on Nonoverlapping Contributions from the MyD88 Pathway and CD11c+ Cells. *J Immunol.* 2007 Nov 15; 179(10):6524–35. PMID: [17982041](#)
34. Vogel SN, Hilfiker ML, Caulfield MJ. Endotoxin-induced T lymphocyte proliferation. *J Immunol.* 1983 Apr; 130(4):1774–9. PMID: [6601137](#)
35. Mattern T, Thanhäuser A, Reiling N, Toellner KM, Duchrow M, Kusumoto S, et al. Endotoxin and lipid A stimulate proliferation of human T cells in the presence of autologous monocytes. *J Immunol.* 1994 Oct 1; 153(7):2996–3004. PMID: [7916368](#)
36. Bismuth G, Duphot M, Theze J. LPS and specific T cell responses: interleukin 1 (IL 1)-independent amplification of antigen-specific T helper (TH) cell proliferation. *J Immunol.* 1985 Mar; 134(3):1415–21. PMID: [2578506](#)
37. Mattern T, Flad H-D, Brade L, Rietschel ET, Ulmer AJ. Stimulation of Human T Lymphocytes by LPS Is MHC Unrestricted, But Strongly Dependent on B7 Interactions. *J Immunol.* 1998 Jan 4; 160(7):3412–8. PMID: [9531301](#)
38. Ulmer AJ, Flad H, Rietschel T, Mattern T. Induction of proliferation and cytokine production in human T lymphocytes by lipopolysaccharide (LPS). *Toxicology.* 2000 Nov 2; 152(1–3):37–45. PMID: [11090938](#)

39. Gelman AE, Zhang J, Choi Y, Turka LA. Toll-like receptor ligands directly promote activated CD4+ T cell survival. *J Immunol*. 2004 May 15; 172(10):6065–73. PMID: [15128790](#)
40. Komai-Koma M, Jones L, Ogg GS, Xu D, Liew FY. TLR2 is expressed on activated T cells as a costimulatory receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Mar 2; 101(9):3029–34. PMID: [14981245](#)
41. Caron G, Duluc D, Frémaux I, Jeannin P, David C, Gascan H, et al. Direct stimulation of human T cells via TLR5 and TLR7/8: flagellin and R-848 up-regulate proliferation and IFN-gamma production by memory CD4+ T cells. *J Immunol*. 2005 Aug 1; 175(3):1551–7. PMID: [16034093](#)
42. Chien EJ, Chien CH, Chen JJ, Wang SW, Hsieh DJ. Bacterial lipopolysaccharide activates protein kinase C, but not intracellular calcium elevation, in human peripheral T cells. *J Cell Biochem*. 2000 Jan; 76(3):404–10. PMID: [10649438](#)
43. Zanin-Zhorov A, Tal-Lapidot G, Cahalon L, Cohen-Sfady M, Pevsner-Fischer M, Lider O, et al. Cutting Edge: T Cells Respond to Lipopolysaccharide Innately via TLR4 Signaling. *J Immunol*. 2007 Jan 7; 179(1):41–4. PMID: [17579019](#)
44. Caramalho I, Lopes-Carvalho T, Ostler D, Zelenay S, Haury M, Demengeot J. Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *J Exp Med*. 2003 Feb 17; 197(4):403–11. PMID: [12591899](#)
45. Wolk K, Döcke W-D, Baehr V von, Volk H-D, Sabat R. Impaired antigen presentation by human monocytes during endotoxin tolerance. *Blood*. 2000 Jul 1; 96(1):218–23. PMID: [10891454](#)
46. Cottalorda A, Verschelde C, Marçais A, Tomkowiak M, Musette P, Uematsu S, et al. TLR2 engagement on CD8 T cells lowers the threshold for optimal antigen-induced T cell activation. *Eur J Immunol*. 2006 Jul; 36(7):1684–93. PMID: [16761317](#)
47. Dominguez-Villar M, Gautron A-S, de Marcken M, Keller MJ, Hafler DA. TLR7 induces anergy in human CD4(+) T cells. *Nat Immunol*. 2015 Jan; 16(1):118–28. doi: [10.1038/ni.3036](#) PMID: [25401424](#)
48. Roger P-M, Hyvernat H, Breittmayer J-P, Dunais B, Dellamonica J, Bernardin G, et al. Enhanced T-cell apoptosis in human septic shock is associated with alteration of the costimulatory pathway. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2009 Jun; 28(6):575–84. doi: [10.1007/s10096-008-0673-5](#) PMID: [19229566](#)
49. Yaqub S, Solhaug V, Vang T, Solberg R, Aasen A, Taskén K, et al. A human whole blood model of LPS-mediated suppression of T cell activation. *Med Sci Monit*. 2003 Mar; 9(3):BR120–6. PMID: [12640334](#)
50. Bryn T, Yaqub S, Mahic M, Henjum K, Aandahl EM, Taskén K. LPS-activated monocytes suppress T-cell immune responses and induce FOXP3+ T cells through a COX-2–PGE2-dependent mechanism. *Int Immunol*. 2008 Feb 1; 20(2):235–45. PMID: [18156149](#)
51. Porichis F, Kwon DS, Zupkosky J, Tighe DP, McMullen A, Brockman MA, et al. Responsiveness of HIV-specific CD4 T cells to PD-1 blockade. *Blood*. 2011 Jul 28; 118(4):965–74. doi: [10.1182/blood-2010-12-328070](#) PMID: [21652684](#)
52. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. *N Engl J Med*. 2012 Jun 2; 366(26):2443–54. doi: [10.1056/NEJMoa1200690](#) PMID: [22658127](#)
53. Brahmandam P, Inoue S, Unsinger J, Chang KC, McDunn JE, Hotchkiss RS. Delayed administration of anti-PD-1 antibody reverses immune dysfunction and improves survival during sepsis. *J Leukoc Biol*. 2010 Jan 8; 88(2):233–40. doi: [10.1189/jlb.0110037](#) PMID: [20483923](#)
54. Chang KC, Burnham C-A, Compton SM, Rasche DP, Mazuski R, Smedonough J, et al. Blockade of the negative co-stimulatory molecules PD-1 and CTLA-4 improves survival in primary and secondary fungal sepsis. *Crit Care*. 2013 May 11; 17(3):R85. doi: [10.1186/cc12711](#) PMID: [23663657](#)
55. Nakagawa Y, Murai T. Staphylococcal Peptidoglycan Suppresses Production of Interleukin-2 by T Cells through a T Cell-Derived Factor Induced by Direct Contact between T Cells and Monocytes. *J Infect Dis*. 2003 Jan 11; 188(9):1284–94. PMID: [14593585](#)
56. Döcke WD, Randow F, Syrbe U, Krausch D, Asadullah K, Reinke P, et al. Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment. *Nat Med*. 1997 Jun; 3(6):678–81. PMID: [9176497](#)
57. Lukaszewicz A-C, Grienay M, Resche-Rigon M, Pirracchio R, Faivre V, Boval B, et al. Monocytic HLA-DR expression in intensive care patients: interest for prognosis and secondary infection prediction. *Crit Care Med*. 2009 Oct; 37(10):2746–52. doi: [10.1097/CCM.0b013e3181ab858a](#) PMID: [19707128](#)
58. Leentjens J, Kox M, Koch RM, Preijers F, Joosten LAB, van der Hoeven JG, et al. Reversal of immunoparalysis in humans in vivo: a double-blind, placebo-controlled, randomized pilot study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012 Nov 1; 186(9):838–45. doi: [10.1164/rccm.201204-0645OC](#) PMID: [22822024](#)

IV - Ex vivo evaluation of IL-10 role in sepsis-induced T cell alterations

IV.1 - Contexte

Le modèle de priming par LPS récapitule des mécanismes indirects probablement impliqués dans les ALIS. Or les altérations lymphocytaires observées lors des syndromes septiques sont observées en réponse à des stimulants indépendants de la présence de cellules accessoires, ce qui suggère l'existence conjointe de mécanismes directs d'atteinte des lymphocytes T.

De nombreuses études ont montré que l'IL-10 est libérée de manière systémique chez les patients septiques lors de l'orage cytokinique. Or l'IL-10 est une cytokine immunosuppressive, capable d'agir sur les lymphocytes T comme sur les cellules présentatrices d'antigène (CPA) en diminuant leur production de cytokines et leur expression des récepteurs de co-stimulation.

Nous avons donc étudié le rôle de l'IL-10 dans l'induction de dysfonctions lymphocytaires.

IV.2 - Description de l'étude

Le but de cette étude était (i) d'évaluer l'effet des plasmas de patients septiques, présentant une concentration en IL-10 plus élevée que les plasmas de volontaires sains, sur la réponse proliférative des lymphocytes T à une stimulation *ex-vivo*, (ii) d'évaluer la capacité de l'IL-10 à induire des altérations lymphocytaires fonctionnelles similaires aux ALIS.

IV.3 - Conclusion

Nous avons montré que le blocage de l'IL-10, présente à des taux élevés dans les plasmas de patients septiques, améliorerait la réponse proliférative des lymphocytes T incubés en présence de ces plasmas. Nous avons montré que le priming de PBMC par l'IL-10 altérerait la prolifération et la production de cytokines effectrices (IL-2, IFN γ),

indépendamment de la présence de cellules accessoires. Ce modèle est donc susceptible de récapituler des mécanismes directs impliqués dans le développement des ALIS.

Ex vivo evaluation of IL-10 role in sepsis-induced T cell alterations

Fanny Poujol*, Guillaume Monneret*†, Alexandre Pachot*, Julien Textoris*‡§, Fabienne Venet*†§

**BioMérieux, Joint Research Unit. Hospices Civils de Lyon - bioMérieux, Hôpital Edouard Herriot, Lyon, France*

†Immunology Laboratory. Hospices Civils de Lyon, Hôpital Edouard Herriot, Lyon, France

‡Anesthesiology and Intensive care department. Hospices Civils de Lyon, Hôpital Edouard Herriot, Lyon, France

§co-senior authors on this manuscript

ABSTRACT

Each year septic syndromes account for billions of deaths worldwide. These syndromes are associated with a profound state of immunosuppression affecting both innate and adaptive immune responses. In particular, T cells display alterations which intensity and duration are associated with increased risk of secondary infections and mortality. However, pathophysiological mechanisms leading to such lymphocyte dysfunctions are not completely understood, although both intrinsic lymphocyte alterations and antigen-presenting cells (APCs) dysfunctions are most likely involved.

The aim of the current study was to evaluate whether IL-10 (an immunosuppressive cytokine released at the systemic level during sepsis) could directly impact lymphocyte function during sepsis.

We observed that blocking increased IL-10 concentration in plasma from septic patients could increase proliferative response of primary T cells from healthy controls incubated with these plasmas. We showed that recombinant human IL-10 priming of PBMC can alter T cell proliferative response to anti-CD2/CD3/CD28 antibody coated beads and PHA, in a dose-dependent way. This priming also significantly decreased T cell secretion of IL-2 and IFN γ following anti-CD2/CD3/CD28 antibody coated beads stimulation. Furthermore, we demonstrated that IL-10 reduction of T cell functionality did not depend on the presence of accessory cells.

We conclude that increased IL-10 production during sepsis most likely participates in intrinsic sepsis-induced T cell alterations. In addition, *ex vivo* priming of PBMC with IL-10 might partly recapitulate direct mechanisms involved in sepsis induction of T cell anergy. The precise mechanisms through which IL-10 acts on T cells in this model remain to be investigated.

INTRODUCTION

Sepsis is the leading cause of death in non-cardiologic intensive care units. It accounts for billions of death worldwide each year ¹; and represents massive expenditures for society, with an estimated cost of \$25 000 to \$50 000 per episode ²⁻⁵. The host immune response plays a leading role in the complex pathophysiology of sepsis.

At first, a hyper-inflammatory phase predominates, characterized by an increased recruitment of immune cells and an important release of soluble mediators including pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α , as well as anti-inflammatory cytokines, such as IL-10 ^{6,7}. To compensate this hyper-inflammatory phase, an anti-inflammatory phase concomitantly develops ^{8,9}, affecting both innate and adaptive immune cells ¹⁰. In particular, T cells undergo a massive apoptosis, and the remaining T cells display a decreased proliferative response and cytokine secretion in response to *ex-vivo* stimulation ¹¹⁻¹³, a decreased expression of CD3 and CD28 receptors ^{14,15}, an increased expression of co-inhibitory receptors CTLA-4 and PD-1 ^{13,16,17} and a reduced TCR repertoire ¹⁸. Importantly, studies showed that the intensity and length of lymphopenia and T cell alterations are associated with increased risk of HAI (healthcare associated infections) and mortality ^{17,19}. Thus, therapeutic interventions targeting sepsis-induced T cell alterations are now considered in the treatment of septic patients ¹⁰.

However pathophysiological mechanisms involved in sepsis induced T cell alterations are not yet fully understood. In particular, a direct implication of the immunosuppressive cytokine IL-10 has never been evaluated. IL-10 immunosuppressive properties have been extensively studied for the past decades. Various studies demonstrated IL-10 ability to reduce cytokine secretion and co-stimulatory receptor expression of monocytes, macrophages and dendritic cells ²⁰⁻²³. Studies also described direct suppressive properties of IL-10 on T cells, but never in the context of septic syndromes ²⁴⁻²⁶.

As numerous studies have reported elevated IL-10 concentrations in septic patients' plasma ²⁷⁻³⁰, we hypothesized that IL-10 may participate in sepsis-associated T cell alterations. As measurement of T cell proliferative response is the standard for T cell functionality characterization, we focused our study on (i) the effect of increased IL-10 concentration in septic plasma on T cell proliferative response (ii) the evaluation of IL-10 ability to induce sepsis-like decrease of T cell functionality in response to *ex-vivo* stimulation.

MATERIAL AND METHODS

Healthy volunteers and patients

Heparinized blood samples from healthy volunteers were obtained from the Etablissement Français du Sang (EFS) (n=32, age = median 40 [IQR(interquartile range)=31-51], gender = 11 females). According to EFS standardized procedures for blood donation, informed consent was obtained from HVs (healthy volunteers) and personal data for blood donors were anonymized at time of blood donation and before blood transfer to our research lab.

Heparinized blood samples from septic shock patients sampled during the day following septic shock onset and with mHLA-DR value below 10 000 AB/C (n=10, age : median=72 [IQR=63-81], gender = 4 females, SOFA : median = 7 [IQR=6-13]) were obtained from a global study on intensive care unit (ICU)-induced immune dysfunctions approved by our Institutional Review Board for ethics (“Comité de Protection des Personnes”) and registered at Ministère Français de la Recherche et de l’Enseignement (#DC-2008-509).

Cell isolation

PBMC (peripheral blood mononuclear cells) were obtained by Ficoll gradient centrifugation.

T cells were isolated through negative selection using the RosetteSep™ Human T Cell Enrichment Cocktail (Stem Cell, Vancouver, Canada), according to manufacturer’s instructions.

T cell purity, evaluated by flow cytometry, was routinely over 95%.

Cell culture

Cells were diluted to working concentration (1×10^6 cells) in complete culture medium: RPMI 1640 (Eurobio, Les Ulis, France) supplemented with 2 mM L-Glutamine (Eurobio), 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Fungizone (Gibco, Life technologies), 20 U/mL penicillin and 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin (Peni 10000 UI/Strepto 10000 μg , Eurobio). Complete medium was supplemented with 10% SAB (AB human serum, Life technologies, Carlsbad, CA, USA), unless otherwise stated. Cells were and incubated at 37 °C in humidified 5 % CO₂ atmosphere.

IL-10 blocking in septic patient plasma

Plasma from healthy volunteers and septic patients were stored upon collection at -80°. Cells were incubated overnight with complete media supplemented with 10 % heat-decomplemented

plasma from healthy volunteer or 10 % heat-decomplemented plasma from septic patient in presence or absence of 10 µg/mL isotypic control antibody (mouse monoclonal IgG2B clone 20116, R&D systems, Mineapolis, MN, USA) or 10 µg/mL anti-IL-10 blocking antibody (Human IL-10 antibody clone 25209, R&D systems).

IL-10 priming

Cells were treated overnight with either medium or rhIL-10 concentrations ranging from 0.1 to 10 000 ng/mL (recombinant human IL-10, R&D systems).

IL-10 concentration dosage in plasma

IL-10 plasma concentrations were evaluated by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (Human IL-10 Quantikine kit, R&D systems) on duplicates of 200 µL of plasma, according to manufacturer's instructions. When values were below detection level of the assay, the value of zero was assigned for analysis purposes.

T cell proliferation assay

T cells were stimulated 72h at 37 °C in humidified 5 % CO₂ atmosphere with one of the following stimulants: anti-CD2/CD3/CD8 antibodies-coated beads (αCD2/3/28-Abs coated beads, T cell activation/expansion kit, Miltenyi Biotec, 1 bead for 2 cells), 4 µg/mL phytohemagglutinin (PHA, Oxoid, UK).

T cell proliferation was then evaluated using the Click-iT® flow cytometry assay (LifeTechnologies, Carlsbad, CA, USA), as previously described³¹. Flow cytometry analyses were performed on a Navios flow cytometer (Beckman Coulter). CD3⁺ cells were first selected among total events based on a monoparametric CD3-APC histogram. Then the percentage of EdU⁺ cells among CD3⁺ cells were measured on a monoparametric EdU-AF488 histogram. For every experiment, a minimum of 2.5x10³ CD3⁺ cells was recorded. Data were analyzed using Kaluza software (version 1.2, Beckman Coulter).

IL-2 and IFNγ concentration dosages in cell supernatants

After PBMC or T cell culture, culture plates were centrifuged, supernatants recovered and stored at -80 °C. All tested supernatants were thawed simultaneously and the Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 8-plex Assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) was performed on 50µL of each

supernatant in duplicates, according to manufacturer's instructions, and processed with a BioPlex 200 (Bio-Rad). Results were analyzed with the BioPlex Manager software 6.1.

Statistics

For each experiment, technical replicates (a minimum of 2 per measurement) were summarized by their mean. Such individual values are presented in the figures. In addition, for each condition, individual values are summarized on the plots by a horizontal line representing the median of a given condition.

For plasma, technical replicates (a minimum of 2 per measurement) were summarized by their mean, replicates on PBMC from healthy volunteers (4 per measurement) were summarized by their median. Such individual values are presented in the figures. In addition, for each condition, individual values are summarized on the plots by a horizontal line representing the median of a given condition.

Unless otherwise stated, non-parametric Wilcoxon paired signed rank test was used to evaluate the significance of quantitative measurements. Mann Whitney test was used to evaluate the significance of quantitative measurements (comparison of IL-10 concentration in plasma from healthy volunteers and septic patients' plasmas). Differences between groups were considered statistically significant for *P*-values lower than 0.05.

RESULTS

Increased IL-10 in septic plasma participates in inhibition of T cell proliferative response.

Our hypothesis is that elevated systemic concentration of IL-10 reached during the cytokine storm after sepsis might play a part in T cell decreased proliferative response after sepsis. Hence we collected plasmas from septic patients during the first 24h following septic shock, a time likely to correspond to the cytokine storm. We verified that IL-10 concentrations were significantly higher in septic patients' than in healthy volunteers' plasma (Figure 1A). Then, we incubated PBMC purified from healthy volunteers' whole blood with septic patients' plasmas in the presence or absence of IL-10 blocking antibody. T cells proliferative response to α CD2/3/28-Abs coated beads was then evaluated. As shown on Figure 1B, we observed that incubation with anti-IL-10 antibody led to a significant increase in proliferative response to α CD2/3/28-Abs coated beads than incubation with isotypic control. Therefore we concluded that IL-10 most likely participates in the decreased T cell proliferative response observed in septic patients.

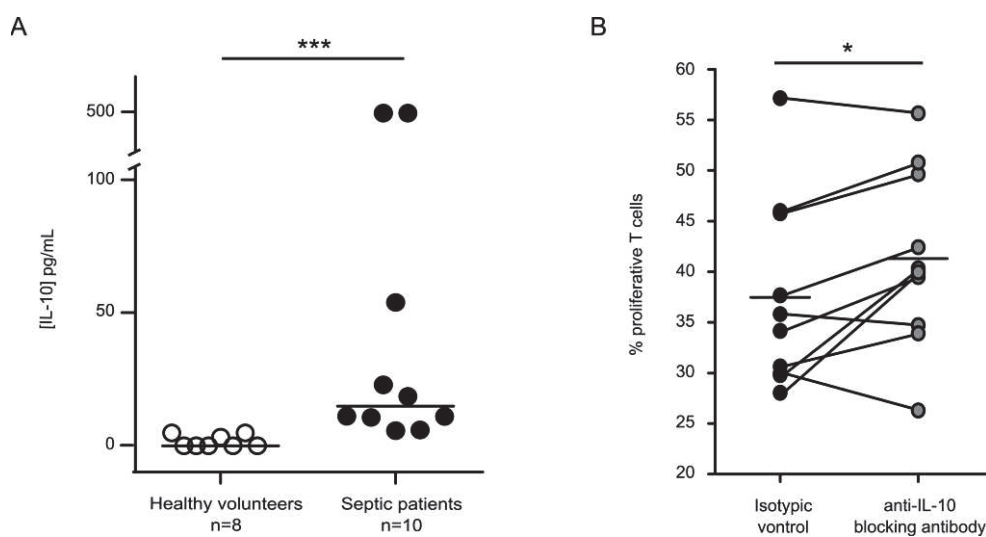


Figure 1 IL-10 blockage in septic patients' plasmas is associated with an increased T cell proliferation

A - IL-10 concentrations were measured in 10 plasmas from septic patients and in 8 plasmas from healthy volunteers. Results are expressed as means of experimental duplicates, and individual values are summarized on the plot by a horizontal line representing the median of a given condition. **B** - PBMC were incubated overnight with septic patients's plasmas (n=10) in presence of anti-IL-10 blocking antibody or isotypic control before stimulation with α CD2/3/28-Abs coated beads. T cell proliferation was measured by flow cytometry and results are expressed as percentages of proliferating cells among total T cells. For each plasma, experiment was performed on PBMC from 2 different healthy volunteers. Results are expressed as median of values obtained for each plasma, and individual plasma values are summarized on the plot by a horizontal line representing the median of a given condition.

