



Altérations des polynucléaires neutrophiles au cours des états septiques sévères

Julie Demaret

► To cite this version:

Julie Demaret. Altérations des polynucléaires neutrophiles au cours des états septiques sévères. Immunologie. Université de Lyon, 2016. Français. ⟨NNT : 2016LYSE1137⟩. ⟨tel-01476344⟩

HAL Id: tel-01476344

<https://theses.hal.science/tel-01476344v1>

Submitted on 24 Feb 2017

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.



HAL Authorization



N°d'ordre NNT :

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 205
Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé

Spécialité de doctorat : Biologie

Soutenue publiquement le 16 Septembre 2016, par :
Julie Demaret

**ALTERATIONS DES POLYNUCLEAIRES NEUTROPHILES AU
COURS DES ETATS SEPTIQUES SEVERES**

Travail effectué dans le Laboratoire d'Immunologie de l'Hôpital Edouard Herriot
Sous la direction de Monsieur le Professeur Guillaume MONNERET

JURY

MEMBRES : Professeur Hafid AIT-OUFELLA (Rapporteur)
 Professeur Carole SCHWEBEL (Rapporteur)
 Docteur Christophe CARNOY
 Professeur Charles DUMONTET
 Professeur Guillaume MONNERET
 Docteur Fabienne VENET

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

M. le Professeur Frédéric FLEURY

Président du Conseil Académique

M. le Professeur Hamda BEN HADID

Vice-président du Conseil d'Administration

M. le Professeur Didier REVEL

Vice-président du Conseil Formation
et Vie Universitaire

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

Vice-président de la Commission Recherche

M. Fabrice VALLÉE

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. B
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. THEVENARD

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. le Professeur E.PERRIN
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

LISTE DES ABREVIATIONS

TABLE DES MATIERES

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	12
1. Introduction.....	13
2. Les Syndromes septiques	14
I. Définitions	14
II. Epidémiologie	16
III. Diagnostic	21
IV. Physiopathologie des syndromes septiques : phase précoce	25
V. Prise en charge thérapeutique des syndromes septiques	35
3. Evolution des connaissances de la physiopathologie.....	45
I. Mécanismes anti-inflammatoires de compensation.....	45
II. Conséquences sur le système immunitaire.....	49
III. Chronologie des réponses pro et anti-inflammatoires et conséquences cliniques	56
IV. Perspectives thérapeutiques en lien avec l'immunosuppression	58
4. Les polynucléaires neutrophiles.....	63
I. Rappels physiologiques	63
II. Adhésion et migration	65
III. Elimination des pathogènes	69
IV. Cytokines – Immune crosstalk.....	74
V. Apoptose	79
VI. Pathologies	82
VII. Conclusion	88
5. Implication des polynucléaires neutrophiles dans la physiopathologie des syndromes septiques	90
I. Phase pro-inflammatoire.....	90
II. Neutrophiles et immunosuppression post-sepsis	99
6. Conclusion	101
TRAVAUX DE RECHERCHE	102

Présentation du projet de thèse	103
1. Introduction.....	105
I. Inter-Laboratory Assessment of Flow cytometric Monocyte HLA-DR Expression in clinical samples	105
II. Assessment of a Novel Flow Cytometry technique of One-Step Intracellular Staining: Example of FOXP3 in Clinical Samples	106
III. STAT5 phosphorylation in T cell subsets from septic patients in response to recombinant human interleukin-7: a pilot study.....	107
IV. Elevated plasmatic level of soluble IL-7 receptor is associated with increased mortality in septic shock patients	108
2. Etude des neutrophiles.....	109
I. Marked alterations of neutrophil functions during sepsis-induced immunosuppression	109
II. Identification of CD177 as the most dysregulated parameter in a microarray study of purified neutrophils from septic shock patients	122
3. Discussion	155
I. Améliorations des outils en recherche translationnelle	155
II. Etude des PNN au cours de la phase immunosuppressive du choc septique	159
4. Conclusions et perspectives	172
5. Annexes	173
BIBLIOGRAPHIE	231