IL-10 priming of PBMC decreases T cell proliferation and effector cytokine secretion

We then wondered if IL-10 priming alone could decrease T cell proliferative response to α CD2/3/28-Abs coated beads stimulation. We thus evaluated the effect of IL-10 priming on T cell proliferative response to α CD2/3/28-Abs coated beads in PBMC. IL-10 concentrations ranging from 0.1 to 10 000 ng/mL were evaluated. As shown in Figure 2 we observed that IL-10 priming induced a decrease of T cell proliferative response. Furthermore this decrease was dose-dependent, with a plateau inhibition reached for 100 ng/mL.

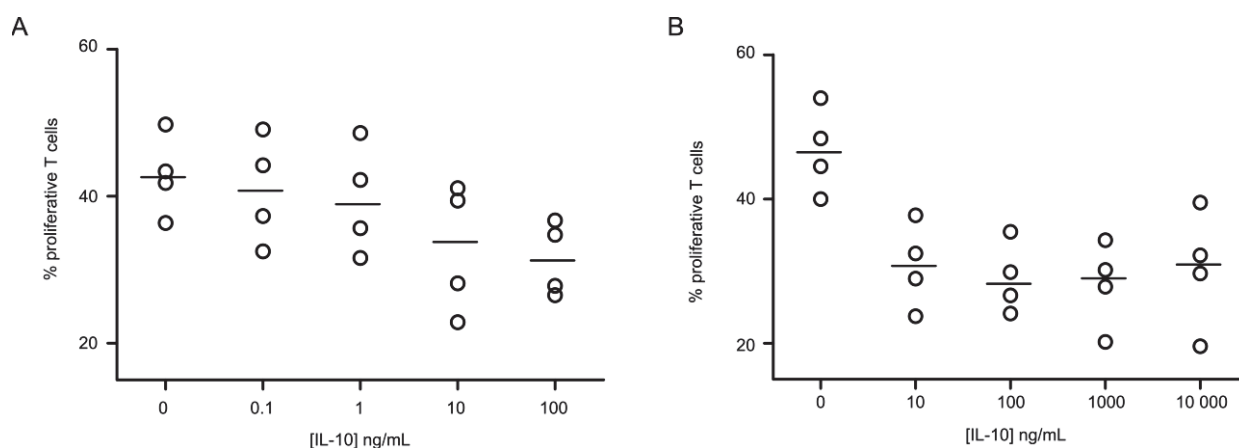


Figure 2 IL-10 dose-dependently decreases T cell proliferative response to α CD2/3/28-Abs coated beads. PBMC were primed overnight with rhIL-10 concentrations ranging from (A) 0.1 ng/mL to 100 ng/mL or (B) 10 ng/mL to 10 000 ng/mL rhIL-10 before stimulation with 0.5×10^6 α CD2/3/28-Abs coated beads /mL. T cell proliferation was measured by flow cytometry and results are expressed as percentages of proliferating cells among total T cells. Each experiment was performed on n=4 HV. Technical replicates were summarized by the mean for each individual. For each condition, individual values are summarized on the plots by a horizontal line representing the mean of a given condition.

In sepsis, the decrease of T cell proliferative response is observed not only in response to anti-CD3/CD28 stimulation¹² but also in response to a mitogenic stimulation such as PHA^{11,16,32}. Thus, we next evaluated the effect of IL-10 priming on T cell proliferative response to PHA.

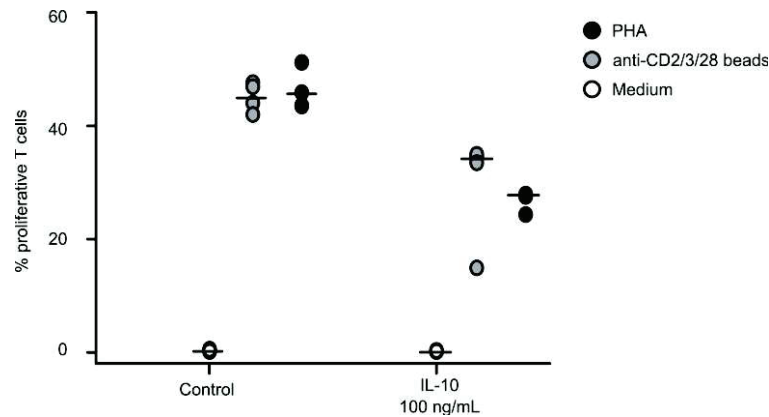


Figure 3 IL-10 decreases T cell proliferative response to α CD2/3/28-Abs coated beads.

PBMC were primed overnight with 100ng/mL rhIL-10 before stimulation with 0.5×10^6 α CD2/3/28-Abs coated beads /mL or 4 μ g/mL PHA. T cell proliferation was measured by flow cytometry and results are expressed as percentages of proliferating cells among total T cells. Each experiment was performed on n=4 HV. Technical replicates were summarized by the mean for each individual. For each condition, individual values are summarized on the plots by a horizontal line representing the mean of a given condition.

Stimulation with α CD2/3/28-Abs coated beads was conducted in parallel, as a control. We observed similar decreases of T cell proliferative responses with both PHA and α CD2/3/28-Abs coated beads. Therefore we concluded that IL-10 effect in decreasing T cell proliferative response was independent of the stimulant.

During sepsis, T cell reduced functionality is reflected by a decrease of both proliferative response and secretion of effector cytokines such as IL-2 and IFN γ ^{12,13,33}. Thus we next evaluated the effect of IL-10 priming of PBMC on T cell secretion of IL-2 and IFN γ in response to α CD2/3/28-Abs coated beads stimulation. As shown in Figure 4, we observed decreased secretion of both IL-2 and IFN γ following IL-10 priming.

Therefore IL-10 priming of PBMC mimics functional T cell alterations seen in sepsis, such as a reduced proliferation and effector cytokine secretion in response to α CD2/3/28-Abs coated beads stimulation.

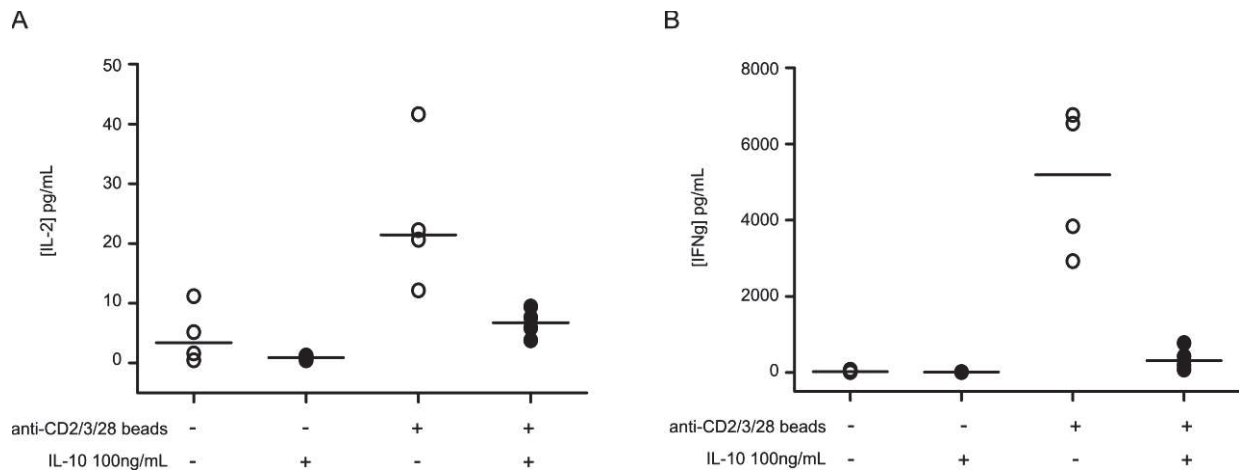


Figure 4 IL-10 priming of PBMC decreases T cell secretion of IL-2 and IFN γ .

PBMC were primed overnight with 100ng/mL rhIL-10 before stimulation with 0.5×10^6 α CD2/3/28-Abs coated beads /mL. IL-2 and IFN γ were measured in supernatants harvested after 72h of α CD2/3/28-Abs coated beads stimulation. Each experiment was performed on n=4 HV. Technical replicates were summarized by the mean for each individual. For each condition, individual values are summarized on the plots by a horizontal line representing the mean of a given condition

IL-10 decreases T cell functionality independently of the presence of accessory cells

IL-10 suppressive effect on accessory cells such as monocytes is well known²⁰⁻²³. Although we used direct T cell stimuli in our first experiments (α CD2/3/28-Abs coated beads and PHA), the role of monocytes in IL-10 effects could not be excluded. Therefore, we verified that IL-10-induced T cell alterations were still observed in isolated T cells.

We primed isolated T cells or PBMC of the same HV with 100 ng/mL recombinant IL-10. Then we stimulated the cells with α CD2/3/28-Abs coated beads and measured T cell proliferative response and secretion of IL-2 and IFN γ . We observed a decrease of T cell proliferative response as well as a decrease of IL-2 and IFN γ secretions after incubation with IL-10 of isolated T-cells (Figure 5) or PBMC of the same HVs (data not shown).

Therefore we concluded that IL-10 could directly decrease T cell functionality independently of accessory cells.

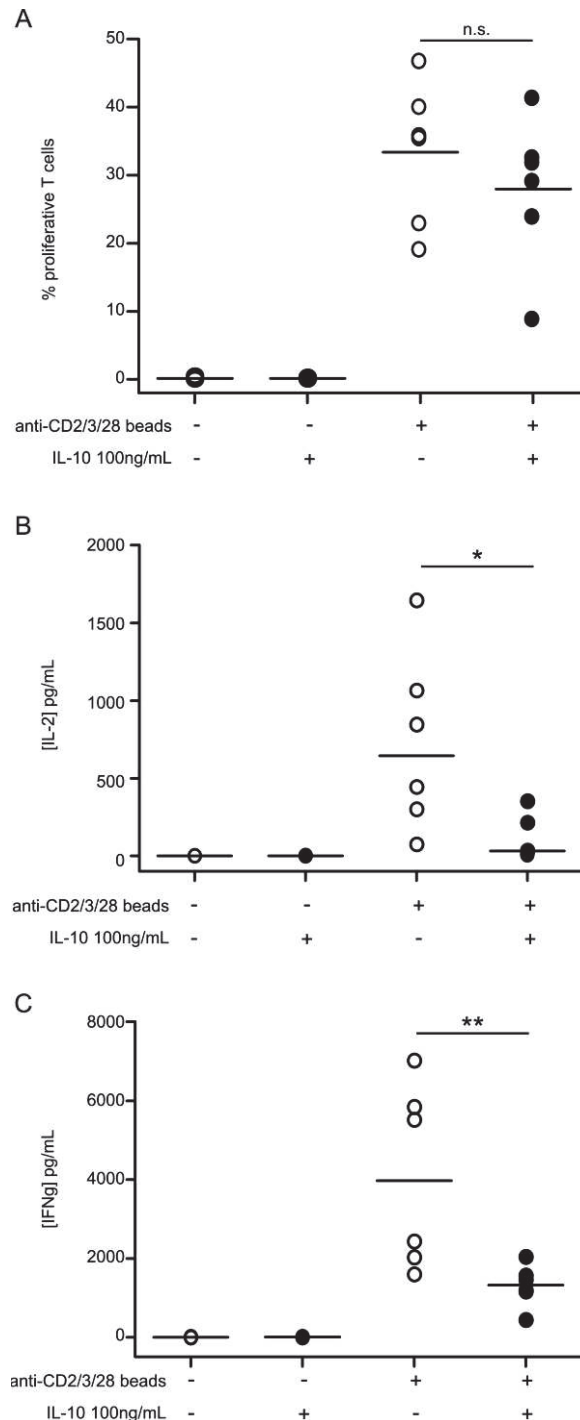


Figure 5. Direct IL-10 inhibitory effect on purified T cells.

Purified T cells were primed overnight with 100ng/mL rhIL-10 before stimulation with 0.5×10^6 α CD2/3/28-Abs coated beads /mL. **A** - T cell proliferation was measured by flow cytometry and results are expressed as percentages of proliferating cells among total T cells. **B & C** - IL-2 and IFN γ were measured in supernatants harvested before performing T cell proliferation assay (i.e. after 72h of incubation). Each experiment was performed on n=6 HV.

Technical replicates were summarized by the mean for each individual. For each condition, individual values are summarized on the plots by a horizontal line representing the mean of a given condition.

DISCUSSION

The immune response after sepsis associates complex mechanisms. At first hyper-inflammation predominates, associated with a massive secretion of cytokines at the systemic level, that may lead to organ failure, septic shock, and early deaths^{6,7}. However, a concomitant immunosuppression develops, affecting both the innate and adaptive sides of the immune response¹⁰. In particular T cells undergo massive apoptosis leading to markedly decreased circulating numbers, followed by an altered phenotype and function¹¹⁻¹³. Those alterations are associated with higher risk of developing secondary infections and higher mortality, which constitutes the rationale for developing new therapeutics targeting T cells^{17,19}.

Both intrinsic mechanisms directly affecting T cells and indirect mechanisms through altered antigen presenting cell functions might participate in the pathophysiology of sepsis-induced T cell alterations. In addition cell-cell interactions or soluble factors might be involved. In this study, we hypothesized that soluble factors, which concentrations are increased during cytokine storm after sepsis, might play a role in sepsis-induced T cell alterations.

Indeed, numerous results from the literature described a massive systemic release of both pro- and anti-inflammatory cytokines such as IL-1, TNF α , IL-6, IL-10 and TGF β immediately after sepsis^{11,28,34,35}. In particular, studies have shown that IL-10 plasmatic concentration is maximum just after sepsis diagnosis and decreases afterwards^{11,36-38}. IL-10 is an anti-inflammatory cytokine well known for its ability to inhibit pro-inflammatory cytokine secretion and co-stimulatory receptor expressions of monocytes, macrophages and dendritic cells^{21-23,39,40}. Its role in sepsis-induced monocyte alterations has been shown previously. In particular, Fumeaux *et al.* incubated leukocytes of healthy volunteers with plasma from septic patients and observed a decrease of HLA-DR monocytic expression⁴¹. Furthermore they observed that IL-10 blocking decreased plasma inhibition of HLA-DR monocytic expression. In a more recent study, Gopinathan *et al.* incubated monocytes of healthy volunteers with plasma from patients suffering

from meningococcal sepsis, in the presence or absence of anti-IL-10 blocking antibody⁴². They observed that IL-10 blocking increased monocyte secretion of IL-1 β , IL-8, TNF α , MIP1 α and MIP1 β . As previous studies outside of the clinical context of sepsis, have also shown a suppressive role of IL-10 on T cell functionality⁴³⁻⁴⁶, we evaluated whether IL-10 could participate in sepsis-induced T cell alterations by directly affecting T lymphocyte effector functions.

We first showed that blocking increased IL-10 concentration in septic patients' plasma was associated with an enhanced T cell proliferation. The immunosuppressive properties of septic patient plasma on healthy immune cells have been studied before⁴⁷⁻⁵². For example Ibboston *et al.*, Kirschenbaum *et al.* and Lewis *et al.* reported that incubation of healthy volunteers' neutrophils with septic patients' plasma increased neutrophil aggregation and ability to bind endothelial cells, similarly to septic patients neutrophils⁴⁷⁻⁴⁹. Belikova *et al.* observed that incubation of healthy volunteers' PBMC with septic patients' plasma led to decreased baseline oxygen consumption similar to the one observed in septic patients' PBMC⁵². However, to our knowledge, this is the first time that the effect of IL-10 blockage in septic patients' plasma on T cell proliferative response is reported. This result supports a direct role for increased IL-10 in reduced T cell proliferation after sepsis. This constituted the clinical rationale for studying more deeply the possible role of IL-10 in T cell dysfunctions.

We further evaluated the effect of IL-10 overnight priming of PBMC on T cell functionality. We observed that IL-10 dose-dependently decreased T cell proliferative response to α CD2/3/28-Abs coated beads. This result is concordant with a previous work of Chakraborty *et al.* in which stimulation of healthy volunteers' diluted blood with PHA in presence of IL-10 led to dose-dependent decrease of T cell proliferative response for IL-10 concentrations ranging from 1 to 100 ng/mL⁵³. In addition, we observed that IL-10 priming of PBMC also induced a decrease of T cell secretion of IL-2 and IFN γ in response to anti-CD2/CD3/CD28-coated beads, similarly to previous results from the literature^{46,54,55}. This similarly reproduces T cells functional alterations observed in sepsis^{12,13,33}. Thus, we concluded that IL-10 priming of PBMC induces alterations of T cell main effector functions as observed in septic patients T cells.

We next hypothesized that IL-10 could act directly on T cells to decrease their effector functions without help from accessory cells. As α CD2/3/28-Abs coated beads directly induce T cell proliferation without help from monocytes, our results showing the inhibitory effect of IL-10 on α CD2/3/28-Abs coated beads induced T cell proliferation rather supports our hypothesis. In addition, this was further confirmed by the observation that IL-10 priming of PBMC induced a decrease of T cell proliferative response to PHA, a mitogen directly targeting T cells. To note, as studies in septic patients report decreased T cell proliferative response to *ex-vivo* stimulation by PHA^{11,16} and by anti-CD3/CD28 antibody coated beads¹², these last results also confirm the clinical relevance of our model. Finally, the direct effect of IL-10 on T cell effector functions was confirmed in a “pure” model of isolated T cells. We showed that IL-10 reduction of T cell functionality could be observed on isolated T cells in concordance with previous results from the literature⁴³⁻⁴⁵. Indeed, we observed a reduced proliferation and cytokine production after priming of isolated T cells with recombinant IL-10. This demonstrates that IL-10 inhibitory effect on T cells is not dependent on accessory cells, suggesting that IL-10 acts at least partially directly on T cells to impact their effector functions.

How precisely IL-10 acts on T cells remains to be determined. Direct inhibition of T cell reactivity has been studied before, and Taylor *et al.* demonstrated that IL-10 could inhibit CD28 and ICOS signalization, thus preventing full activation of T cells following TCR stimulation⁵⁶. In addition, IL-10 can also induce regulatory T cells^{57,58}, also known as inducible T reg, able to inhibit T cell functionality, including T cell proliferative response^{24,26,59}.

Therefore, it would be interesting to evaluate, in a future study, if IL-10 priming of PBMC can recapitulate other sepsis-induced T cell alterations, such as reduced stimulatory receptor expression, increased co-inhibitory receptor expression or increased percentage of Tregs. In particular, inhibitory receptors expression may participate in sepsis-induced immunosuppression. Indeed studies on murine model of sepsis⁶⁰⁻⁶² and on septic patients cells³³ have shown that therapies interfering with PD-1 and/or CTLA-4 interactions may reduce sepsis-induced T cell alterations.

To note, our results do not exclude an indirect role of IL-10 on T cells, for example through the alteration of monocytes accessory cell function. Indeed, indirect mechanisms involved in induction of sepsis-like decreased of T cell proliferative response -through impairment of monocyte functionality- have been described in previous works by Wolk *et al.*⁶³ and by our team (Poujol *et al.*, in publication). Hence IL-10 priming may recapitulate *ex-vivo* both direct and indirect mechanisms involved in sepsis induction of decreased T cell proliferative response.

Additionally, given the complexity of the pathophysiology of sepsis, several other factors are likely to be involved in sepsis induced T cell alterations, such as microbial components (LPS, peptidoglycan, lipotechoic acid), other immune cells (monocytes, regulatory T cells,...) or soluble factors (glucocorticoids, apoptotic bodies, cytokines, ...). Indeed we observed that IL-10 blocking in septic plasma did not fully restored T cell proliferative response, which may be explained by a role of other soluble factors yet to be determined.

In this study we showed for the first time that blockage of increased IL-10 concentration in septic plasma could increase proliferative response of T cells incubated with these plasmas. Furthermore, we showed that IL-10 priming of PBMC can directly alter T cell functionality in a dose-dependent way, independently of the presence of accessory cells. Taken together these results show that increased IL-10 release after sepsis is most likely involved in sepsis-induced decreased T cell functionality through direct and indirect mechanisms. Whether IL-10 may induce other T cell alterations characteristic of sepsis remains to be evaluated in future studies.

REFERENCES

1. Fleischmann, C. *et al.* Global burden of sepsis: a systematic review. *Crit. Care* **19**, P21 (2015).
2. Torio, C. M. & Andrews, R. M. National Inpatient Hospital Costs: The Most Expensive Conditions by Payer, 2011. (2013). at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK169005/>>
3. Moerer, O. *et al.* A German national prevalence study on the cost of intensive care: an evaluation from 51 intensive care units. *Crit. Care Lond. Engl.* **11**, R69 (2007).
4. Schmid, A. *et al.* Burden of illness imposed by severe sepsis in Switzerland. *Swiss Med. Wkly.* **134**, 97–102 (2004).

5. Brun-Buisson, C., Roudot-Thoraval, F., Girou, E., Grenier-Sennelier, C. & Durand-Zaleski, I. The costs of septic syndromes in the intensive care unit and influence of hospital-acquired sepsis. *Intensive Care Med.* **29**, 1464–1471 (2003).
6. Iskander, K. N. *et al.* Sepsis: multiple abnormalities, heterogeneous responses, and evolving understanding. *Physiol. Rev.* **93**, 1247–1288 (2013).
7. Angus, D. C. & van der Poll, T. Severe Sepsis and Septic Shock. *N. Engl. J. Med.* **369**, 840–851 (2013).
8. Novotny, A. R. *et al.* Mixed antagonist response and sepsis severity-dependent dysbalance of pro- and anti-inflammatory responses at the onset of postoperative sepsis. *Immunobiology* **217**, 616–621 (2012).
9. Xiao, W. *et al.* A genomic storm in critically injured humans. *J. Exp. Med.* **208**, 2581–2590 (2011).
10. Hotchkiss, R. S., Monneret, G. & Payen, D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 862–874 (2013).
11. Gomez, H. G. *et al.* Immunological characterization of compensatory anti-inflammatory response syndrome in patients with severe sepsis: a longitudinal study*. *Crit. Care Med.* **42**, 771–780 (2014).
12. Inoue, S. *et al.* Persistent inflammation and T cell exhaustion in severe sepsis in the elderly. *Crit. Care* **18**, R130 (2014).
13. Boomer, J. S., Shuherk-Shaffer, J., Hotchkiss, R. S. & Green, J. M. A prospective analysis of lymphocyte phenotype and function over the course of acute sepsis. *Crit. Care* **16**, R112 (2012).
14. Venet, F. *et al.* Both percentage of gammadelta T lymphocytes and CD3 expression are reduced during septic shock. *Crit. Care Med.* **33**, 2836–2840 (2005).
15. Monserrat, J. *et al.* Clinical relevance of the severe abnormalities of the T cell compartment in septic shock patients. *Crit. Care* **13**, R26 (2009).
16. Venet, F. *et al.* Increased circulating regulatory T cells (CD4(+)CD25 (+)CD127 (-)) contribute to lymphocyte anergy in septic shock patients. *Intensive Care Med.* **35**, 678–686 (2009).
17. Guignant, C. *et al.* Programmed death-1 levels correlate with increased mortality, nosocomial infection and immune dysfunctions in septic shock patients. *Crit. Care* **15**, R99 (2011).
18. Venet, F. *et al.* Decreased T-Cell Repertoire Diversity in Sepsis. *Crit. Care Med.* **41**, 111–119 (2013).
19. Drewry, A. M. *et al.* Persistent lymphopenia after diagnosis of sepsis predicts mortality. *Shock* **42**, 383–391 (2014).
20. Mittal, S. K. & Roche, P. A. Suppression of antigen presentation by IL-10. *Curr. Opin. Immunol.* **34**, 22–27 (2015).
21. Bhattacharyya, S. *et al.* Immunoregulation of dendritic cells by IL-10 is mediated through suppression of the PI3K/Akt pathway and of IkappaB kinase activity. *Blood* **104**, 1100–1109 (2004).
22. Thibodeau, J. *et al.* Interleukin-10-induced MARCH1 mediates intracellular sequestration of MHC class II in monocytes. *Eur. J. Immunol.* **38**, 1225–1230 (2008).
23. Hunt, D. *et al.* Francisella tularensis elicits IL-10 via a PGE₂-inducible factor, to drive macrophage MARCH1 expression and class II down-regulation. *PloS One* **7**, e37330 (2012).

24. Thornton, A. M. & Shevach, E. M. CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J. Exp. Med.* **188**, 287–296 (1998).
25. von Boehmer, H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat. Immunol.* **6**, 338–344 (2005).
26. Nakamura, K., Kitani, A. & Strober, W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J. Exp. Med.* **194**, 629–644 (2001).
27. Wu, H.-P. *et al.* Serial cytokine levels in patients with severe sepsis. *Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc. Al* **58**, 385–393 (2009).
28. Bozza, F. A. *et al.* Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. *Crit. Care* **11**, R49 (2007).
29. Monneret, G. *et al.* The anti-inflammatory response dominates after septic shock: association of low monocyte HLA-DR expression and high interleukin-10 concentration. *Immunol. Lett.* **95**, 193–198 (2004).
30. Hynninen, M. *et al.* Predictive value of monocyte histocompatibility leukocyte antigen-DR expression and plasma interleukin-4 and -10 levels in critically ill patients with sepsis. *Shock* **20**, 1–4 (2003).
31. Poujol, F. *et al.* Flow cytometric evaluation of lymphocyte transformation test based on 5-ethynyl-2'-deoxyuridine incorporation as a clinical alternative to tritiated thymidine uptake measurement. *J. Immunol. Methods* **415**, 71–79 (2014).
32. Roth, G. *et al.* Susceptibility to programmed cell death in T-lymphocytes from septic patients: a mechanism for lymphopenia and Th2 predominance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **308**, 840–846 (2003).
33. Chang, K. *et al.* Targeting the programmed cell death 1: programmed cell death ligand 1 pathway reverses T cell exhaustion in patients with sepsis. *Crit. Care* **18**, R3 (2014).
34. Hillenbrand, A. *et al.* Sepsis induced changes of adipokines and cytokines - septic patients compared to morbidly obese patients. *BMC Surg.* **10**, 26 (2010).
35. Gogos, C. A., Drosou, E., Bassaris, H. P. & Skoutelis, A. Pro- versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options. *J. Infect. Dis.* **181**, 176–180 (2000).
36. Kjaergaard, A. G., Nielsen, J. S., Tønnesen, E. & Krog, J. Expression of NK cell and monocyte receptors in critically ill patients--potential biomarkers of sepsis. *Scand. J. Immunol.* **81**, 249–258 (2015).
37. Lekkou, A., Mouzaki, A., Siagris, D., Ravani, I. & Gogos, C. A. Serum lipid profile, cytokine production, and clinical outcome in patients with severe sepsis. *J. Crit. Care* **29**, 723–727 (2014).
38. Giamarellos-Bourboulis, E. J. *et al.* Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells 1 as an anti-inflammatory mediator in sepsis. *Intensive Care Med.* **32**, 237–243 (2006).
39. Tze, L. E. *et al.* CD83 increases MHC II and CD86 on dendritic cells by opposing IL-10-driven MARCH1-mediated ubiquitination and degradation. *J. Exp. Med.* **208**, 149–165 (2011).
40. Chattopadhyay, G. & Shevach, E. M. Antigen-specific induced T regulatory cells impair dendritic cell function via an IL-10/MARCH1-dependent mechanism. *J. Immunol.* **191**, 5875–5884 (2013).

41. Fumeaux, T. & Pugin, J. Role of interleukin-10 in the intracellular sequestration of human leukocyte antigen-DR in monocytes during septic shock. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **166**, 1475–1482 (2002).
42. Gopinathan, U. *et al.* IL-10 immunodepletion from meningococcal sepsis plasma induces extensive changes in gene expression and cytokine release in stimulated human monocytes. *Innate Immun.* **21**, 429–449 (2015).
43. Taga, K. & Tosato, G. IL-10 inhibits human T cell proliferation and IL-2 production. *J. Immunol.* **148**, 1143–1148 (1992).
44. Del Prete, G. *et al.* Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *J. Immunol.* **150**, 353–360 (1993).
45. Groux, H., Bigler, M., Vries, J. E. de & Roncarolo, M. G. Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4⁺ T cells. *J. Exp. Med.* **184**, 19–29 (1996).
46. Krakauer, T. Differential inhibitory effects of interleukin-10, interleukin-4, and dexamethasone on staphylococcal enterotoxin-induced cytokine production and T cell activation. *J. Leukoc. Biol.* **57**, 450–454 (1995).
47. Ibbotson, G. C. *et al.* Functional alpha4-integrin: a newly identified pathway of neutrophil recruitment in critically ill septic patients. *Nat. Med.* **7**, 465–470 (2001).
48. Kirschenbaum, L. A. *et al.* Importance of platelets and fibrinogen in neutrophil-endothelial cell interactions in septic shock. *Crit. Care Med.* **32**, 1904–1909 (2004).
49. Lewis, S. M. *et al.* Plasma from patients with sepsis up-regulates the expression of CD49d and CD64 on blood neutrophils. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **40**, 724–732 (2009).
50. Burke, P. A. *et al.* Alterations in Ca²⁺ signal transduction in critically ill surgical patients. *Surgery* **116**, 378–386; discussion 386–387 (1994).
51. Guignant, C. *et al.* Increased MerTK expression in circulating innate immune cells of patients with septic shock. *Intensive Care Med.* **39**, 1556–1564 (2013).
52. Belikova, I. *et al.* Oxygen consumption of human peripheral blood mononuclear cells in severe human sepsis. *Crit. Care Med.* **35**, 2702–2708 (2007).
53. Chakraborty, A. & Jusko, W. J. Pharmacodynamic interaction of recombinant human interleukin-10 and prednisolone using in vitro whole blood lymphocyte proliferation. *J. Pharm. Sci.* **91**, 1334–1342 (2002).
54. Perrin, G. Q., Johnson, H. M. & Subramaniam, P. S. Mechanism of Interleukin-10 Inhibition of T-Helper Cell Activation by Superantigen at the Level of the Cell Cycle. *Blood* **93**, 208–216 (1999).
55. Wolk, K., Döcke, W., von Baehr, V., Volk, H. & Sabat, R. Comparison of monocyte functions after LPS- or IL-10-induced reorientation: importance in clinical immunoparalysis. *Pathobiol. J. Immunopathol. Mol. Cell. Biol.* **67**, 253–256 (1999).
56. Taylor, A. *et al.* IL-10 inhibits CD28 and ICOS costimulations of T cells via src homology 2 domain—containing protein tyrosine phosphatase 1. *J. Allergy Clin. Immunol.* **120**, 76–83 (2007).
57. Chen, Z. *et al.* IL-10 and TGF-beta induce alloreactive CD4⁺CD25⁻ T cells to acquire regulatory cell function. *Blood* **101**, 5076–5083 (2003).
58. Asseman, C. & Powrie, F. Interleukin 10 is a growth factor for a population of regulatory T cells. *Gut* **42**, 157–158 (1998).

59. Takahashi, T. *et al.* Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int. Immunol.* **10**, 1969–1980 (1998).
60. Chang, K. C. *et al.* Blockade of the negative co-stimulatory molecules PD-1 and CTLA-4 improves survival in primary and secondary fungal sepsis. *Crit. Care* **17**, R85 (2013).
61. Zhang, Y. *et al.* PD-L1 blockade improves survival in experimental sepsis by inhibiting lymphocyte apoptosis and reversing monocyte dysfunction. *Crit. Care* **14**, R220 (2010).
62. Brahmamdam, P. *et al.* Delayed administration of anti-PD-1 antibody reverses immune dysfunction and improves survival during sepsis. *J. Leukoc. Biol.* **88**, 233–240 (2010).
63. Wolk, K., Döcke, W.-D., Baehr, V. von, Volk, H.-D. & Sabat, R. Impaired antigen presentation by human monocytes during endotoxin tolerance. *Blood* **96**, 218–223 (2000).

DISCUSSION

De nos jours les syndromes septiques restent un problème majeur de santé publique à l'échelle mondiale. L'amélioration de la prise en charge n'a réduit que modérément une mortalité très élevée. Lors d'un sepsis, les patients développent une réponse hyper-inflammatoire, accompagnée d'une réponse compensatrice immunosuppressive. Lorsque cette dernière prédomine, le retour à l'homéostasie est compromis et on observe un état d'immunodépression affectant les pans innés et adaptatifs de la réponse immunitaire ¹⁴⁸. En particulier, en plus d'une réduction importante de leur nombre, due à des phénomènes d'apoptose, les lymphocytes T présentent des altérations lymphocytaires induites par le sepsis (ALIS) : (i) une diminution de la prolifération ^{85,254,256}, (ii) une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-2, IFN γ) et une augmentation de la production de cytokines anti-inflammatoires (IL-10) ^{256,257,261}, (iii) une diminution de l'expression des récepteurs d'activation et de co-stimulation (CD3, CD28), et une augmentation de l'expression des récepteurs inhibiteurs (CTLA-4, PD-1) ^{241,244,254,257}, (iv) une diminution de la diversité du répertoire des TCR ²⁶⁷. La durée et l'intensité de ces altérations sont associées à la survenue d'infections secondaires et à une mortalité plus élevée ^{165,364}. Les ALIS pourraient donc constituer une cible thérapeutique de choix. Néanmoins les mécanismes impliqués dans l'induction des ALIS sont à ce jour mal connus.

Nos travaux de recherche visent à l'amélioration de la compréhension des mécanismes mis en jeu lors du développement des ALIS, à travers le développement de modèles *ex-vivo* récapitulant les caractéristiques principales de ces altérations.

Lors des syndromes septiques, de très nombreux acteurs sont susceptibles de participer à l'établissement et au maintien des ALIS. Les pathogènes eux-mêmes pourraient être impliqués, à travers les cascades d'évènements déclenchées lors de la reconnaissance, par les PRR exprimés par les lymphocytes T, de DAMPs, comme le LPS, le peptidoglycane ou encore l'acide lipotéichoïque. Les autres cellules du système immunitaire peuvent elles aussi jouer un rôle inhibiteur, à travers l'expression de

récepteurs d'inhibition, la sécrétion de cytokines suppressives ou encore une capacité d'interaction réduite. Par ailleurs de nombreux médiateurs solubles sont susceptibles d'altérer les lymphocytes T comme (i) des cytokines, libérées suite à l'activation systémique du système immunitaire (dont l'IL-10), (ii) des alarmines libérées suite aux atteintes tissulaires, (iii) des médiateurs hormonaux comme la norépinephrine, libérés lors de la régulation par le système nerveux central, ou encore (iv) des corps apoptotiques libérés suite à l'apoptose massive de certaines populations cellulaires. Enfin, la prise en charge des patients pourrait elle aussi prendre part à l'établissement des ALIS, à travers l'administration de molécules susceptibles d'interagir directement avec les cellules immunitaires (anti-inflammatoires) ou avec des systèmes interconnectés comme le système nerveux central ou le système de la coagulation. La Figure 18 résume les potentiels mécanismes impliqués dans l'ALIS.

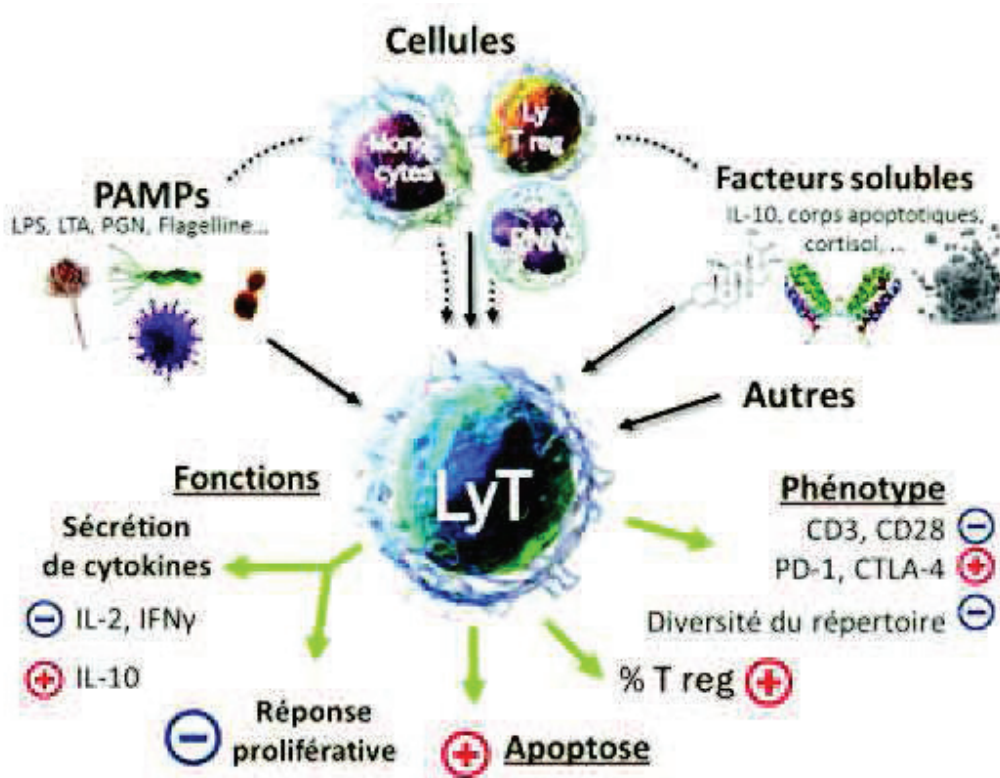


Figure 18. Mécanismes possibles d'induction des ALIS

Dans un premier temps nous avons développé un modèle *ex-vivo* inspiré du modèle de tolérance à l'endotoxine. Ce modèle mime les infections à gram négatif par la pré-incubation de PBMC en présence de LPS. La fonctionnalité des lymphocytes T est ensuite évaluée à travers leur réponse à une stimulation. Nous avons observé que la stimulation des lymphocytes T par un anticorps anti-CD3 (OKT3) n'entraînait l'activation des lymphocytes T qu'en présence de monocytes capables de fournir des signaux de co-stimulation. Or nous avons montré, en accord avec des résultats de la littérature, que la pré-incubation de PBMC en présence de LPS altère la fonctionnalité des monocytes¹⁹³. En particulier, ils ne sont plus en mesure de fournir un signal de co-stimulation suffisant pour permettre la prolifération ou la production d'IFN γ par les lymphocytes T en réponse à une stimulation par OKT3.

Nos travaux soulignent l'existence de mécanismes indirects impliqués dans l'induction des ALIS. Des études ont en effet mis en évidence une diminution de l'expression des récepteurs de co-stimulation par les monocytes des patients septiques^{161,162}. Or il a été montré qu'une activation des lymphocytes T en l'absence de signaux de co-stimulation pouvait induire un état anergique^{299,300,303}. Lors des syndromes septiques les lymphocytes interagissent avec des monocytes fournissant des signaux de co-stimulation réduits, donc susceptibles d'induire un état d'anergie. Ce phénomène pourrait expliquer en partie la diminution de prolifération et de production de cytokines pro-inflammatoires observées en réponse à une stimulation *ex-vivo*.

Par ailleurs, des études ont montré que l'agrégation de nombreuses molécules de TCR est nécessaire à la formation et la stabilisation des synapses immunologiques³⁶⁵⁻³⁶⁷. Or, les monocytes^{85,154,156} et les cellules dendritiques^{224,230} de patients septiques expriment un nombre plus faible de molécules de CMH-II, réduisant le nombre de complexes TCR/peptide/CMH-II pouvant se former à la surface des lymphocytes. De plus, l'expression des molécules de co-stimulation est elle aussi réduite à la surface des monocytes^{161,162} et des cellules dendritiques^{228,229}, comme à la surface des lymphocytes T^{242,243} de patients septiques. Or, les interactions des récepteurs de co-stimulation participent à la stabilisation de la synapse immunologique³⁶⁸. Il est donc possible que,

durant les syndromes septiques, les synapses immunologiques formées entre lymphocytes et cellules présentatrices d'antigènes soient moins stables. Ceci conduirait à des activations du TCR plus courtes, susceptibles d'entraîner l'établissement d'un état anergique ^{306,307}.

Outre des mécanismes indirects, des mécanismes directs sont très probablement mis en jeu dans l'établissement des ALIS. En effet la diminution de réponse proliférative des lymphocytes T de patients septiques est observée quel que soit le stimulant utilisé, notamment en réponse à des stimulants dont l'action ne dépend pas de la présence de cellules accessoires. Ceci suggère une atteinte directe des lymphocytes T.

L'IL-10 est une cytokine immunosuppressive libérée au niveau systémique lors des syndromes septiques. Nous avons montré que le blocage de l'IL-10 lors de l'incubation de PBMC en présence de plasmas de patients septiques augmentait la réponse proliférative des lymphocytes T. Ceci soutient l'hypothèse d'une participation de l'IL-10 dans l'induction des ALIS et constitue le rationnel pour étudier l'effet de l'IL-10 sur les lymphocytes T. Nous avons observé qu'une pré-incubation de PBMC en présence d'IL-10 induit une diminution de la fonctionnalité de lymphocytes T, notamment en réponse à des stimulants indépendants de la présence de cellules accessoires. Ceci appuie l'existence d'un effet direct de l'IL-10 sur les lymphocytes T.