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Nombre d'hospitalisations pour lesquelles une infection a été répertoriée comme diagnostic principal entre 2003 et 2011 (25)	17
Figure 2 : Nombre de cas de sepsis par an aux Etats-Unis, en regard du pathogène associé, entre 1979 et 2001 (23)	20
Figure 3 : Exemples de molécules exogènes et endogènes reconnues par les TLR (68).....	28
Figure 4 : La voie de signalisation du TLR via Myd88 (67).....	29
Figure 5 : Les troubles de la balance homéostatique entre les mécanismes pro et anticoagulants générés par le sepsis (77)	33
Figure 6 : Exemples de lésions organiques au cours du sepsis (81) ARDS : Syndrome de détresse respiratoire aigu.	34
Figure 7 : Stratégie de traitement du sepsis sévère d'après Vincent <i>et al.</i> (85)	35
Figure 8 : Relation entre le délai de mise en place de l'antibiothérapie et le risque de mortalité des patients en choc septique (86).....	36
Figure 9 : Connexions entre les systèmes nerveux et immunitaire (133).....	48
Figure 10 : Conséquence du sepsis sur l'immunité innée et adaptative (15)	50
Figure 11 : Altérations des lymphocytes T au cours du sepsis et association avec l'outcome clinique (129)	53
Figure 12 : La réponse de l'hôte au cours du sepsis sévère (3).....	56
Figure 13 : Profils des réponses immunologiques lors du sepsis au cours du temps (167) A : Pour les décès en phase précoce – B : Pour les décès en phase tardive.	57
Figure 14 : Thérapies immunostimulantes du sepsis (15).....	58
Figure 15 : Frottis de sang humain normal mettant en avant un polynucléaire neutrophile.....	63
Figure 16 : Production de la lignée des neutrophiles dans la moelle osseuse (198)	64
Figure 18 : Contenu des granules en fonction de la maturité des neutrophiles (4)	71

Figure 20 : Représentation schématique de la communication du neutrophile avec les autres cellules de l'immunité (4)	79
Figure 21 : Mécanismes de l'apoptose des neutrophiles.....	82
Figure 22 : Rôle physiologique des polynucléaires neutrophiles dans la réponse anti-infectieuse et réponse physiopathologique au cours de la phase pro-inflammatoire du choc septique. (RFL Mai 2014 n° 462 Demaret <i>et al.</i> - <i>Annexe</i>)	99
Figure 23 : Représentation schématique des sous-populations de neutrophiles circulants présentes lors d'une inflammation sévère (401)	168

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Sequential (Sepsis-related) Organ Failure Assessment (18).....	16
Tableau 2 : Les 34 biomarqueurs identifiés dans le diagnostic du sepsis (62).....	24
Tableau 3 : Exemples de thérapies immunomodulatrices testées dans des essais cliniques d'après Vincent <i>et al.</i> (106)	42
Tableau 4 : Principales protéines antimicrobiennes et leurs mécanismes d'action d'après Amulic <i>et al.</i> (4)	72
Tableau 5 : Effet des molécules dérivées des neutrophiles sur les NK d'après Costantini <i>et al.</i> (245). 77	
Tableau 6 : Différentes cytokines exprimées par les PNN <i>in vitro</i> , d'après Witko Sarsat <i>et al.</i> (221). . 79	
Tableau 7 : Différents phénotypes des MDSC humains (402).....	169

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE I :

- Inter-laboratory assessment of flow cytometric monocyte HLA-DR expression in clinical samples. *Cytometry B Clin Cytom.* 2013 Jan-Feb;84(1):59-62.
- Assessment of a novel flow cytometry technique of one-step intracellular staining: example of FOXP3 in clinical samples. *Cytometry B Clin Cytom.* 2013 May;84(3):187-93.
- STAT5 phosphorylation in T cell subsets from septic patients in response to recombinant human interleukin-7: a pilot study. *J Leukoc Biol.* 2015 Apr;97(4):791-6.
- Elevated plasmatic level of soluble IL-7 receptor is associated with increased mortality in septic shock patients. *Intensive Care Medicine* 2014 Aug;40(8):1089-96.

ANNEXE II :

- Altérations phénotypiques et fonctionnelles des polynucléaires neutrophiles dans les états septiques sévères. *Revue Francophone des Laboratoires.* Mai 2014, n°462:65-71.
- Intracellular flow Cytometry improvements in clinical studies. *Methods in Molecular Biology* – in press

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Introduction

Les syndromes septiques représentent encore aujourd'hui un problème majeur de santé publique du fait de leur incidence en constante augmentation et du taux élevé de décès associé (1, 2). La réponse immuno-inflammatoire au cours du choc septique associe une importante réponse inflammatoire initiale responsable de l'état de choc et le développement secondaire d'altérations du système immunitaire (3).