Plusieurs aspects de ce modèle restent à caractériser. L'existence de phénomènes apoptotiques est à évaluer. Dans la mesure où, lors des syndromes septiques, les lymphocytes T CD4⁺ comme les lymphocytes T CD8⁺ sont affectés, le type de sous-population lymphocytaire affectée devra être identifié. Concernant les mécanismes mis en jeu, il est possible que l'IL-10 agisse directement sur les lymphocytes T, via son récepteur, capable d'inhiber la signalisation associée aux récepteurs de co-stimulation ³⁶⁹. Il est aussi possible que l'IL-10 induise la différenciation de lymphocytes T CD4⁺ en lymphocytes T régulateurs ^{370,371}. Il est à noter que l'existence de mécanismes directs n'exclut pas une action indirecte de l'IL-10 sur les lymphocytes T, via l'inhibition de

l'expression des récepteurs de co-stimulation notamment ³⁷²⁻³⁷⁴. Il sera d'autant plus intéressant d'étudier l'expression des récepteurs inhibiteurs que lors des syndromes septiques on observe une augmentation de l'expression de ces récepteurs par les lymphocytes T (PD-1, CTLA-4, BTLA) ^{161,164,165,266} et de l'expression de leurs corécepteurs sur les cellules accessoires ¹⁶⁴⁻¹⁶⁶.

Nos travaux soulignent la complexité des mécanismes physiopathologiques impliqués dans l'induction des ALIS. Le choix même du terme d'ALIS peut être discuté. En effet on peut se demander si les altérations lymphocytaires induites par le sepsis traduisent en réalité un phénomène d'anergie ou un phénomène d'épuisement.

L'anergie lymphocytaire a principalement été décrite pour des populations de lymphocytes T CD4⁺ alors que l'épuisement lymphocytaire est, lui, décrit uniquement au sein de la population des lymphocytes T CD8⁺. Or lors des syndromes septiques les altérations observées ne sont pas limitées à l'une de ces sous-populations ^{85,243,257}.

Par ailleurs, l'anergie et l'épuisement sont observés pour des échelles de temps différentes. Les divers modèles *in vitro* d'anergie reposent sur des incubations allant de quelques heures à quelques jours, alors que l'épuisement lymphocytaire est observé après plusieurs semaines ou mois. Lors de syndromes septiques les altérations lymphocytaires sont observées dès les premières heures ou jours suivant le diagnostic ^{85,254,257}, suggérant une échelle de temps similaire à celle des phénomènes d'anergie. En accord avec ce constat nous avons démontré, à travers nos deux modèles, que des incubations de quelques heures permettaient d'induire des altérations lymphocytaires similaires à celle observées lors des syndromes septiques. Ceci rapprocherait donc les ALIS de l'anergie lymphocytaire.

Les mécanismes qui entrent en jeu dans l'établissement de l'anergie varient selon le modèle choisi, néanmoins ils reposent le plus souvent sur une stimulation sub-optimale, qu'il s'agisse d'une stimulation trop courte du TCR ou d'une stimulation du TCR en l'absence de signaux de co-stimulation. Nous avons mis en évidence l'importance de l'altération des signaux de co-stimulation fournis par les cellules

accessoires dans la réponse des lymphocytes T. Cette similitude appuie l'analogie entre anergie et ALIS. Cependant nous avons aussi montré un rôle de l'IL-10 dans l'établissement des ALIS. Or des études ont montré une implication de l'IL-10 dans l'épuisement induit par des infections virales, indiquant cette fois des similitudes entre ALIS et épuisement ³⁷⁵⁻³⁷⁹. De plus, lors des syndromes septiques on observe une augmentation de l'expression des corécepteurs inhibiteurs. Or, ces récepteurs inhibiteurs jouent un rôle déterminant lors de l'épuisement lymphocytaire observé dans le contexte des infections virales chroniques ou des cancers ^{380,282,286}, ce qui appuierait une analogie entre ALIS et épuisement. Enfin, des stratégies thérapeutiques ciblant ces récepteurs, initialement développées pour le traitement des cancers ou des infections chroniques ^{341,342,344,345,381}, ont donné des résultats prometteurs chez des modèles murins de sepsis ³⁸²⁻³⁸⁴, et chez l'homme ¹⁶⁴.

Nous pensons qu'étant donné la complexité des mécanismes physiopathologiques gouvernant la réponse immunitaire lors des syndromes septiques, les ALIS ne sont pas le reflet d'une anergie ou d'un épuisement. Elles seraient plutôt la résultante de mécanismes cellulaires similaires à ceux impliqués dans ces deux états lymphocytaires, probablement associés à des mécanismes encore non identifiés à ce jour, qui feront l'objet de futures études. Il pourrait être intéressant d'évaluer un modèle fusionnant les deux modèles que nous avons développés.

Notre compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués dans les ALIS permet de considérer de nouvelles perspectives thérapeutiques. Comme évoqué précédemment, les récepteurs inhibiteurs comme PD-1 ou CTLA-4 semblent jouer un rôle déterminant dans l'ALIS. Les stratégies thérapeutiques ciblant les récepteurs inhibiteurs via l'utilisation d'anticorps bloquants, seuls ou en combinaison, ont montré des résultats encourageants ^{164,382-384}. De plus, l'existence de mécanismes d'altération directe des lymphocytes T supporte le développement de thérapies susceptibles de restaurer les fonctions lymphocytaires. L'administration de cytokines

immunostimulantes, comme l'IL-7 et l'IL-15, est envisagée ^{385,386}. Plus particulièrement, des études sur des modèles murins de sepsis ont montré que l'IL-7 limitait l'apoptose des lymphocytes T, augmentait leur prolifération et leur sécrétion d'IFN γ , et améliorait leur recrutement au niveau du foyer infectieux ^{387,388}. Ces études rapportaient, de plus, une amélioration de la survie des souris traitées par l'IL-7. Venet *et al.* ont montré que le traitement *ex-vivo* de lymphocytes T de patients septiques améliorait leur fonctionnalité ³⁸⁵.

Par ailleurs, la compréhension des mécanismes d'action de l'IL-10 pourrait permettre d'envisager de nouvelles stratégies ciblant, par exemple, des étapes de ces mécanismes. Enfin, nous avons montré qu'un traitement par IFN γ restaurait, dans une certaine mesure, l'expression monocyttaire des récepteurs de co-stimulation, et qu'en conséquence, la réponse proliférative des lymphocytes T à une stimulation OKT3 était elle aussi restaurée. Ceci laisse penser que, bien que cela n'ait pas été étudié à ce jour, les thérapies immunostimulantes ciblant la réponse immunitaire innée (IFN γ , GM-CSF ^{213,389}) pourraient avoir des effets bénéfiques sur la réponse adaptative, notamment à travers l'amélioration de la réactivité des lymphocytes T.

Plus globalement, des études ont montré que des altérations lymphocytaires observées lors de syndromes septiques pouvaient être observées chez des patients présentant un état inflammatoire non septique, suite à une agression importante de leur organisme : traumatisme, opération chirurgicale lourde, brûlure. En effet on constate chez ces patients : (i) une lymphopénie ³⁹⁰⁻³⁹⁴, (ii) une diminution de la réponse proliférative à une stimulation *ex-vivo* ³⁹⁴⁻³⁹⁹, (iii) une diminution de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires dont l'IL-2 et l'IFN γ ^{396,400-403}. De plus des études de Kokhaei *et al.* et de Banyopadhyay *et al.* ont mis en évidence une augmentation de l'expression lymphocytaire de PD-1 et de CTLA-4 chez des patients ayant subi une intervention chirurgicale lourde et chez des patients ayant subi un traumatisme mécanique ou thermique, respectivement ^{394,404,405}. Enfin, des études menées sur des

patients brûlés ou traumatisés ont montré une association entre sévérité de l'agression et intensité de ces altérations ^{391,396,406,407}.

Ces éléments laissent supposer que des mécanismes communs régissent les altérations lymphocytaires observées chez les patients septiques, et chez les patients présentant d'importants traumatismes, fortement brûlés ou ayant subi une intervention chirurgicale lourde. L'amélioration de la compréhension des mécanismes en jeu dans l'induction des ALIS et les stratégies thérapeutiques qui en découlent pourraient donc avoir des retombées plus étendues que le seul contexte des syndromes septiques. Appuyant cette hypothèse, des études ont évalué *ex-vivo* l'utilisation de thérapeutiques immuno-adjuvantes par ailleurs envisagées pour le traitement des syndromes septiques ^{404,408}. En particulier, Xu *et al.* ont montré que le traitement *ex-vivo* de PBMC de patients ayant subi une intervention chirurgicale lourde restaurait la réponse proliférative des lymphocytes T ⁴⁰⁴.

Certaines études montrent que des infections virales aiguës peuvent elles aussi conduire à un état d'immunodépression proche de celui observé chez les patients septiques ^{409,410}. Bien que les mécanismes en jeux soient susceptibles de différer, il serait intéressant d'étudier le statut des lymphocytes T dans ces contextes et de le comparer aux ALIS.

Néanmoins les techniques permettant, en clinique, la caractérisation du statut (fonctionnalité et phénotype) lymphocytaire, sont peu nombreuses. A l'heure actuelle l'évaluation du statut des lymphocytes T repose sur l'évaluation de leur prolifération et de leur production de cytokines en réponse à une stimulation *ex-vivo*. Plus spécifiquement, l'évaluation de la réponse proliférative à une stimulation *ex-vivo* constitue le test de référence pour l'évaluation de la fonctionnalité des lymphocytes T en clinique. Pour pouvoir mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques impliqués dans l'ALIS nous avons souhaité disposer d'un test permettant d'étudier au mieux la diminution de la réponse proliférative des lymphocytes T à une stimulation *ex-*

in vivo. Ce test devait être non radioactif, posséder une répétabilité et une reproductibilité semblables à celles des techniques de références, et pouvoir être utilisé en conditions de routine clinique. Ce dernier point est crucial car il facilite la comparaison des résultats obtenus à partir de cellules de volontaires sains avec ceux obtenus à partir de cellules de patients, en limitant au maximum les biais techniques. De plus cela pourrait permettre l'implémentation de ce test dans de futures études cliniques.

Depuis plusieurs décennies, la technique de référence pour la mesure de la réponse proliférative des lymphocytes T, en particulier en clinique, est un test reposant sur l'emploi de thymidine tritiée (= test thymidine) ⁴¹¹⁻⁴¹³, aussi utilisé pour la caractérisation des ALIS ^{254,255}. La thymidine tritiée est ajoutée au milieu de culture des cellules. Les cellules qui prolifèrent l'incorporent et deviennent radioactives, puis cette radioactivité est mesurée par scintillation. L'emploi de la radioactivité requiert un personnel habilité, des équipements particuliers et un traitement des déchets associé à un coût important.

Nous nous sommes tournés vers une technique alternative au test thymidine qui, similairement, repose sur l'incorporation d'un analogue de la thymidine (EdU) par les cellules durant leur prolifération (= test EdU). Une sonde fluorescente est ensuite couplée à l'EdU au sein des cellules et la mesure de la fluorescence associée, par cytométrie en flux, permet d'évaluer la proportion de cellules prolifératives. Nos travaux ont démontré la robustesse de cette technique, qui présente une sensibilité, une reproductibilité et une répétabilité supérieures ou égales à la technique de référence. Une limite importante à la réalisation de tests fonctionnels sur des échantillons de sang de patients septiques est la lymphopénie de ces patients ^{214,243,244}, qui réduit considérablement le nombre de tests ou de répliques réalisables sur un échantillon donné. Or nous avons démontré que le test EdU pouvait être réalisé sur un nombre minimal de cellules moins important que ceux usuellement requis pour le test thymidine. Cette technique est donc particulièrement adaptée à l'étude des ALIS.

Par ailleurs nos travaux ont permis de mettre en évidence l'importance du choix du stimulant lors de l'étude de la réponse proliférative des lymphocytes T à une

stimulation *ex-vivo*, en particulier dans le cadre d'études sur populations cellulaires non isolées. En effet les tests de prolifération lymphocytaire sont le plus souvent réalisés, non pas sur lymphocytes T isolés, mais sur PBMC, couche leucocytaire ou sang total. Or nous avons montré que la réponse proliférative des lymphocytes T à une stimulation par un anticorps anti-CD3 pouvait refléter une atteinte des cellules accessoires plutôt qu'une atteinte directe des lymphocytes T. A l'opposé, la réponse proliférative à la PHA, ou à des billes coatées par des anticorps anti-CD2/CD3/CD28 - stimuli indépendants de la présence de cellules accessoires-, reflète uniquement l'état fonctionnel des lymphocytes T. Il est donc crucial d'adapter le choix du stimulant au type de mécanisme que l'on souhaite évaluer.

En se basant sur nos travaux un laboratoire d'immunologie hospitalier a d'ores et déjà remplacé le test thymidine par le test EdU pour le diagnostic des déficiences immunitaires chez l'enfant. De plus le test EdU sera utilisé comme test de référence pour les tests d'évaluation de la fonctionnalité des lymphocytes T, dans le cadre d'une étude clinique visant à caractériser les altérations immunitaires observées chez des patients ayant subi une « agression » inflammatoire : choc septique, traumatisme grave, ou chirurgie majeure.

L'utilisation d'une technique de cytométrie en flux présente un potentiel intéressant, à travers la possibilité de réaliser des marquages plus complexes, permettant par exemple d'étudier plus en détail les sous-populations lymphocytaires impliquées : lymphocytes auxiliaires, cytotoxiques ou encore régulateurs. Elle pourrait aussi permettre d'évaluer simultanément phénotype et fonctionnalité, par exemple à travers la mesure conjointe de l'état prolifératif et de l'expression de récepteurs clés comme CD3, CD28 ou encore PD-1 ou CTLA-4. Ceci permettrait, d'une part de disposer d'un test unique permettant une caractérisation plus globale du statut lymphocytaire, donc un gain de temps et de volume d'échantillon nécessaire, et d'autre part, de pouvoir comparer fonctionnalité et phénotype en limitant les biais expérimentaux. Si cette approche peut présenter un intérêt dans le cadre de travaux de recherche, elle présente

également des limites en routine clinique. En effet la standardisation des techniques de cytométrie en flux reste à ce jour complexe, qu'il s'agisse de standardisation au cours du temps ou entre différents laboratoires.

Le développement d'outils de caractérisation des ALIS est une étape préalable au développement de thérapies ciblant ces altérations. En effet ces outils permettraient d'identifier les patients susceptibles de bénéficier de telles thérapies ainsi que d'assurer le suivi de l'efficacité de ces thérapies. Un des freins au développement de ce type d'outils est la durée de rendu de résultat des tests fonctionnels actuels, trop élevée pour une utilisation dans le contexte des syndromes septiques. La mesure de la réponse proliférative requiert des incubations allant de 2 à 5 jours, suivant la technique et le type de stimulant utilisé (lectines, anticorps ciblant les récepteurs d'activation des lymphocytes T, anticorps de rappel). Durant un tel laps le statut lymphocytaire peut évoluer. En conséquence le résultat rendu ne reflète pas l'état présent.

Or, outre la réponse proliférative, la production de cytokines est aussi une caractéristique clé de la fonctionnalité des lymphocytes T. La mesure de ce paramètre pourrait permettre d'identifier les lymphocytes anergiques dans des délais plus courts que la mesure de la réponse proliférative (Figure 19). Cette possibilité sera étudiée dans de futurs travaux de recherche.

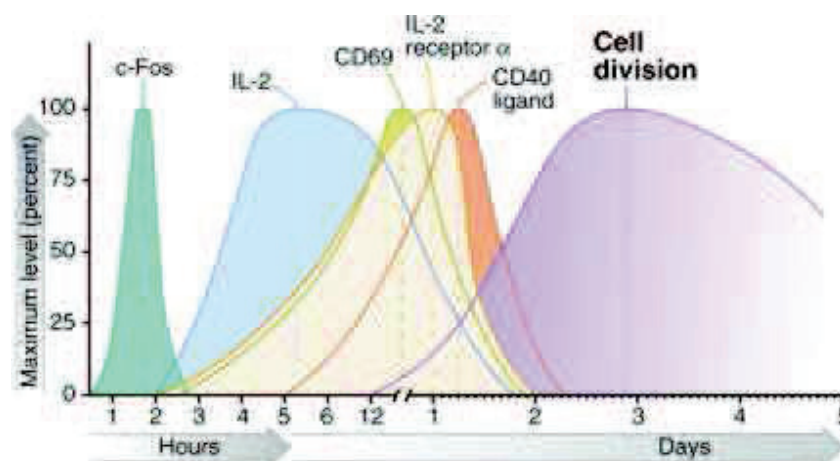


Figure 19 Cinétique de la production de cytokines par des lymphocytes T en réponse à une stimulation antigénique, d'après Abbas et al., Basic Immunology, 4^e, Elsevier

De même, la mise en évidence d'une association forte entre fonctionnalité et phénotype permettrait d'envisager l'identification d'un marqueur phénotypique précoce du statut fonctionnel des lymphocytes T, et donc une caractérisation lymphocytaire plus rapide, puisque ce type de mesure ne nécessite pas d'étape de culture préalable à la mesure.

Le développement de nouvelles technologies plus sensibles ouvre de nouvelles perspectives ^{58,59,414}. En effet, une sensibilité plus élevée permet de détecter plus précocement des événements correspondant à l'activation des lymphocytes T. Les technologies de micro-fluidique, en particulier, permettent de détecter précocement des événements reflétant directement ou indirectement la fonctionnalité des lymphocytes à travers leur réponse proliférative ^{415,416} ou leur production de cytokines ^{417,418}. En plus d'un temps de rendu de résultat plus court, ces tests peuvent être réalisés sur de petits nombres de cellules, de l'ordre 10^4 au lieu de 10^5 ou 10^6 par test ^{417,418}, ce qui constitue un avantage technique important pour l'étude des ALIS.

Pour mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques impliqués dans l'induction des ALIS, et devant les limitations importantes liées à l'étude d'échantillons cliniques (lymphopénie, difficulté d'accès), nous avons fait le choix de développer des modèles *ex-vivo* sur PBMC humains. Or divers modèles animaux de sepsis ont été développés et sont largement utilisés pour étudier les mécanismes physiopathologiques impliqués dans les syndromes septiques, comme pour évaluer le potentiel de nouvelles thérapeutiques.

Le modèle murin de ligature et ponction caecale (CLP) est le plus couramment utilisé, il consiste à ligaturer le caecum juste en dessous de la valve iléocaecale et à réaliser une ponction du caecum ainsi ligaturé à l'aide d'une aiguille ⁴¹⁹. On observe alors une libération systémique de cytokines, concomitante à l'établissement d'une immunodépression compensatoire, et un état cardiovasculaire hyperdynamique ⁴²⁰⁻⁴²⁴. Il existe des biais importants limitant l'extrapolation, à l'homme, de résultats obtenus

grâce à des modèles murins. S'ils présentent des similarités indéniables, les systèmes immunitaires murins et humains présentent aussi des différences à de nombreux niveaux : expression de récepteurs d'activation, différences de distribution des leucocytes circulants, mécanismes d'activation et de différenciation des cellules, entre autres ⁴²⁵. Des exemples de ces différences sont détaillés dans le Tableau 4. De plus Shay *et al.* ont mis en évidence des différences de profil d'expression génique entre granulocytes et lymphocytes murins et humains ⁴²⁶. En plus des limites liées aux différences inter-espèces, les modèles murins ne reflètent pas l'hétérogénéité des patients septiques : variabilité génétique interindividuelle, âge, présence de comorbidités, prise en charge thérapeutique.

<u>Caractère</u>	<u>Souris</u>	<u>Homme</u>
Proportion <u>Neutrophiles</u> : Lymphocytes circulants	10:90 à 25:75	50:50 à 70:30
Expression TLR2 par les Lymphocytes circulants	principalement inducible	constitutive (mais inducible chez les lymphocytes T)
Expression TLR3	DC, macrophages, induite par LPS	DC, pas d'induction par le LPS
Expression TLR9	cellules myéloïdes, DC et lymphocytes B	lymphocytes B, pDC et neutrophiles
Expression TLR10	pseudogène	largement exprimé
Production NO par les macrophages	induite par IFN γ et LPS	induite par IFN α/β
Réponse des lymphocytes T $\gamma\delta$ aux <u>phospho</u> antigènes	non	oui
Expression CD28 sur lymphocyte T	100% des CD4 ⁺ et des CD8 ⁺	80% des CD4 ⁺ et 50% des CD8 ⁺
Effet de B7-H3 sur les lymphocytes T	inhibe l'activation	promeut l'activation
Expression CMH-II par les lymphocytes T	non	oui
Lymphocytes T dépendants des <u>interactions</u> CD2	<u>faible</u>	forte

Tableau 4 Différences entre la souris et l'Homme, adapté de Mestas *et al.*, J Immunol., 2004.

Nous avons choisi de réaliser nos travaux de recherche sur des cellules humaines primaires provenant d'échantillons de sang de volontaires sains. Cette approche permet d'abolir les biais inter-espèces. Elle présente certaines limitations. Notamment, les volontaires sains sont en moyenne plus jeunes que les patients septiques et ne présentent pas de comorbidités. Par ailleurs une importante limitation est l'incapacité de reproduire des mécanismes dépendant de différents compartiments. En effet la réponse immunitaire, lors des syndromes septiques, est la résultante de phénomènes

immunitaires ayant lieu dans différents compartiments (organes lymphoïdes primaires et secondaires, foyers infectieux, circulation). Plus globalement la réponse de l'hôte découle de l'interaction du système immunitaire avec, notamment, le système de la coagulation et le système nerveux central, interactions qui ne peuvent être évaluées par ce type d'approche.

Cependant les modèles *ex-vivo* présentent de nombreux avantages : (i) ils permettent d'obtenir des résultats rapides, (ii) ils peuvent être facilement standardisés, (iii) ils sont accessibles à tous les laboratoires (ne requièrent pas d'animalerie), (iv) ils représentent des coûts bien plus faibles que l'emploi de modèles animaux.

En rendant accessibles de grandes quantités de cellules présentant des caractéristiques fonctionnelles et phénotypiques proches des ALIS, un modèle *ex-vivo* récapitulant les ALIS permettrait l'identification de biomarqueurs de cet état lymphocytaire qui pourraient être ensuite évalués en clinique. Il permettrait aussi le screening rapide de nombreuses molécules thérapeutiques avant leur évaluation sur des modèles animaux.

CONCLUSION

Nos travaux nous ont permis d'obtenir un test d'évaluation de la réponse proliférative des lymphocytes T à une stimulation *ex-vivo*, adapté à l'étude des ALIS, en recherche comme en clinique. Nous avons pu utiliser ce test pour mettre au point un premier modèle *ex-vivo*, qui repose sur la pré-incubation de PBMC en présence de LPS, suivie d'une stimulation spécifique des lymphocytes T via leur TCR. Ce modèle récapitule des mécanismes indirects potentiellement impliqués dans l'induction des ALIS, impliquant les monocytes. Nous avons ensuite mis au point un modèle complémentaire, qui repose sur la pré-incubation de PBMC en présence d'IL-10, suivie d'une stimulation des lymphocytes T par des billes coatées par des anticorps anti-CD2/CD3/CD28. Ce deuxième modèle pourrait reproduire des mécanismes directs et indirects impliqués dans l'induction des ALIS.

De futures études permettront de compléter la caractérisation de ce modèle. L'expression des récepteurs de stimulation (CD3), co-stimulation (CD28) et co-inhibition (CTLA-4, PD-1) sera évaluée. Les sous-populations lymphocytaires affectées (CD4⁺ et/ou CD8⁺) seront identifiées. Enfin, les mécanismes mis en jeu seront eux aussi caractérisés de manière plus approfondie, à travers l'étude de plusieurs hypothèses : induction d'apoptose, action de l'IL-10 sur les voies de signalisation associées aux récepteurs de co-stimulation, induction d'une population de lymphocytes T régulateurs.

Si ce modèle récapitule la plupart des ALIS, il permettra (i) la mise au point de nouveaux tests fonctionnels susceptibles d'être utilisés en clinique pour la caractérisation des ALIS, (ii) la découverte et la validation de nouveaux biomarqueurs des ALIS permettant la stratification des patients, (iii) l'évaluation de nouvelles thérapies ciblant l'ALIS, comme l'IL-7 ou les anticorps anti-PD-1.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Bone, R. C., Sibbald, W. J. & Sprung, C. L. The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. *Chest* **101**, 1481–1483 (1992).
2. Shankar-Hari, M., Deutschman, C. S. & Singer, M. Do we need a new definition of sepsis? *Intensive Care Med.* **41**, 909–911 (2015).
3. Drewry, A. M. & Hotchkiss, R. S. Sepsis: Revising definitions of sepsis. *Nat. Rev. Nephrol.* **11**, 326–328 (2015).
4. Sprung, C. L. *et al.* An evaluation of systemic inflammatory response syndrome signs in the Sepsis Occurrence in Acutely ill Patients (SOAP) study. *Intensive Care Med.* **32**, 421–427 (2006).
5. Cohen, J., Brun-Buisson, C., Torres, A. & Jorgensen, J. Diagnosis of infection in sepsis: an evidence-based review. *Crit. Care Med.* **32**, S466–494 (2004).
6. Kaukonen, K.-M., Bailey, M., Pilcher, D., Cooper, D. J. & Bellomo, R. Systemic Inflammatory Response Syndrome Criteria in Defining Severe Sepsis. *N. Engl. J. Med.* **372**, 1629–1638 (2015).
7. Cohen, J. *et al.* Sepsis: a roadmap for future research. *Lancet Infect. Dis.* **15**, 581–614 (2015).
8. Brun-Buisson, C. Épidémiologie des états septiques graves. *Presse Médicale* **35**, 513–520 (2006).
9. Gaieski, D. F., Edwards, J. M., Kallan, M. J. & Carr, B. G. Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the United States. *Crit. Care Med.* **41**, 1167–1174 (2013).
10. Martin, G. S. Sepsis, severe sepsis and septic shock: changes in incidence, pathogens and outcomes. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **10**, 701–706 (2012).
11. Vincent, J.-L. *et al.* Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit. Care Med.* **34**, 344–353 (2006).

12. Kaukonen, K.-M., Bailey, M., Suzuki, S., Pilcher, D. & Bellomo, R. Mortality related to severe sepsis and septic shock among critically ill patients in Australia and New Zealand, 2000-2012. *JAMA* **311**, 1308–1316 (2014).
13. Tiru, B. *et al.* The Economic and Humanistic Burden of Severe Sepsis. *Pharmacoeconomics* (2015). doi:10.1007/s40273-015-0282-y
14. Levy, M. M. *et al.* Outcomes of the Surviving Sepsis Campaign in intensive care units in the USA and Europe: a prospective cohort study. *Lancet Infect. Dis.* **12**, 919–924 (2012).
15. Martin, G. S., Mannino, D. M., Eaton, S. & Moss, M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N. Engl. J. Med.* **348**, 1546–1554 (2003).
16. Finfer, S. *et al.* Adult-population incidence of severe sepsis in Australian and New Zealand intensive care units. *Intensive Care Med.* **30**, 589–596 (2004).
17. Harrison, D. A., Welch, C. A. & Eddleston, J. M. The epidemiology of severe sepsis in England, Wales and Northern Ireland, 1996 to 2004: secondary analysis of a high quality clinical database, the ICNARC Case Mix Programme Database. *Crit. Care***10**, R42 (2006).
18. Degoricija, V. *et al.* Survival analysis of 314 episodes of sepsis in medical intensive care unit in university hospital: impact of intensive care unit performance and antimicrobial therapy. *Croat. Med. J.* **47**, 385–397 (2006).
19. Fleischmann, C. *et al.* Global burden of sepsis: a systematic review. *Crit. Care* **19**, P21 (2015).
20. Kumar, G. *et al.* NAtionwide trends of severe sepsis in the 21st century (2000-2007). *Chest* **140**, 1223–1231 (2011).
21. Quenot, J.-P. *et al.* The epidemiology of septic shock in French intensive care units: the prospective multicenter cohort EPISS study. *Crit. Care***17**, R65 (2013).
22. Miniño, A. M. Death in the United States, 2009. *NCHS Data Brief* 1–8 (2011).

23. Iwashyna, T. J., Cooke, C. R., Wunsch, H. & Kahn, J. M. Population burden of long-term survivorship after severe sepsis in older Americans. *J. Am. Geriatr. Soc.* **60**, 1070–1077 (2012).
24. Sepsis - Post-Sepsis Syndrome. at
<http://www.sepsisalliance.org/sepsis/post_sepsis_syndrome/>
25. Leligdowicz, A. *et al.* Association between source of infection and hospital mortality in patients who have septic shock. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **189**, 1204–1213 (2014).
26. Vincent, J.-L. *et al.* International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA* **302**, 2323–2329 (2009).
27. Watson, R. S. *et al.* The epidemiology of severe sepsis in children in the United States. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **167**, 695–701 (2003).
28. Wiens, M. O. *et al.* Pediatric sepsis in the developing world: challenges in defining sepsis and issues in post-discharge mortality. *Clin. Epidemiol.* **4**, 319–325 (2012).
29. Bahl, R. *et al.* Research priorities to reduce global mortality from newborn infections by 2015. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **28**, S43–48 (2009).
30. Angus, D. C. *et al.* Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit. Care Med.* **29**, 1303–1310 (2001).
31. Martin, G. S., Mannino, D. M. & Moss, M. The effect of age on the development and outcome of adult sepsis. *Crit. Care Med.* **34**, 15–21 (2006).
32. Yang, Y., Yang, K. S., Hsann, Y. M., Lim, V. & Ong, B. C. The effect of comorbidity and age on hospital mortality and length of stay in patients with sepsis. *J. Crit. Care* **25**, 398–405 (2010).
33. Schoeneberg, C. *et al.* Gender-specific differences in severely injured patients between 2002 and 2011: data analysis with matched-pair analysis. *Crit. Care* **17**, R277 (2013).

34. Nachtigall, I. *et al.* Gender-related outcome difference is related to course of sepsis on mixed ICUs: a prospective, observational clinical study. *Crit. Care* **15**, R151 (2011).
35. Angele, M. K., Pratschke, S., Hubbard, W. J. & Chaudry, I. H. Gender differences in sepsis: cardiovascular and immunological aspects. *Virulence* **5**, 12–19 (2014).
36. Danai, P. A., Moss, M., Mannino, D. M. & Martin, G. S. The epidemiology of sepsis in patients with malignancy. *Chest* **129**, 1432–1440 (2006).
37. Koh, G. C. K. W., Peacock, S. J., van der Poll, T. & Wiersinga, W. J. The impact of diabetes on the pathogenesis of sepsis. *Eur. J. Clin. Microbiol.* **31**, 379–388 (2012).
38. Mayr, F. B. *et al.* Infection rate and acute organ dysfunction risk as explanations for racial differences in severe sepsis. *JAMA* **303**, 2495–2503 (2010).
39. Dombrovskiy, V. Y., Martin, A. A., Sunderram, J. & Paz, H. L. Occurrence and outcomes of sepsis: influence of race. *Crit. Care Med.* **35**, 763–768 (2007).
40. Vogel, T. R. Update and review of racial disparities in sepsis. *Surg. Infect.* **13**, 203–208 (2012).
41. von Bernuth, H. *et al.* Pyogenic bacterial infections in humans with MyD88 deficiency. *Science* **321**, 691–696 (2008).
42. Wang, C., Gui, Q. & Zhang, K. Functional polymorphisms in CD86 gene are associated with susceptibility to pneumonia-induced sepsis. *APMIS* **123**, 433–438 (2015).
43. Pan, W. *et al.* Association between interleukin-10 polymorphisms and sepsis: a meta-analysis. *Epidemiol. Infect.* **143**, 366–375 (2015).
44. Chung, L. P. & Waterer, G. W. Genetic predisposition to respiratory infection and sepsis. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **48**, 250–268 (2011).
45. Joram, N., Lopez, E., Texereau, J. & Mira, J.-P. [Genetic polymorphisms and infections]. *Médecine Mal. Infect.* **36**, 314–321 (2006).

46. Brun-Buisson, C., Roudot-Thoraval, F., Girou, E., Grenier-Sennelier, C. & Durand-Zaleski, I. The costs of septic syndromes in the intensive care unit and influence of hospital-acquired sepsis. *Intensive Care Med.* **29**, 1464–1471 (2003).
47. Torio, C. M. & Andrews, R. M. National Inpatient Hospital Costs: The Most Expensive Conditions by Payer, 2011. (2013). at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK169005/>>
48. Iwashyna, T. J., Ely, E. W., Smith, D. M. & Langa, K. M. Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis. *JAMA* **304**, 1787–1794 (2010).
49. Schaub, N. *et al.* Incremental value of multiplex real-time PCR for the early diagnosis of sepsis in the emergency department. *Swiss Med. Wkly.* **144**, w13911 (2014).
50. Schneiderhan, W., Grundt, A., Wörner, S., Findeisen, P. & Neumaier, M. Work flow analysis of around-the-clock processing of blood culture samples and integrated MALDI-TOF mass spectrometry analysis for the diagnosis of bloodstream infections. *Clin. Chem.* **59**, 1649–1656 (2013).
51. Jordana-Lluch, E. *et al.* Rapid diagnosis of bloodstream infections with PCR followed by mass spectrometry. *PloS One* **8**, e62108 (2013).
52. Funk, D. J. & Kumar, A. Antimicrobial therapy for life-threatening infections: speed is life. *Crit. Care Clin.* **27**, 53–76 (2011).
53. Kumar, A. *et al.* Initiation of inappropriate antimicrobial therapy results in a fivefold reduction of survival in human septic shock. *Chest* **136**, 1237–1248 (2009).
54. Pierrakos, C. & Vincent, J.-L. Sepsis biomarkers: a review. *Crit. Care* **14**, R15 (2010).
55. Gibot, S. *et al.* Combination biomarkers to diagnose sepsis in the critically ill patient. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **186**, 65–71 (2012).
56. Kofoed, K. *et al.* Use of plasma C-reactive protein, procalcitonin, neutrophils, macrophage migration inhibitory factor, soluble urokinase-type plasminogen activator receptor, and

- soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in combination to diagnose infections: a prospective study. *Crit. Care***11**, R38 (2007).
57. McDermott, J. E. *et al.* Challenges in Biomarker Discovery: Combining Expert Insights with Statistical Analysis of Complex Omics Data. *Expert Opin. Med. Diagn.* **7**, 37–51 (2013).
58. Wilson, D. H. *et al.* The Simoa HD-1 Analyzer: A Novel Fully Automated Digital Immunoassay Analyzer with Single-Molecule Sensitivity and Multiplexing. *J. Lab. Autom.* (2015).
59. Rivnak, A. J. *et al.* A fully-automated, six-plex single molecule immunoassay for measuring cytokines in blood. *J. Immunol. Methods* **424**, 20–27 (2015).
60. Kumar, A. *et al.* Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit. Care Med.* **34**, 1589–1596 (2006).
61. Tellor, B. *et al.* Inadequate Source Control and Inappropriate Antibiotics are Key Determinants of Mortality in Patients with Intra-Abdominal Sepsis and Associated Bacteremia. *Surg. Infect.* (2015).
62. Dellinger, R. P. *et al.* Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Crit. Care Med.* **41**, 580–637 (2013).
63. Textoris, J., Wiramus, S., Martin, C. & Leone, M. Overview of antimicrobial therapy in intensive care units. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **9**, 97–109 (2011).
64. Dellinger, R. P. *et al.* Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Crit. Care Med.* **32**, 858–873 (2004).
65. Vincent, J.-L., Serrano, E. C. & Dimoula, A. Current management of sepsis in critically ill adult patients. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **9**, 847–856 (2011).

66. Kawai, T. & Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* **11**, 373–384 (2010).
67. van der Poll, T. & Opal, S. M. Host-pathogen interactions in sepsis. *Lancet Infect. Dis.* **8**, 32–43 (2008).
68. Kang, J.-W., Kim, S.-J., Cho, H.-I. & Lee, S.-M. DAMPs activating innate immune responses in sepsis. *Ageing Res. Rev.* (2015).
69. Chan, J. K. *et al.* Alarmins: awaiting a clinical response. *J. Clin. Invest.* **122**, 2711–2719 (2012).
70. Chen, G. Y. & Nuñez, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 826–837 (2010).
71. Ku, C.-L. *et al.* Selective predisposition to bacterial infections in IRAK-4-deficient children: IRAK-4-dependent TLRs are otherwise redundant in protective immunity. *J. Exp. Med.* **204**, 2407–2422 (2007).
72. Armstrong, L., Medford, A. R. L., Hunter, K. J., Uppington, K. M. & Millar, A. B. Differential expression of Toll-like receptor (TLR)-2 and TLR-4 on monocytes in human sepsis. *Clin. Exp. Immunol.* **136**, 312–319 (2004).
73. Tsujimoto, H. *et al.* Neutrophil elastase, MIP-2, and TLR-4 expression during human and experimental sepsis. *Shock* **23**, 39–44 (2005).
74. Tidswell, M. *et al.* Phase 2 trial of eritoran tetrasodium (E5564), a toll-like receptor 4 antagonist, in patients with severe sepsis. *Crit. Care Med.* **38**, 72–83 (2010).
75. Opal, S. M. *et al.* Effect of eritoran, an antagonist of MD2-TLR4, on mortality in patients with severe sepsis: the ACCESS randomized trial. *JAMA* **309**, 1154–1162 (2013).
76. Fahy, R. J. *et al.* Inflammasome mRNA expression in human monocytes during early septic shock. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **177**, 983–988 (2008).

77. Chan, Y. K. & Gack, M. U. RIG-I-like receptor regulation in virus infection and immunity. *Curr. Opin. Virol.* **12**, 7-14 (2015).
78. Dambuza, I. M. & Brown, G. D. C-type lectins in immunity: recent developments. *Curr. Opin. Immunol.* **32**, 21-27 (2015).
79. Witsell, A. L. & Schook, L. B. Tumor necrosis factor alpha is an autocrine growth regulator during macrophage differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 4754-4758 (1992).
80. Conte, D. *et al.* Inhibitor of apoptosis protein cIAP2 is essential for lipopolysaccharide-induced macrophage survival. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 699-708 (2006).
81. Nakae, H., Endo, S., Inada, K., Takakuwa, T. & Kasai, T. Changes in adhesion molecule levels in sepsis. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* **91**, 329-338 (1996).
82. Shimaoka, M. & Park, E. J. Advances in understanding sepsis. *Eur. J. Anaesthesiol. Suppl.* **42**, 146-153 (2008).
83. Schouten, M., Wiersinga, W. J., Levi, M. & van der Poll, T. Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. *J. Leukoc. Biol.* **83**, 536-545 (2008).
84. Cohen, J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* **420**, 885-891 (2002).
85. Gomez, H. G. *et al.* Immunological characterization of compensatory anti-inflammatory response syndrome in patients with severe sepsis: a longitudinal study*. *Crit. Care Med.* **42**, 771-780 (2014).
86. Hillenbrand, A. *et al.* Sepsis induced changes of adipokines and cytokines - septic patients compared to morbidly obese patients. *BMC Surg.* **10**, 26 (2010).
87. Bozza, F. A. *et al.* Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. *Crit. Care* **11**, R49 (2007).
88. Riché, F. C. *et al.* Inflammatory cytokine response in patients with septic shock secondary to generalized peritonitis. *Crit. Care Med.* **28**, 433-437 (2000).

89. Petersen, A. M. W. & Pedersen, B. K. The anti-inflammatory effect of exercise. *J. Appl. Physiol.* **98**, 1154–1162 (2005).
90. Scheller, J. & Rose-John, S. Interleukin-6 and its receptor: from bench to bedside. *Med. Microbiol. Immunol.* **195**, 173–183 (2006).
91. Park, J. Y. & Pillinger, M. H. Interleukin-6 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Bull. NYU Hosp. Jt. Dis.* **65 Suppl 1**, S4–10 (2007).
92. Borden, E. C. & Chin, P. Interleukin-6: a cytokine with potential diagnostic and therapeutic roles. *J. Lab. Clin. Med.* **123**, 824–829 (1994).
93. van der Poll, T. *et al.* Elimination of interleukin 6 attenuates coagulation activation in experimental endotoxemia in chimpanzees. *J. Exp. Med.* **179**, 1253–1259 (1994).
94. Schindler, R., Gelfand, J. A. & Dinarello, C. A. Recombinant C5a stimulates transcription rather than translation of interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor: translational signal provided by lipopolysaccharide or IL-1 itself. *Blood* **76**, 1631–1638 (1990).
95. Tilg, H., Trehu, E., Atkins, M. B., Dinarello, C. A. & Mier, J. W. Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood* **83**, 113–118 (1994).
96. Umberger, R. *et al.* Exaggerated plasma interleukin 6, interleukin 10, and subsequent development of health care-associated infections in patients with sepsis. *DCCN* **34**, 100–111 (2015).
97. Gouel-Chéron, A. *et al.* Early interleukin-6 and slope of monocyte human leukocyte antigen-DR: a powerful association to predict the development of sepsis after major trauma. *PLoS One* **7**, e33095 (2012).
98. Wu, H.-P. *et al.* Serial cytokine levels in patients with severe sepsis. *Inflamm. Res.* **58**, 385–393 (2009).