Les polynucléaires neutrophiles (PNN), sentinelles de l'immunité grâce à leur rôle de phagocytose et leur potentiel antimicrobien, jouent un rôle central dans la réponse immunitaire du fait d'interactions constantes avec les cellules dendritiques, macrophages et lymphocytes via des cytokines (4). Des données récentes de la littérature (5-8) décrivent également un rôle immunosuppresseur jusqu'alors méconnu pour les PNN suggérant non seulement un nouvel aspect de l'implication de ces cellules dans la réponse immunitaire mais également dans la physiopathologie du choc septique.

Ainsi, le but principal de ce travail de thèse a été l'exploration des altérations phénotypiques, fonctionnelles et transcriptomiques des PNN lors de la phase immunosuppressive du choc septique.

Dans ce document, une revue de la littérature est présentée en première partie. Elle expose les syndromes septiques, l'évolution des connaissances de leur physiopathologie, puis la physiologie des PNN ainsi que leur implication dans le choc septique. La seconde partie est consacrée à nos travaux personnels.

2. LES SYNDROMES SEPTIQUES

I. DEFINITIONS

D'une façon très concrète, le sepsis illustre les multiples facettes de la réponse immunitaire des patients face à une infection. D'un côté, il peut être caractérisé comme le simple ensemble des manifestations immunologiques et inflammatoires induites par un processus infectieux. D'un autre, il devient de plus en plus évident que cette interface est beaucoup plus complexe qu'elle n'apparaît (9).

La conférence de consensus de l'American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine (ACCP/SCCM), a défini les critères correspondant aux syndromes septiques en **1992**, permettant une stratification des patients selon leur gravité et facilitant ainsi leur prise en charge thérapeutique (10).

Par souci de simplicité, le **syndrome de réponse inflammatoire systémique (SRIS)** est défini selon 4 variables : *la température, la fréquence cardiaque, la fréquence respiratoire et le compte de globules blancs*. Une anomalie mineure de ces paramètres suffit pour qu'un patient réponde aux critères du SRIS. Néanmoins cette approche présente des limites. Premièrement, les critères du SRIS sont tellement sensibles que 90% des patients admis aux soins intensifs respectent les critères (11). En effet, ces derniers ne prennent jamais en compte la pathophysiologie sous-jacente, ni la sévérité de la réponse inflammatoire (12). De plus, certains patients (les personnes âgées, celles prenant des médicaments qui ont un effet sur la fréquence cardiaque, respiratoire ou la température) peuvent ne pas présenter de symptômes remplissant les critères du SRIS (13). Le SRIS peut également se rencontrer dans de nombreux contextes non-infectieux tels que le trauma sévère, les brûlés, la pancréatite aiguë, l'ischémie. Récemment, Kaukonen *et al.* ont investigué la validité et la sensibilité des critères du SRIS dans une analyse rétrospective incluant plus de 100 000 patients pendant les 14 dernières années. Les auteurs se sont intéressés aux patients présentant une infection et une dysfonction d'organe, les classant comme « sepsis sévère – SRIS positif » (87.9%) ou « sepsis sévère – SRIS négatif » (12.1%). Les résultats de cette évaluation ont mis en avant qu'environ un huitième des patients ne respectait pas les critères du SRIS alors qu'il présentait un choc septique (13).

Le **sepsis** correspond au SRIS associé à un processus infectieux, prouvé ou non par la mise en évidence de microorganismes dans des tissus normalement stériles. Ainsi, puisque presque tous les patients sévères remplissent les critères du SRIS, le sepsis correspond bien à une infection.

Cependant, alors que tous les patients présentant un sepsis sont infectés, l'inverse n'est pas nécessairement juste, i.e., tous les patients avec une infection ne sont pas au stade sepsis. Le sepsis et ses séquelles représentent un continuum de sévérité clinique et pathophysiologique. Le **sepsis sévère** est défini comme un sepsis associé à l'apparition d'une défaillance d'organe, une anomalie d'hypoperfusion (i.e. acidose lactique, oligurie, altération aiguë de l'état mental, etc.) ou une hypotension induite par le sepsis (i.e. pression artérielle systolique inférieure à 90 mm Hg ou réduite de plus de 40 mm Hg sans autre cause d'hypotension). On parle de **choc septique** lorsque l'hypotension est persistante malgré un remplissage vasculaire adéquat (10).