99. Kuhns, D. B., Alvord, W. G. & Gallin, J. I. Increased circulating cytokines, cytokine antagonists, and E-selectin after intravenous administration of endotoxin in humans. *J. Infect. Dis.* **171**, 145–152 (1995).
100. Creasey, A. A. *et al.* Endotoxin and cytokine profile in plasma of baboons challenged with lethal and sublethal *Escherichia coli*. *Circ. Shock* **33**, 84–91 (1991).
101. Puccetti, P., Belladonna, M. L. & Grohmann, U. Effects of IL-12 and IL-23 on antigen-presenting cells at the interface between innate and adaptive immunity. *Crit. Rev. Immunol.* **22**, 373–390 (2002).
102. Trinchieri, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 133–146 (2003).
103. Bonecchi, R. *et al.* Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J. Exp. Med.* **187**, 129–134 (1998).
104. Estaquier, J. *et al.* T helper type 1/T helper type 2 cytokines and T cell death: preventive effect of interleukin 12 on activation-induced and CD95 (FAS/APO-1)-mediated apoptosis of CD4⁺ T cells from human immunodeficiency virus-infected persons. *J. Exp. Med.* **182**, 1759–1767 (1995).
105. Weighardt, H. *et al.* Impaired monocyte IL-12 production before surgery as a predictive factor for the lethal outcome of postoperative sepsis. *Ann. Surg.* **235**, 560–567 (2002).
106. Stanilova, S. A. *et al.* High interleukin 12 and low interleukin 10 production after in vitro stimulation detected in sepsis survivors. *Intensive Care Med.* **31**, 401–407 (2005).
107. Wu, H.-P., Shih, C.-C., Lin, C.-Y., Hua, C.-C. & Chuang, D.-Y. Serial increase of IL-12 response and human leukocyte antigen-DR expression in severe sepsis survivors. *Crit. Care* **15**, R224 (2011).

108. Boehm, U., Klamp, T., Groot, M. & Howard, J. C. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 749–795 (1997).
109. Calandra, T. *et al.* Prognostic values of tumor necrosis factor/cachectin, interleukin-1, interferon-alpha, and interferon-gamma in the serum of patients with septic shock. Swiss-Dutch J5 Immunoglobulin Study Group. *J. Infect. Dis.* **161**, 982–987 (1990).
110. Calandra, T., Bernhagen, J., Mitchell, R. A. & Bucala, R. The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. *J. Exp. Med.* **179**, 1895–1902 (1994).
111. Calandra, T., Spiegel, L. A., Metz, C. N. & Bucala, R. Macrophage migration inhibitory factor is a critical mediator of the activation of immune cells by exotoxins of Gram-positive bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 11383–11388 (1998).
112. Mitchell, R. A. *et al.* Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: regulatory role in the innate immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 345–350 (2002).
113. Roger, T., David, J., Glauser, M. P. & Calandra, T. MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4. *Nature* **414**, 920–924 (2001).
114. Bernhagen, J. *et al.* MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nat. Med.* **13**, 587–596 (2007).
115. Calandra, T. & Roger, T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 791–800 (2003).
116. Merk, M. *et al.* The D-dopachrome tautomerase (DDT) gene product is a cytokine and functional homolog of macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, E577–585 (2011).

117. Beishuizen, A., Thijs, L. G., Haanen, C. & Vermes, I. Macrophage migration inhibitory factor and hypothalamo-pituitary-adrenal function during critical illness. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **86**, 2811–2816 (2001).
118. Bosmann, M. & Ward, P. A. The inflammatory response in sepsis. *Trends Immunol.* **34**, 129–136 (2013).
119. Deutschman, C. S. & Tracey, K. J. Sepsis: current dogma and new perspectives. *Immunity* **40**, 463–475 (2014).
120. Tracey, K. J. Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. *J. Clin. Invest.* **117**, 289–296 (2007).
121. Sternberg, E. M. Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 318–328 (2006).
122. Tabardel, Y. *et al.* Corticosteroids increase blood interleukin-10 levels during cardiopulmonary bypass in men. *Surgery* **119**, 76–80 (1996).
123. Rosas-Ballina, M. *et al.* Splenic nerve is required for cholinergic antiinflammatory pathway control of TNF in endotoxemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 11008–11013 (2008).
124. Rosas-Ballina, M. *et al.* Acetylcholine-synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit. *Science* **334**, 98–101 (2011).
125. Andersson, U. & Tracey, K. J. Reflex principles of immunological homeostasis. *Annu. Rev. Immunol.* **30**, 313–335 (2012).
126. Bonaz, B. The cholinergic anti-inflammatory pathway and the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* **133**, 1370–1373 (2007).
127. Barnaby, D. *et al.* Heart rate variability in emergency department patients with sepsis. *Acad. Emerg. Med.* **9**, 661–670 (2002).

128. Guerrero, J., Gatica, H. A., Rodríguez, M., Estay, R. & Goecke, I. A. Septic serum induces glucocorticoid resistance and modifies the expression of glucocorticoid isoforms receptors: a prospective cohort study and in vitro experimental assay. *Crit. Care***17**, R107 (2013).
129. van den Akker, E. L. T. *et al.* Glucocorticoid receptor mRNA levels are selectively decreased in neutrophils of children with sepsis. *Intensive Care Med.* **35**, 1247–1254 (2009).
130. Chu, A. J. Tissue factor, blood coagulation, and beyond: an overview. *Int. J. Inflamm.* **2011**, 367284 (2011).
131. Pawlinski, R. & Mackman, N. Cellular sources of tissue factor in endotoxemia and sepsis. *Thromb. Res.* **125 Suppl 1**, S70–73 (2010).
132. Luo, D. *et al.* Protective roles for fibrin, tissue factor, plasminogen activator inhibitor-1, and thrombin activatable fibrinolysis inhibitor, but not factor XI, during defense against the gram-negative bacterium *Yersinia enterocolitica*. *J. Immunol***187**, 1866–1876 (2011).
133. Huber-Lang, M. *et al.* Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. *Nat. Med.* **12**, 682–687 (2006).
134. Ritis, K. *et al.* A novel C5a receptor-tissue factor cross-talk in neutrophils links innate immunity to coagulation pathways. *J. Immunol***177**, 4794–4802 (2006).
135. Rittirsch, D. *et al.* Functional roles for C5a receptors in sepsis. *Nat. Med.* **14**, 551–557 (2008).
136. Hack, C. E. *et al.* Elevated plasma levels of the anaphylatoxins C3a and C4a are associated with a fatal outcome in sepsis. *Am. J. Med.* **86**, 20–26 (1989).
137. Laudes, I. J. *et al.* Anti-c5a ameliorates coagulation/fibrinolytic protein changes in a rat model of sepsis. *Am. J. Pathol.* **160**, 1867–1875 (2002).
138. Niederbichler, A. D. *et al.* An essential role for complement C5a in the pathogenesis of septic cardiac dysfunction. *J. Exp. Med.* **203**, 53–61 (2006).

139. Huber-Lang, M. *et al.* Role of C5a in multiorgan failure during sepsis. *J. Immunol* **166**, 1193–1199 (2001).
140. Riedemann, N. C. *et al.* Increased C5a receptor expression in sepsis. *J. Clin. Invest.* **110**, 101–108 (2002).
141. Asakura, H. *et al.* Decreased plasma activity of antithrombin or protein C is not due to consumption coagulopathy in septic patients with disseminated intravascular coagulation. *Eur. J. Haematol.* **67**, 170–175 (2001).
142. Iskander, K. N. *et al.* Sepsis: multiple abnormalities, heterogeneous responses, and evolving understanding. *Physiol. Rev.* **93**, 1247–1288 (2013).
143. Hotchkiss, R. S., Monneret, G. & Payen, D. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect. Dis.* **13**, 260–268 (2013).
144. Hotchkiss, R. S. & Karl, I. E. The Pathophysiology and Treatment of Sepsis. *N. Engl. J. Med.* **348**, 138–150 (2003).
145. Xiao, W. *et al.* A genomic storm in critically injured humans. *J. Exp. Med.* **208**, 2581–2590 (2011).
146. Stearns-Kurosawa, D. J., Osuchowski, M. F., Valentine, C., Kurosawa, S. & Remick, D. G. The pathogenesis of sepsis. *Annu. Rev. Pathol.* **6**, 19–48 (2011).
147. Novotny, A. R. *et al.* Mixed antagonist response and sepsis severity-dependent dysbalance of pro- and anti-inflammatory responses at the onset of postoperative sepsis. *Immunobiology* **217**, 616–621 (2012).
148. Hotchkiss, R. S., Monneret, G. & Payen, D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 862–874 (2013).

149. Silva, S. C. *et al.* Evaluation of Toll-like, chemokine, and integrin receptors on monocytes and neutrophils from peripheral blood of septic patients and their correlation with clinical outcomes. *Braz. J. Med.* **47**, 384–393 (2014).
150. Danikas, D. D., Karakantza, M., Theodorou, G. L., Sakellaropoulos, G. C. & Gogos, C. A. Prognostic value of phagocytic activity of neutrophils and monocytes in sepsis. Correlation to CD64 and CD14 antigen expression. *Clin. Exp. Immunol.* **154**, 87–97 (2008).
151. Brunialti, M. K. C. *et al.* TLR2, TLR4, CD14, CD11B, and CD11C expressions on monocytes surface and cytokine production in patients with sepsis, severe sepsis, and septic shock. *Shock***25**, 351–357 (2006).
152. Schaaf, B. *et al.* Mortality in human sepsis is associated with downregulation of Toll-like receptor 2 and CD14 expression on blood monocytes. *Diagn. Pathol.* **4**, 12 (2009).
153. Brandl, K. *et al.* TLR-4 surface display on human monocytes is increased in septic patients. *Eur. J. Med. Res.* **10**, 319–324 (2005).
154. Lukaszewicz, A.-C. *et al.* Monocytic HLA-DR expression in intensive care patients: interest for prognosis and secondary infection prediction. *Crit. Care Med.* **37**, 2746–2752 (2009).
155. Pachot, A. *et al.* Longitudinal study of cytokine and immune transcription factor mRNA expression in septic shock. *Clin. Immunol.* **114**, 61–69 (2005).
156. Monneret, G. *et al.* The anti-inflammatory response dominates after septic shock: association of low monocyte HLA-DR expression and high interleukin-10 concentration. *Immunol. Lett.* **95**, 193–198 (2004).
157. Genel, F., Atlihan, F., Ozsu, E. & Ozbek, E. Monocyte HLA-DR expression as predictor of poor outcome in neonates with late onset neonatal sepsis. *J. Infect.* **60**, 224–228 (2010).

158. Wu, J.-F. *et al.* Changes of monocyte human leukocyte antigen-DR expression as a reliable predictor of mortality in severe sepsis. *Crit. Care***15**, R220 (2011).
159. Hynninen, M. *et al.* Predictive value of monocyte histocompatibility leukocyte antigen-DR expression and plasma interleukin-4 and -10 levels in critically ill patients with sepsis. *Shock***20**, 1-4 (2003).
160. Caille, V. *et al.* Histocompatibility leukocyte antigen-D related expression is specifically altered and predicts mortality in septic shock but not in other causes of shock. *Shock***22**, 521-526 (2004).
161. Roger, P.-M. *et al.* Enhanced T-cell apoptosis in human septic shock is associated with alteration of the costimulatory pathway. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **28**, 575-584 (2009).
162. Mokart, D. *et al.* HLA-DR and B7-2 (CD86) monocyte expressions after major cancer surgery: profile in sepsis. *Minerva Anesthesiol.* **77**, 522-527 (2011).
163. Sinistro, A. *et al.* Downregulation of CD40 ligand response in monocytes from sepsis patients. *Clin. Vaccine Immunol. CVI* **15**, 1851-1858 (2008).
164. Chang, K. *et al.* Targeting the programmed cell death 1: programmed cell death ligand 1 pathway reverses T cell exhaustion in patients with sepsis. *Crit. Care***18**, R3 (2014).
165. Guignant, C. *et al.* Programmed death-1 levels correlate with increased mortality, nosocomial infection and immune dysfunctions in septic shock patients. *Crit. Care* **15**, R99 (2011).
166. Pan, T. *et al.* Notch Signaling Pathway Was Involved in Regulating Programmed Cell Death 1 Expression during Sepsis-Induced Immunosuppression. *Mediators Inflamm.* **2015**, (2015).

167. Manjuck, J., Saha, D. C., Astiz, M., Eales, L. J. & Rackow, E. C. Decreased response to recall antigens is associated with depressed costimulatory receptor expression in septic critically ill patients. *J. Lab. Clin. Med.* **135**, 153–160 (2000).
168. Weiss, M. *et al.* Dissociation of LPS-induced monocytic ex vivo production of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and TNF-alpha in patients with septic shock. *Cytokine* **13**, 51–54 (2001).
169. Astiz, M., Saha, D., Lustbader, D., Lin, R. & Rackow, E. Monocyte response to bacterial toxins, expression of cell surface receptors, and release of anti-inflammatory cytokines during sepsis. *J. Lab. Clin. Med.* **128**, 594–600 (1996).
170. Munoz, C. *et al.* Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. *J. Clin. Invest.* **88**, 1747–1754 (1991).
171. Appoloni, O., Vincent, J.-L. & Duchateau, J. Response of tumour necrosis factor-alpha to delayed in vitro monocyte stimulation in patients with septic shock is related to outcome. *Clin. Sci.* 1979 **102**, 315–320 (2002).
172. Fumeaux, T., Dufour, J., Stern, S. & Pugin, J. Immune monitoring of patients with septic shock by measurement of intraleukocyte cytokines. *Intensive Care Med.* **30**, 2028–2037 (2004).
173. Weighardt, H. *et al.* Sepsis after major visceral surgery is associated with sustained and interferon-gamma-resistant defects of monocyte cytokine production. *Surgery* **127**, 309–315 (2000).
174. Baffari, E. *et al.* Upregulation of the inhibitory receptor ILT4 in monocytes from septic patients. *Hum. Immunol.* **74**, 1244–1250 (2013).
175. Hirsh, M., Mahamid, E., Bashenko, Y., Hirsh, I. & Krausz, M. M. Overexpression of the high-affinity Fcgamma receptor (CD64) is associated with leukocyte dysfunction in sepsis. *Shock* **16**, 102–108 (2001).

176. Skrzeczyńska, J., Kobylarz, K., Hartwich, Z., Zembala, M. & Pryjma, J. CD14+CD16+ monocytes in the course of sepsis in neonates and small children: monitoring and functional studies. *Scand. J. Immunol.* **55**, 629–638 (2002).
177. Döring, M. *et al.* Phagocytic activity of monocytes, their subpopulations and granulocytes during post-transplant adverse events after hematopoietic stem cell transplantation. *Immunobiology* **220**, 605–613 (2015).
178. Spittler, A. *et al.* Relationship between interleukin-6 plasma concentration in patients with sepsis, monocyte phenotype, monocyte phagocytic properties, and cytokine production. *Clin. Infect. Dis.* **31**, 1338–1342 (2000).
179. López-Collazo, E. & Fresno, C. del. Pathophysiology of endotoxin tolerance: mechanisms and clinical consequences. *Crit. Care* **17**, 242 (2013).
180. Cavaillon, J.-M. & Adib-Conquy, M. Bench-to-bedside review: endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. *Crit. Care* **10**, 233 (2006).
181. Beeson, P. B. Development of tolerance to typhoid bacterial pyrogen and its abolition by reticulo-endothelial blockade. *Exp. Biol. Med.* **61**, 248–250 (1946).
182. Greisman, S. E., Hornick, R. B., Wagner, H. N., Woodward, W. E. & Woodward, T. E. The role of endotoxin during typhoid fever and tularemia in man. IV. The integrity of the endotoxin tolerance mechanisms during infection. *J. Clin. Invest.* **48**, 613–629 (1969).
183. Rubenstein, M., Mulholland, J. H., Jeffery, G. M. & Wolff, S. M. MALARIA INDUCED ENDOTOXIN TOLERANCE. *Exp. Biol. Med.* **118**, 283–287 (1965).
184. Dobrovolskaia, M. A. & Vogel, S. N. Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. *Microbes Infect. Inst. Pasteur* **4**, 903–914 (2002).
185. Foster, S. L., Hargreaves, D. C. & Medzhitov, R. Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. *Nature* **447**, 972–978 (2007).

186. Chan, C., Li, L., McCall, C. E. & Yoza, B. K. Endotoxin tolerance disrupts chromatin remodeling and NF-kappaB transactivation at the IL-1beta promoter. *J. Immunol* **175**, 461–468 (2005).
187. Chen, X. *et al.* RelB sustains IkappaBalpha expression during endotoxin tolerance. *Clin. Vaccine Immunol. CVI* **16**, 104–110 (2009).
188. El Gazzar, M. *et al.* Chromatin-specific remodeling by HMGB1 and linker histone H1 silences proinflammatory genes during endotoxin tolerance. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 1959–1971 (2009).
189. Fresno, C. del *et al.* Potent Phagocytic Activity with Impaired Antigen Presentation Identifying Lipopolysaccharide-Tolerant Human Monocytes: Demonstration in Isolated Monocytes from Cystic Fibrosis Patients. *J. Immunol.* **182**, 6494–6507 (2009).
190. Mages, J., Dietrich, H. & Lang, R. A genome-wide analysis of LPS tolerance in macrophages. *Immunobiology* **212**, 723–737 (2007).
191. Draisma, A., Pickkers, P., Bouw, M. P. W. J. M. & van der Hoeven, J. G. Development of endotoxin tolerance in humans in vivo. *Crit. Care Med.* **37**, 1261–1267 (2009).
192. Yoza, B. K. & McCall, C. E. Facultative heterochromatin formation at the IL-1 beta promoter in LPS tolerance and sepsis. *Cytokine* **53**, 145–152 (2011).
193. Wolk, K., Döcke, W.-D., Baehr, V. von, Volk, H.-D. & Sabat, R. Impaired antigen presentation by human monocytes during endotoxin tolerance. *Blood* **96**, 218–223 (2000).
194. O’Neill, L. A. J. & Bowie, A. G. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 353–364 (2007).
195. Biswas, S. K. & Tergaonkar, V. Myeloid differentiation factor 88-independent Toll-like receptor pathway: Sustaining inflammation or promoting tolerance? *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**, 1582–1592 (2007).

196. Akira, S. Innate immunity to pathogens: diversity in receptors for microbial recognition. *Immunol. Rev.* **227**, 5–8 (2009).
197. Yamamoto, M. *et al.* Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* **301**, 640–643 (2003).
198. Fan, H. & Cook, J. A. Molecular mechanisms of endotoxin tolerance. *J. Endotoxin Res.* **10**, 71–84 (2004).
199. Beutler, B. SHIP, TGF-beta, and endotoxin tolerance. *Immunity* **21**, 134–135 (2004).
200. Albrecht, V., Hofer, T. P. J., Foxwell, B., Frankenberger, M. & Ziegler-Heitbrock, L. Tolerance induced via TLR2 and TLR4 in human dendritic cells: role of IRAK-1. *BMC Immunol.* **9**, 69 (2008).
201. Li, L., Cousart, S., Hu, J. & McCall, C. E. Characterization of interleukin-1 receptor-associated kinase in normal and endotoxin-tolerant cells. *J. Biol. Chem.* **275**, 23340–23345 (2000).
202. Nimah, M. *et al.* Contribution of MKP-1 regulation of p38 to endotoxin tolerance. *Shock* **23**, 80–87 (2005).
203. Wiersinga, W. J. *et al.* Immunosuppression associated with interleukin-1R-associated-kinase-M upregulation predicts mortality in Gram-negative sepsis (melioidosis). *Crit. Care Med.* **37**, 569–576 (2009).
204. Xiong, Y. *et al.* Endotoxin tolerance impairs IL-1 receptor-associated kinase (IRAK) 4 and TGF-beta-activated kinase 1 activation, K63-linked polyubiquitination and assembly of IRAK1, TNF receptor-associated factor 6, and IkappaB kinase gamma and increases A20 expression. *J. Biol. Chem.* **286**, 7905–7916 (2011).
205. Quinn, E. M., Wang, J. & Redmond, H. P. The emerging role of microRNA in regulation of endotoxin tolerance. *J. Leukoc. Biol.* **91**, 721–727 (2012).

206. Landoni, V. I. *et al.* Tolerance to lipopolysaccharide promotes an enhanced neutrophil extracellular traps formation leading to a more efficient bacterial clearance in mice. *Clin. Exp. Immunol.* **168**, 153–163 (2012).
207. Mendes, M. E. *et al.* Differential expression of toll-like receptor signaling cascades in LPS-tolerant human peripheral blood mononuclear cells. *Immunobiology* **216**, 285–295 (2011).
208. Escoll, P. *et al.* Rapid up-regulation of IRAK-M expression following a second endotoxin challenge in human monocytes and in monocytes isolated from septic patients. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **311**, 465–472 (2003).
209. Turrel-Davin, F. *et al.* mRNA-based approach to monitor recombinant gamma-interferon restoration of LPS-induced endotoxin tolerance. *Crit. Care***15**, R252 (2011).
210. Heremans, H., Van Damme, J., Dillen, C., Dijkmans, R. & Billiau, A. Interferon gamma, a mediator of lethal lipopolysaccharide-induced Shwartzman-like shock reactions in mice. *J. Exp. Med.* **171**, 1853–1869 (1990).
211. Calvano, S. E. *et al.* A network-based analysis of systemic inflammation in humans. *Nature* **437**, 1032–1037 (2005).
212. Peng, Q., O’Loughlin, J. L. & Humphrey, M. B. DOK3 negatively regulates LPS responses and endotoxin tolerance. *PloS One* **7**, e39967 (2012).
213. Leentjens, J. *et al.* Reversal of immunoparalysis in humans in vivo: a double-blind, placebo-controlled, randomized pilot study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **186**, 838–845 (2012).
214. Park, S. H. *et al.* An extended leukocyte differential count (16 types of circulating leukocytes) using the cytodiff flow cytometric system can provide informations for the discrimination of sepsis severity and prediction of outcome in sepsis patients. *Cytometry B Clin. Cytom.* (2013). doi:10.1002/cytob.21123

215. Drifte, G., Dunn-Siegrist, I., Tissières, P. & Pugin, J. Innate immune functions of immature neutrophils in patients with sepsis and severe systemic inflammatory response syndrome. *Crit. Care Med.* **41**, 820–832 (2013).
216. Hoffmann, J. J. M. L. Neutrophil CD64 as a sepsis biomarker. *Biochem. Medica* **21**, 282–290 (2011).
217. 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**, 202646 (2008).
218. Jämsä, J., Huotari, V., Savolainen, E.-R., Syrjälä, H. & Ala-Kokko, T. Kinetics of leukocyte CD11b and CD64 expression in severe sepsis and non-infectious critical care patients. *Acta Anaesthesiol. Scand.* (2015).
219. Chishti, A. D., Shenton, B. K., Kirby, J. A. & Baudouin, S. V. Neutrophil chemotaxis and receptor expression in clinical septic shock. *Intensive Care Med.* **30**, 605–611 (2004).
220. Tamayo, E. *et al.* Evolution of neutrophil apoptosis in septic shock survivors and nonsurvivors. *J. Crit. Care* **27**, 415.e1–11 (2012).
221. Falkow, S. Is persistent bacterial infection good for your health? *Cell* **124**, 699–702 (2006).
222. Demaret, J. *et al.* Marked alterations of neutrophil functions during sepsis-induced immunosuppression. *J. Leukoc. Biol.* (2015).
223. 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).
224. Riccardi, F. *et al.* Flow cytometric analysis of peripheral blood dendritic cells in patients with severe sepsis. *Cytometry B Clin. Cytom.* **80**, 14–21 (2011).
225. Guisset, O. *et al.* Decrease in circulating dendritic cells predicts fatal outcome in septic shock. *Intensive Care Med.* **33**, 148–152 (2007).

226. Dreschler, K. *et al.* Altered phenotype of blood dendritic cells in patients with acute pneumonia. *Respir. Int. Rev. Thorac. Dis.* **83**, 209–217 (2012).
227. Weber, G. F. *et al.* Analysis of circulating plasmacytoid dendritic cells during the course of sepsis. *Surgery* **158**, 248–254 (2015).
228. Poehlmann, H., Schefold, J. C., Zuckermann-Becker, H., Volk, H.-D. & Meisel, C. Phenotype changes and impaired function of dendritic cell subsets in patients with sepsis: a prospective observational analysis. *Crit. Care* **13**, R119 (2009).
229. Hotchkiss, R. S. *et al.* Depletion of dendritic cells, but not macrophages, in patients with sepsis. *J. Immunol* **168**, 2493–2500 (2002).
230. Elsayh, K. I., Zahran, A. M., Lotfy Mohamad, I. & Aly, S. S. Dendritic cells in childhood sepsis. *J. Crit. Care* **28**, 881.e7–13 (2013).
231. Faivre, V. *et al.* Human Monocytes Differentiate into Dendritic Cells Subsets that Induce Anergic and Regulatory T Cells in Sepsis. *PLoS ONE* **7**, e47209 (2012).
232. Gautier, E. L. *et al.* Enhanced dendritic cell survival attenuates lipopolysaccharide-induced immunosuppression and increases resistance to lethal endotoxic shock. *J. Immunol* **180**, 6941–6946 (2008).
233. Toliver-Kinsky, T. E., Cui, W., Murphey, E. D., Lin, C. & Sherwood, E. R. Enhancement of dendritic cell production by fms-like tyrosine kinase-3 ligand increases the resistance of mice to a burn wound infection. *J. Immunol* **174**, 404–410 (2005).
234. Forel, J.-M. *et al.* Phenotype and functions of natural killer cells in critically-ill septic patients. *PloS One* **7**, e50446 (2012).
235. Venet, F. *et al.* Early assessment of leukocyte alterations at diagnosis of septic shock. *Shock* **34**, 358–363 (2010).

236. Giamarellos-Bourboulis, E. J. *et al.* Early changes of CD4-positive lymphocytes and NK cells in patients with severe Gram-negative sepsis. *Crit. Care***10**, R166 (2006).
237. Holub, M. *et al.* Lymphocyte subset numbers depend on the bacterial origin of sepsis. *Clin. Microbiol. Infect.* **9**, 202–211 (2003).
238. Souza-Fonseca-Guimaraes, F. *et al.* Toll-like receptors expression and interferon- γ production by NK cells in human sepsis. *Crit. Care***16**, R206 (2012).
239. Vantourout, P. & Hayday, A. Six-of-the-best: unique contributions of $\gamma\delta$ T cells to immunology. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 88–100 (2013).
240. Andreu-Ballester, J. C. *et al.* Association of $\gamma\delta$ T cells with disease severity and mortality in septic patients. *Clin. Vaccine Immunol. CVI* **20**, 738–746 (2013).
241. Venet, F. *et al.* Both percentage of gammadelta T lymphocytes and CD3 expression are reduced during septic shock. *Crit. Care Med.* **33**, 2836–2840 (2005).
242. Boomer, J. S. *et al.* Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA* **306**, 2594–2605 (2011).
243. Inoue, S. *et al.* Reduction of immunocompetent T cells followed by prolonged lymphopenia in severe sepsis in the elderly. *Crit. Care Med.* **41**, 810–819 (2013).
244. Monserrat, J. *et al.* Clinical relevance of the severe abnormalities of the T cell compartment in septic shock patients. *Crit. Care***13**, R26 (2009).
245. Le Tulzo, Y. *et al.* Early circulating lymphocyte apoptosis in human septic shock is associated with poor outcome. *Shock* **18**, 487–494 (2002).
246. Hotchkiss, R. S. *et al.* Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. *J. Immunol* **166**, 6952–6963 (2001).
247. Wu, H.-P. *et al.* Associations of T helper 1, 2, 17 and regulatory T lymphocytes with mortality in severe sepsis. *Inflamm. Res.* **62**, 751–763 (2013).

248. Hotchkiss, R. S. *et al.* Accelerated lymphocyte death in sepsis occurs by both the death receptor and mitochondrial pathways. *J. Immunol* **174**, 5110–5118 (2005).
249. Weber, S. U. *et al.* Induction of Bim and Bid gene expression during accelerated apoptosis in severe sepsis. *Crit. Care* **12**, R128 (2008).
250. Hoogerwerf, J. J. *et al.* Gene expression profiling of apoptosis regulators in patients with sepsis. *J. Innate Immun.* **2**, 461–468 (2010).
251. Voll, R. E. *et al.* Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* **390**, 350–351 (1997).
252. Schwulst, S. J. *et al.* Bim siRNA decreases lymphocyte apoptosis and improves survival in sepsis. *Shock***30**, 127–134 (2008).
253. Schwulst, S. J. *et al.* Agonistic monoclonal antibody against CD40 receptor decreases lymphocyte apoptosis and improves survival in sepsis. *J. Immunol* **177**, 557–565 (2006).
254. Venet, F. *et al.* Increased circulating regulatory T cells (CD4(+)/CD25 (+)/CD127 (-)) contribute to lymphocyte anergy in septic shock patients. *Intensive Care Med.* **35**, 678–686 (2009).
255. Roth, G. *et al.* Susceptibility to programmed cell death in T-lymphocytes from septic patients: a mechanism for lymphopenia and Th2 predominance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **308**, 840–846 (2003).
256. Inoue, S. *et al.* Persistent inflammation and T cell exhaustion in severe sepsis in the elderly. *Crit. Care* **18**, R130 (2014).
257. Boomer, J. S., Shuherk-Shaffer, J., Hotchkiss, R. S. & Green, J. M. A prospective analysis of lymphocyte phenotype and function over the course of acute sepsis. *Crit. Care***16**, R112 (2012).

258. Heidecke, C. D., Weighardt, H., Hensler, T., Bartels, H. & Holzmann, B. [Immune paralysis of T-lymphocytes and monocytes in postoperative abdominal sepsis. Correlation of immune function with survival]. *Chir. Z. Für Alle Geb. Oper. Medizen* **71**, 159-165 (2000).
259. Muszynski, J. A. *et al.* Early adaptive immune suppression in children with septic shock: a prospective observational study. *Crit. Care* **18**, R145 (2014).
260. Unsinger, J. *et al.* The role of TCR engagement and activation-induced cell death in sepsis-induced T cell apoptosis. *J. Immunol* **177**, 7968-7973 (2006).
261. Scumpia, P. O. *et al.* Increased natural CD4+CD25+ regulatory T cells and their suppressor activity do not contribute to mortality in murine polymicrobial sepsis. *J. Immunol* **177**, 7943-7949 (2006).
262. Song, G. Y., Chung, C.-S., Rhee, R. J., Cioffi, W. G. & Ayala, A. Loss of signal transducer and activator of transduction 4 or 6 signaling contributes to immune cell morbidity and mortality in sepsis. *Intensive Care Med.* **31**, 1564-1569 (2005).
263. Monserrat, J. *et al.* Clinical relevance of the severe abnormalities of the T cell compartment in septic shock patients. *Crit. Care* **13**, R26 (2009).
264. Chen, L. & Flies, D. B. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 227-242 (2013).
265. Guignant, C. *et al.* Programmed death-1 levels correlate with increased mortality, nosocomial infection and immune dysfunctions in septic shock patients. *Crit. Care* **15**, R99 (2011).
266. Shubin, N. J., Monaghan, S. F., Heffernan, D. S., Chung, C.-S. & Ayala, A. B and T lymphocyte attenuator expression on CD4+ T-cells associates with sepsis and subsequent infections in ICU patients. *Crit. Care* **17**, R276 (2013).

267. Venet, F. *et al.* Decreased T-Cell Repertoire Diversity in Sepsis. *Crit. Care Med.* **41**, 111–119 (2013).
268. Kessel, A., Bamberger, E., Masalha, M. & Toubi, E. The role of T regulatory cells in human sepsis. *J. Autoimmun.* **32**, 211–215 (2009).
269. Monneret, G. *et al.* Marked elevation of human circulating CD4+CD25+ regulatory T cells in sepsis-induced immunoparalysis. *Crit. Care Med.* **31**, 2068–2071 (2003).
270. Venet, F. *et al.* Increased percentage of CD4+CD25+ regulatory T cells during septic shock is due to the decrease of CD4+CD25- lymphocytes. *Crit. Care Med.* **32**, 2329–2331 (2004).
271. Tiemessen, M. M. *et al.* CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 19446–19451 (2007).
272. Li, L. & Wu, C.-Y. CD4+ CD25+ Treg cells inhibit human memory gammadelta T cells to produce IFN-gamma in response to M tuberculosis antigen ESAT-6. *Blood* **111**, 5629–5636 (2008).
273. Zhang, Y. *et al.* Upregulation of programmed death-1 on T cells and programmed death ligand-1 on monocytes in septic shock patients. *Crit. Care* **15**, R70 (2011).
274. Ditschkowski, M. *et al.* HLA-DR expression and soluble HLA-DR levels in septic patients after trauma. *Ann. Surg.* **229**, 246–254 (1999).
275. Walton, A. H. *et al.* Reactivation of Multiple Viruses in Patients with Sepsis. *PLoS ONE* **9**, e98819 (2014).
276. Monneret, G., Venet, F., Kullberg, B.-J. & Netea, M. G. ICU-acquired immunosuppression and the risk for secondary fungal infections. *Med. Mycol.* **49**, S17–S23 (2011).

277. Hall, M. W. *et al.* Immunoparalysis and nosocomial infection in children with multiple organ dysfunction syndrome. *Intensive Care Med.* **37**, 525–532 (2011).
278. Pirquet, C. Das Verhalten der kutanen Tuberkulinreaktion während der Masern. *DMW-* **34**, 1297–1300 (1908).
279. Nossal, G. J. & Pike, B. L. Clonal anergy: persistence in tolerant mice of antigen-binding B lymphocytes incapable of responding to antigen or mitogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77**, 1602–1606 (1980).
280. Schwartz, R. H., Mueller, D. L., Jenkins, M. K. & Quill, H. T-cell clonal anergy. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **54 Pt 2**, 605–610 (1989).
281. Schwartz, R. H. T cell anergy. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 305–334 (2003).
282. Speiser, D. E. *et al.* T cell differentiation in chronic infection and cancer: functional adaptation or exhaustion? *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 768–774 (2014).
283. Wherry, E. J. T cell exhaustion. *Nat. Immunol.* **12**, 492–499 (2011).
284. Moskophidis, D., Lechner, F., Pircher, H. & Zinkernagel, R. M. Virus persistence in acutely infected immunocompetent mice by exhaustion of antiviral cytotoxic effector T cells. *Nature* **362**, 758–761 (1993).
285. Wherry, E. J., Blattman, J. N., Murali-Krishna, K., van der Most, R. & Ahmed, R. Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. *J. Virol.* **77**, 4911–4927 (2003).
286. Blackburn, S. D. *et al.* Coregulation of CD8⁺ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat. Immunol.* **10**, 29–37 (2009).
287. Wells, A. D. New insights into the molecular basis of T cell anergy: anergy factors, avoidance sensors, and epigenetic imprinting. *J. Immunol* **182**, 7331–7341 (2009).

288. Jain, J., Loh, C. & Rao, A. Transcriptional regulation of the IL-2 gene. *Curr. Opin. Immunol.* **7**, 333–342 (1995).
289. Serfling, E., Avots, A. & Neumann, M. The architecture of the interleukin-2 promoter: a reflection of T lymphocyte activation. *Biochim. Biophys. Acta* **1263**, 181–200 (1995).
290. Pollizzi, K. N. & Powell, J. D. Regulation of T cells by mTOR: the known knowns and the known unknowns. *Trends Immunol.* **36**, 13–20 (2015).
291. Jones, R. G. & Thompson, C. B. Revving the engine: signal transduction fuels T cell activation. *Immunity* **27**, 173–178 (2007).
292. Duré, M. & Macian, F. IL-2 signaling prevents T cell anergy by inhibiting the expression of anergy-inducing genes. *Mol. Immunol.* **46**, 999–1006 (2009).
293. Lin, J. T. *et al.* Naive CD4 t cell proliferation is controlled by mammalian target of rapamycin regulation of GRAIL expression. *J. Immunol* **182**, 5919–5928 (2009).
294. Hsiao, H.-W. *et al.* Deltex1 is a target of the transcription factor NFAT that promotes T cell anergy. *Immunity* **31**, 72–83 (2009).
295. Nurieva, R. I. *et al.* The E3 ubiquitin ligase GRAIL regulates T cell tolerance and regulatory T cell function by mediating T cell receptor-CD3 degradation. *Immunity* **32**, 670–680 (2010).
296. Powell, J. D., Lerner, C. G. & Schwartz, R. H. Inhibition of cell cycle progression by rapamycin induces T cell clonal anergy even in the presence of costimulation. *J. Immunol* **162**, 2775–2784 (1999).
297. Zarek, P. E. *et al.* A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. *Blood* **111**, 251–259 (2008).
298. Deaglio, S. *et al.* Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J. Exp. Med.* **204**, 1257–1265 (2007).

299. Quill, H. & Schwartz, R. H. Stimulation of normal inducer T cell clones with antigen presented by purified Ia molecules in planar lipid membranes: specific induction of a long-lived state of proliferative nonresponsiveness. *J. Immunol* **138**, 3704–3712 (1987).
300. Otten, G. R. & Germain, R. N. Split anergy in a CD8+ T cell: receptor-dependent cytotoxicity in the absence of interleukin-2 production. *Science* **251**, 1228–1231 (1991).
301. Jenkins, M. K., Chen, C. A., Jung, G., Mueller, D. L. & Schwartz, R. H. Inhibition of antigen-specific proliferation of type 1 murine T cell clones after stimulation with immobilized anti-CD3 monoclonal antibody. *J. Immunol* **144**, 16–22 (1990).
302. Chai, J. G. & Lechler, R. I. Immobilized anti-CD3 mAb induces anergy in murine naive and memory CD4+ T cells in vitro. *Int. Immunol.* **9**, 935–944 (1997).
303. Wells, A. D., Walsh, M. C., Bluestone, J. A. & Turka, L. A. Signaling through CD28 and CTLA-4 controls two distinct forms of T cell anergy. *J. Clin. Invest.* **108**, 895–903 (2001).
304. Evavold, B. D. & Allen, P. M. Separation of IL-4 production from Th cell proliferation by an altered T cell receptor ligand. *Science* **252**, 1308–1310 (1991).
305. Sloan-Lancaster, J., Evavold, B. D. & Allen, P. M. Induction of T-cell anergy by altered T-cell-receptor ligand on live antigen-presenting cells. *Nature* **363**, 156–159 (1993).
306. Sloan-Lancaster, J., Evavold, B. D. & Allen, P. M. Th2 cell clonal anergy as a consequence of partial activation. *J. Exp. Med.* **180**, 1195–1205 (1994).
307. Sloan-Lancaster, J., Shaw, A. S., Rothbard, J. B. & Allen, P. M. Partial T cell signaling: altered phospho-zeta and lack of zap70 recruitment in APL-induced T cell anergy. *Cell* **79**, 913–922 (1994).
308. Groux, H., Bigler, M., Vries, J. E. de & Roncarolo, M. G. Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells. *J. Exp. Med.* **184**, 19–29 (1996).

309. Berry, N., Ase, K., Kikkawa, U., Kishimoto, A. & Nishizuka, Y. Human T cell activation by phorbol esters and diacylglycerol analogues. *J. Immunol* **143**, 1407–1413 (1989).
310. Heissmeyer, V. *et al.* Calcineurin imposes T cell unresponsiveness through targeted proteolysis of signaling proteins. *Nat. Immunol.* **5**, 255–265 (2004).
311. Howe, C. J. *et al.* Models of anergy in the human Jurkat T cell line. *Assay Drug Dev. Technol.* **1**, 537–544 (2003).
312. Groux, H., Bigler, M., de Vries, J. E. & Roncarolo, M. G. Inhibitory and stimulatory effects of IL-10 on human CD8+ T cells. *J. Immunol* **160**, 3188–3193 (1998).
313. Trautmann, L. *et al.* Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat. Med.* **12**, 1198–1202 (2006).
314. Day, C. L. *et al.* PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* **443**, 350–354 (2006).
315. Barber, D. L. *et al.* Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* **439**, 682–687 (2006).
316. Petrovas, C. *et al.* PD-1 is a regulator of virus-specific CD8+ T cell survival in HIV infection. *J. Exp. Med.* **203**, 2281–2292 (2006).
317. Youngblood, B. *et al.* Cutting edge: Prolonged exposure to HIV reinforces a poised epigenetic program for PD-1 expression in virus-specific CD8 T cells. *J. Immunol* **191**, 540–544 (2013).
318. Youngblood, B. *et al.* Chronic virus infection enforces demethylation of the locus that encodes PD-1 in antigen-specific CD8(+) T cells. *Immunity* **35**, 400–412 (2011).
319. Keir, M. E., Butte, M. J., Freeman, G. J. & Sharpe, A. H. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **26**, 677–704 (2008).

320. Quigley, M. *et al.* Transcriptional analysis of HIV-specific CD8⁺ T cells shows that PD-1 inhibits T cell function by upregulating BATF. *Nat. Med.* **16**, 1147–1151 (2010).
321. Norris, B. A. *et al.* Chronic but not acute virus infection induces sustained expansion of myeloid suppressor cell numbers that inhibit viral-specific T cell immunity. *Immunity* **38**, 309–321 (2013).
322. Teijaro, J. R. *et al.* Persistent LCMV infection is controlled by blockade of type I interferon signaling. *Science* **340**, 207–211 (2013).
323. Wilson, E. B. *et al.* Blockade of chronic type I interferon signaling to control persistent LCMV infection. *Science* **340**, 202–207 (2013).
324. Wherry, E. J. & Ahmed, R. Memory CD8 T-cell differentiation during viral infection. *J. Virol.* **78**, 5535–5545 (2004).
325. Price, D. A. *et al.* T cell receptor recognition motifs govern immune escape patterns in acute SIV infection. *Immunity* **21**, 793–803 (2004).
326. Walker, B. & McMichael, A. The T-cell response to HIV. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**, (2012).
327. Hess, C. *et al.* HIV-1 specific CD8⁺ T cells with an effector phenotype and control of viral replication. *Lancet* **363**, 863–866 (2004).
328. Ortiz, G. M. *et al.* Structured antiretroviral treatment interruptions in chronically HIV-1-infected subjects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 13288–13293 (2001).
329. Mahnke, Y. D. *et al.* Human melanoma-specific CD8(+) T-cells from metastases are capable of antigen-specific degranulation and cytolysis directly ex vivo. *Oncoimmunology* **1**, 467–530 (2012).
330. Baitsch, L. *et al.* Exhaustion of tumor-specific CD8⁺ T cells in metastases from melanoma patients. *J. Clin. Invest.* **121**, 2350–2360 (2011).

331. Ahmadzadeh, M. *et al.* Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood* **114**, 1537–1544 (2009).
332. Fourcade, J. *et al.* CD8(+) T cells specific for tumor antigens can be rendered dysfunctional by the tumor microenvironment through upregulation of the inhibitory receptors BTLA and PD-1. *Cancer Res.* **72**, 887–896 (2012).
333. Fourcade, J. *et al.* Upregulation of Tim-3 and PD-1 expression is associated with tumor antigen-specific CD8+ T cell dysfunction in melanoma patients. *J. Exp. Med.* **207**, 2175–2186 (2010).
334. Woo, S.-R. *et al.* Immune inhibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate T-cell function to promote tumoral immune escape. *Cancer Res.* **72**, 917–927 (2012).
335. Zhang, L. *et al.* Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N. Engl. J. Med.* **348**, 203–213 (2003).
336. Galon, J. *et al.* Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* **313**, 1960–1964 (2006).
337. Fridman, W. H., Pagès, F., Sautès-Fridman, C. & Galon, J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 298–306 (2012).
338. Jin, H.-T. *et al.* Cooperation of Tim-3 and PD-1 in CD8 T-cell exhaustion during chronic viral infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 14733–14738 (2010).
339. Nakamoto, N. *et al.* Synergistic reversal of intrahepatic HCV-specific CD8 T cell exhaustion by combined PD-1/CTLA-4 blockade. *PLoS Pathog.* **5**, e1000313 (2009).
340. Sakuishi, K. *et al.* Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *J. Exp. Med.* **207**, 2187–2194 (2010).
341. Joshua, A. M. *et al.* A phase 2 study of tremelimumab in patients with advanced uveal melanoma. *Melanoma Res.* **25**, 342–347 (2015).

342. Sangro, B. *et al.* A clinical trial of CTLA-4 blockade with tremelimumab in patients with hepatocellular carcinoma and chronic hepatitis C. *J. Hepatol.* **59**, 81–88 (2013).
343. Hamanishi, J. *et al.* Safety and Antitumor Activity of Anti-PD-1 Antibody, Nivolumab, in Patients With Platinum-Resistant Ovarian Cancer. *J. Clin. Oncol.* (2015).
344. Larkin, J. *et al.* Efficacy and Safety of Nivolumab in Patients With BRAF V600 Mutant and BRAF Wild-Type Advanced Melanoma: A Pooled Analysis of 4 Clinical Trials. *JAMA Oncol.* **1**, 433–440 (2015).
345. Gardiner, D. *et al.* A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Assessment of BMS-936558, a Fully Human Monoclonal Antibody to Programmed Death-1 (PD-1), in Patients with Chronic Hepatitis C Virus Infection. *PLoS ONE* **8**, e63818 (2013).
346. Hodi, F. S. *et al.* Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.* **363**, 711–723 (2010).
347. Salvato, M., Borrow, P., Shimomaye, E. & Oldstone, M. B. Molecular basis of viral persistence: a single amino acid change in the glycoprotein of lymphocytic choriomeningitis virus is associated with suppression of the antiviral cytotoxic T-lymphocyte response and establishment of persistence. *J. Virol.* **65**, 1863–1869 (1991).
348. Tzeng, H.-T. *et al.* PD-1 blockage reverses immune dysfunction and hepatitis B viral persistence in a mouse animal model. *PloS One* **7**, e39179 (2012).
349. Chyuan, I.-T. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha blockage therapy impairs hepatitis B viral clearance and enhances T-cell exhaustion in a mouse model. *Cell. Mol. Immunol.* **12**, 317–325 (2015).
350. Seung, E. *et al.* PD-1 blockade in chronically HIV-1-infected humanized mice suppresses viral loads. *PloS One* **8**, e77780 (2013).

351. Reiley, W. W. *et al.* Maintenance of peripheral T cell responses during Mycobacterium tuberculosis infection. *J. Immunol* **189**, 4451–4458 (2012).
352. Horne-Debets, J. M. *et al.* PD-1 dependent exhaustion of CD8+ T cells drives chronic malaria. *Cell Rep.* **5**, 1204–1213 (2013).
353. Kroy, D. C. *et al.* Liver environment and HCV replication affect human T-cell phenotype and expression of inhibitory receptors. *Gastroenterology* **146**, 550–561 (2014).
354. Streeck, H. *et al.* Antigen load and viral sequence diversification determine the functional profile of HIV-1-specific CD8+ T cells. *PLoS Med.* **5**, e100 (2008).
355. Goding, S. R. *et al.* Restoring immune function of tumor-specific CD4+ T cells during recurrence of melanoma. *J. Immunol* **190**, 4899–4909 (2013).
356. De Costa, A.-M. A., Schuyler, C. A., Walker, D. D. & Young, M. R. I. Characterization of the evolution of immune phenotype during the development and progression of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Immunol. Immunother. CII* **61**, 927–939 (2012).
357. Mumprecht, S., Schürch, C., Schwaller, J., Solenthaler, M. & Oxsenbein, A. F. Programmed death 1 signaling on chronic myeloid leukemia-specific T cells results in T-cell exhaustion and disease progression. *Blood* **114**, 1528–1536 (2009).
358. Duraiswamy, J. *et al.* Phenotype, function, and gene expression profiles of programmed death-1(hi) CD8 T cells in healthy human adults. *J. Immunol* **186**, 4200–4212 (2011).
359. Mittal, R. *et al.* Murine lung cancer induces generalized T-cell exhaustion. *J. Surg. Res.* **195**, 541–549 (2015).
360. Severson, J. J. *et al.* PD-1+Tim-3+ CD8+ T Lymphocytes Display Varied Degrees of Functional Exhaustion in Patients with Regionally Metastatic Differentiated Thyroid Cancer. *Cancer Immunol. Res.* **3**, 620–630 (2015).

361. Xu, B. *et al.* Circulating and tumor-infiltrating Tim-3 in patients with colorectal cancer. *Oncotarget* (2015).
362. da Silva, I. P. *et al.* Reversal of NK-cell exhaustion in advanced melanoma by Tim-3 blockade. *Cancer Immunol. Res.* **2**, 410–422 (2014).
363. Cao, Y. *et al.* Tim-3 expression in cervical cancer promotes tumor metastasis. *PloS One* **8**, e53834 (2013).
364. Drewry, A. M. *et al.* Persistent lymphopenia after diagnosis of sepsis predicts mortality. *Shock* **42**, 383–391 (2014).
365. Yokosuka, T. *et al.* Newly generated T cell receptor microclusters initiate and sustain T cell activation by recruitment of Zap70 and SLP-76. *Nat. Immunol.* **6**, 1253–1262 (2005).
366. Campi, G., Varma, R. & Dustin, M. L. Actin and agonist MHC-peptide complex-dependent T cell receptor microclusters as scaffolds for signaling. *J. Exp. Med.* **202**, 1031–1036 (2005).
367. Seminario, M.-C. & Bunnell, S. C. Signal initiation in T-cell receptor microclusters. *Immunol. Rev.* **221**, 90–106 (2008).
368. Yokosuka, T. & Saito, T. Dynamic regulation of T-cell costimulation through TCR-CD28 microclusters. *Immunol. Rev.* **229**, 27–40 (2009).
369. Taylor, A. *et al.* IL-10 inhibits CD28 and ICOS costimulations of T cells via src homology 2 domain – containing protein tyrosine phosphatase 1. *J. Allergy Clin. Immunol.* **120**, 76–83 (2007).
370. Chen, Z. *et al.* IL-10 and TGF-beta induce alloreactive CD4+CD25- T cells to acquire regulatory cell function. *Blood* **101**, 5076–5083 (2003).
371. Asseman, C. & Powrie, F. Interleukin 10 is a growth factor for a population of regulatory T cells. *Gut* **42**, 157–158 (1998).

372. Mittal, S. K. & Roche, P. A. Suppression of antigen presentation by IL-10. *Curr. Opin. Immunol.* **34**, 22–27 (2015).
373. Chattopadhyay, G. & Shevach, E. M. Antigen-specific induced T regulatory cells impair dendritic cell function via an IL-10/MARCH1-dependent mechanism. *J. Immunol.* **191**, 5875–5884 (2013).
374. Thibodeau, J. *et al.* Interleukin-10-induced MARCH1 mediates intracellular sequestration of MHC class II in monocytes. *Eur. J. Immunol.* **38**, 1225–1230 (2008).
375. Ng, C. T. & Oldstone, M. B. A. Infected CD8 α - dendritic cells are the predominant source of IL-10 during establishment of persistent viral infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 14116–14121 (2012).
376. Said, E. A. *et al.* Programmed death-1-induced interleukin-10 production by monocytes impairs CD4+ T cell activation during HIV infection. *Nat. Med.* **16**, 452–459 (2010).
377. Richter, K. *et al.* Macrophage and T cell produced IL-10 promotes viral chronicity. *PLoS Pathog.* **9**, e1003735 (2013).
378. Brooks, D. G. *et al.* Interleukin-10 determines viral clearance or persistence in vivo. *Nat. Med.* **12**, 1301–1309 (2006).
379. Ejrnaes, M. *et al.* Resolution of a chronic viral infection after interleukin-10 receptor blockade. *J. Exp. Med.* **203**, 2461–2472 (2006).
380. Wherry, E. J. & Kurachi, M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 486–499 (2015).
381. Hamanishi, J. *et al.* Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 3360–3365 (2007).

382. Chang, K. C. *et al.* Blockade of the negative co-stimulatory molecules PD-1 and CTLA-4 improves survival in primary and secondary fungal sepsis. *Crit. Care* **17**, R85 (2013).
383. Zhang, Y. *et al.* PD-L1 blockade improves survival in experimental sepsis by inhibiting lymphocyte apoptosis and reversing monocyte dysfunction. *Crit. Care* **14**, R220 (2010).
384. Brahmamdam, P. *et al.* Delayed administration of anti-PD-1 antibody reverses immune dysfunction and improves survival during sepsis. *J. Leukoc. Biol.* **88**, 233–240 (2010).
385. Venet, F. *et al.* IL-7 restores lymphocyte functions in septic patients. *J. Immunol* **189**, 5073–5081 (2012).
386. Inoue, S. *et al.* IL-15 prevents apoptosis, reverses innate and adaptive immune dysfunction, and improves survival in sepsis. *J. Immunol* **184**, 1401–1409 (2010).
387. Unsinger, J. *et al.* IL-7 promotes T cell viability, trafficking, and functionality and improves survival in sepsis. *J. Immunol* **184**, 3768–3779 (2010).
388. Unsinger, J. *et al.* Interleukin-7 ameliorates immune dysfunction and improves survival in a 2-hit model of fungal sepsis. *J. Infect. Dis.* **206**, 606–616 (2012).
389. Döcke, W. D. *et al.* Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment. *Nat. Med.* **3**, 678–681 (1997).
390. Murphy, T., Paterson, H., Rogers, S., Mannick, J. A. & Lederer, J. A. Use of intracellular cytokine staining and bacterial superantigen to document suppression of the adaptive immune system in injured patients. *Ann. Surg.* **238**, 401–410; discussion 410–411 (2003).
391. Wick, M., Kollig, E., Muhr, G. & Köller, M. The potential pattern of circulating lymphocytes TH1/TH2 is not altered after multiple injuries. *Arch. Surg. Chic. Ill* **135**, 1309–1314 (2000).
392. Albertsmeier, M. *et al.* Major surgical trauma differentially affects T-cells and APC. *Innate Immun.* **21**, 55–64 (2015).

393. Markewitz, A. *et al.* Alterations of cell-mediated immune response following cardiac surgery. *Eur. J. Cardio-Thorac. Surg.* **7**, 193–199 (1993).
394. Kokhaei, P., Barough, M. S. & Hassan, Z. M. Cimetidine effects on the immunosuppression induced by burn injury. *Int. Immunopharmacol.* **22**, 273–276 (2014).
395. Laudanski, K. *et al.* Cell-specific expression and pathway analyses reveal alterations in trauma-related human T cell and monocyte pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 15564–15569 (2006).
396. Puyana, J. C. *et al.* Both T-helper-1- and T-helper-2-type lymphokines are depressed in posttrauma anergy. *J. Trauma* **44**, 1037–1045; discussion 1045–1046 (1998).
397. Hensler, T. *et al.* Distinct mechanisms of immunosuppression as a consequence of major surgery. *Infect. Immun.* **65**, 2283–2291 (1997).
398. Markewitz, A. *et al.* Changes in lymphocyte subsets and mitogen responsiveness following open-heart surgery and possible therapeutic approaches. *Thorac. Cardiovasc. Surg.* **40**, 14–18 (1992).
399. Schlüter, B., König, W., Köller, M., Erbs, G. & Müller, F. E. Differential regulation of T- and B-lymphocyte activation in severely burned patients. *J. Trauma* **31**, 239–246 (1991).
400. Kasten, K. R. *et al.* Divergent adaptive and innate immunological responses are observed in humans following blunt trauma. *BMC Immunol.* **11**, 4 (2010).
401. Ertel, W. *et al.* Kinetics of interleukin-2 and interleukin-6 synthesis following major mechanical trauma. *J. Surg. Res.* **48**, 622–628 (1990).
402. Berguer, R. *et al.* Major surgery suppresses maximal production of helper T-cell type 1 cytokines without potentiating the release of helper T-cell type 2 cytokines. *Arch. Surg. Chic. Ill* **134**, 540–544 (1999).

403. Hensler, T. *et al.* Distinct mechanisms of immunosuppression as a consequence of major surgery. *Infect. Immun.* **65**, 2283–2291 (1997).
404. Xu, P. *et al.* Surgical trauma induces postoperative T-cell dysfunction in lung cancer patients through the programmed death-1 pathway. *Cancer Immunol. Immunother. CII* (2015). doi:10.1007/s00262-015-1740-2
405. Bandyopadhyay, G. *et al.* Negative signaling contributes to T-cell anergy in trauma patients. *Crit. Care Med.* **35**, 794–801 (2007).
406. Teodorczyk-Injeyan, J. A., Sparkes, B. G., Mills, G. B., Peters, W. J. & Falk, R. E. Impairment of T cell activation in burn patients: a possible mechanism of thermal injury-induced immunosuppression. *Clin. Exp. Immunol.* **65**, 570–581 (1986).
407. Grbic, J. T., Mannick, J. A., Gough, D. B. & Rodrick, M. L. The role of prostaglandin E2 in immune suppression following injury. *Ann. Surg.* **214**, 253–262; discussion 262–263 (1991).
408. Lendemans, S., Kreuzfelder, E., Waydhas, C., Schade, F. U. & Flohé, S. Differential immunostimulating effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and interferon gamma (IFN γ) after severe trauma. *Inflamm. Res.* **56**, 38–44 (2007).
409. Grimaldi, D., Llitjos, J. F. & Pène, F. Post-infectious immune suppression: a new paradigm of severe infections. *Médecine Mal. Infect.* **44**, 455–463 (2014).
410. Erickson, J. J. *et al.* Acute Viral Respiratory Infection Rapidly Induces a CD8+ T Cell Exhaustion-like Phenotype. *J. Immunol* (2015). doi:10.4049/jimmunol.1403004
411. Rew, D. A. & Wilson, G. D. Cell production rates in human tissues and tumours and their significance. Part 1: an introduction to the techniques of measurement and their limitations. *Eur. J. Surg. Oncol. J.* **26**, 227–238 (2000).

412. Bading, J. R. & Shields, A. F. Imaging of cell proliferation: status and prospects. *J. Nucl. Med.* **49 Suppl 2**, 64S–80S (2008).
413. de Vries, E. & European Society for Immunodeficiencies (ESID) members. Patient-centred screening for primary immunodeficiency, a multi-stage diagnostic protocol designed for non-immunologists: 2011 update. *Clin. Exp. Immunol.* **167**, 108–119 (2012).
414. Witters, D. *et al.* Digital biology and chemistry. *Lab. Chip* (2014). doi:10.1039/C4LC00248B
415. Gossett, D. R. *et al.* Hydrodynamic stretching of single cells for large population mechanical phenotyping. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 7630–7635 (2012).
416. Kirschbaum, M., Jaeger, M. S. & Duschl, C. Correlating short-term Ca(2+) responses with long-term protein expression after activation of single T cells. *Lab. Chip* **9**, 3517–3525 (2009).
417. Han, Q. *et al.* Polyfunctional responses by human T cells result from sequential release of cytokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 1607–1612 (2012).
418. Ma, C. *et al.* A clinical microchip for evaluation of single immune cells reveals high functional heterogeneity in phenotypically similar T cells. *Nat. Med.* **17**, 738–743 (2011).
419. Rittirsch, D., Huber-Lang, M. S., Flierl, M. A. & Ward, P. A. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat. Protoc.* **4**, 31–36 (2009).
420. Fink, M. P. Animal models of sepsis. *Virulence* **5**, 143–153 (2014).
421. Osuchowski, M. F., Welch, K., Siddiqui, J. & Remick, D. G. Circulating cytokine/inhibitor profiles reshape the understanding of the SIRS/CARS continuum in sepsis and predict mortality. *J. Immunol.* **177**, 1967–1974 (2006).
422. Hollenberg, S. M. *et al.* Characterization of a hyperdynamic murine model of resuscitated sepsis using echocardiography. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **164**, 891–895 (2001).
423. Muenzer, J. T. *et al.* Characterization and modulation of the immunosuppressive phase of sepsis. *Infect. Immun.* **78**, 1582–1592 (2010).

424. Brooks, H. F., Osabutey, C. K., Moss, R. F., Andrews, P. L. R. & Davies, D. C. Caecal ligation and puncture in the rat mimics the pathophysiological changes in human sepsis and causes multi-organ dysfunction. *Metab. Brain Dis.* **22**, 353–373 (2007).
425. Mestas, J. & Hughes, C. C. W. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J. Immunol* **172**, 2731–2738 (2004).
426. Shay, T. *et al.* Conservation and divergence in the transcriptional programs of the human and mouse immune systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 2946–2951 (2013).

Immunodépression acquise en réanimation : approche expérimentale et clinique des altérations lymphocytaires induites lors des syndromes septiques

Résumé : Les syndromes septiques restent à ce jour un problème majeur de santé publique. Une importante immunodépression est observée lors des syndromes septiques, affectant notamment les lymphocytes T, acteurs majeurs de la réponse immunitaire. En effet, après avoir subi une apoptose massive ils présentent d'importantes altérations fonctionnelles et phénotypiques, associées à un mauvais pronostic. Cependant les mécanismes impliqués dans le développement de ces altérations lymphocytaires induites par le sepsis (ALIS) sont encore mal connus. Le but de ce travail était d'étudier ces mécanismes à travers la mise au point de modèles *ex-vivo*. Nous avons optimisé un test de mesure de la réponse proliférative des lymphocytes T, utilisable pour le diagnostic des immunodéficiences primaires, comme pour l'étude expérimentale et clinique des ALIS. Nous avons développé un premier modèle *ex-vivo*, reposant sur l'incubation de cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) en présence de LPS, suivie d'une stimulation spécifique des lymphocytes T via leur TCR. Ce modèle récapitule des mécanismes indirects potentiellement impliqués dans l'induction des ALIS, impliquant les monocytes. Puis, nous avons mis au point un modèle qui repose sur l'incubation de PBMC en présence d'IL-10, suivie d'une stimulation des lymphocytes T par des anticorps anti-CD2/CD3/CD28. Ce modèle pourrait reproduire des mécanismes directs et indirects impliqués dans l'induction des ALIS. Nos résultats nous ont permis d'améliorer la compréhension des mécanismes en jeu dans les ALIS et d'en souligner la complexité. Les modèles *ex-vivo* présentés pourraient permettre d'évaluer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Mots clés : Sepsis, lymphocytes T, prolifération, monocytes, lipopolysaccharide, IL-10, *ex-vivo* modélisation

Clinical and experimental study of sepsis-induced T lymphocytes alterations in ICU patients

Abstract : Sepsis remains a major public healthcare issue. During sepsis, an important immunodepression develops, affecting particularly the T lymphocytes, major players of the immune response. Following a massive apoptosis, T lymphocytes display important functional and phenotypical alterations, which are associated with higher risk of secondary infections and higher mortality. Mechanisms involved in the induction of such alterations are not fully understood. The aim of this study was to analyze those mechanisms through the development of *ex vivo* models. We optimized a test to measure T lymphocytes proliferative response, which can be used for the diagnosis of primary immunodeficiencies, as well as to clinically and experimentally study sepsis induced T lymphocytes alterations (SILA). First, we set up a model consisting in an incubation of PBMC (peripheral blood mononuclear cells) with LPS followed by specific T lymphocytes stimulation via its TCR. This model recapitulates indirect mechanisms likely to participate in SILA induction, mediated by monocytes. Then, we set up a model consisting in PBMC incubation with IL-10 followed by T lymphocytes stimulation with anti-CD2/3/28 antibody coated beads. This model may recapitulate direct and indirect mechanisms involved in SILA induction. Our results allowed us to improve the understanding of the mechanisms involved in SILA induction and to highlight its complexity. The *ex-vivo* models that we developed could be used for the evaluation of new therapeutic strategies.

Keywords : sepsis, T lymphocytes, proliferation, monocytes, lipopolysaccharide, IL-10, *ex-vivo* modelization

Thèse préparée au sein du Laboratoire commun de recherche Biomérieux-Hospices Civils de Lyon, 5^{ième} étage Pavillon P, Hôpital Edouard Herriot, Lyon, France