En **2001**, une seconde conférence de consensus internationale s'est réunie pour tenter d'améliorer la précision de ces définitions afin de permettre une meilleure stratification des patients dans les études cliniques, et peut-être une amélioration de la compréhension de la physiopathologie des états septiques (14). Les experts se sont basés non seulement sur des **paramètres cliniques**, mais également sur des **marqueurs biologiques** caractérisant la réponse de l'hôte à l'infection. Néanmoins, ces définitions sont de plus en plus remises en question. D'abord, parce que nos connaissances sur la pathophysiologie des syndromes septiques ont évolué (15). Ensuite, parce que les critères du SRIS restent toujours aussi trop peu spécifiques pour conserver de la valeur. Il est également nécessaire de prendre en compte l'hétérogénéité du sepsis afin de modérer le besoin d'identifier des cohortes homogènes (16, 17).

Néanmoins, **début 2016**, de nouvelles recommandations ont été établies après une troisième conférence de consensus réunissant 19 experts (18). Ainsi, le sepsis devrait être défini comme une dysfonction d'organe engageant le pronostic vital et causée par une réponse dérégulée de l'hôte face à une infection. La dysfonction d'organe est caractérisée par une augmentation du **score SOFA** (*Sequential (Sepsis-related) Organ Failure Assessment*) de 2 points ou plus, associée à une mortalité hospitalière de plus de 10%. Ce score comprend des critères respiratoires, cardiovasculaires, de coagulation, le score de Glasgow, la bilirubine et la créatinine (19). On parle de choc septique lorsqu'il est nécessaire d'administrer un vasopresseur aux patients afin de maintenir leur pression artérielle à 65mm Hg ou plus et une lactatémie supérieure à 2mmol/L (>18mg/dL) en l'absence d'hypovolémie. Cette combinaison est associée à une mortalité de plus de 40%. En dehors des services de réanimation, c'est-à-dire aux urgences ou dans les services traditionnels, les patients adultes susceptibles d'être infectés seront plus sujets à un pronostic défavorable de sepsis si on retrouve au moins deux de ces critères : rythme respiratoire à 22/min voire plus, une détérioration du degré de lucidité ou une pression systolique à 100mm Hg ou moins. Ces critères cliniques rentrent

dans le calcul d'un nouveau score : le quickSOFA (qSOFA). Ces définitions révisées devraient offrir une consistance plus importante dans le développement de futures études épidémiologiques et cliniques et faciliter la détection rapide des patients à risque de sepsis et donc gagner du temps pour leur prise en charge.

System	Score				
	0	1	2	3	4
Respiration					
PaO ₂ /FiO ₂ , mm Hg (kPa)	≥400 (53.3)	<400 (53.3)	<300 (40)	<200 (26.7) with respiratory support	<100 (13.3) with respiratory support
Coagulation					
Platelets, ×10 ³ /μL	≥150	<150	<100	<50	<20
Liver					
Bilirubin, mg/dL (μmol/L)	<1.2 (20)	1.2-1.9 (20-32)	2.0-5.9 (33-101)	6.0-11.9 (102-204)	>12.0 (204)
Cardiovascular					
	MAP ≥70 mm Hg	MAP <70 mm Hg	Dopamine <5 or dobutamine (any dose) ^b	Dopamine 5.1-15 or epinephrine ≤0.1 or norepinephrine ≤0.1 ^b	Dopamine >15 or epinephrine >0.1 or norepinephrine >0.1 ^b
Central nervous system					
Glasgow Coma Scale score ^c	15	13-14	10-12	6-9	<6
Renal					
Creatinine, mg/dL (μmol/L)	<1.2 (110)	1.2-1.9 (110-170)	2.0-3.4 (171-299)	3.5-4.9 (300-440)	>5.0 (440)
Urine output, mL/d				<500	<200

Tableau 1 : Sequential (Sepsis-related) Organ Failure Assessment (18)

FiO₂ : fraction of inspired oxygen, MAP : mean arterial pressure, PaO₂ : partial pressure of oxygen, ^b : les doses de catécholamines sont administrées en μg/kg/min pendant au moins une heure, ^c : le score de Glasgow est compris entre 3 et 15 (les plus hautes valeurs témoignent d'une meilleure fonction neurologique).

II. EPIDEMIOLOGIE

Des estimations précises des tendances épidémiologiques du sepsis sévère et du choc septique sont primordiales pour les chercheurs en santé publique, les investigateurs cliniques et les cliniciens eux-mêmes. Afin de déterminer la tendance nationale dans l'épidémiologie du sepsis sévère, certains chercheurs ont utilisé la *Classification Internationale Statistique des Maladies* (9^{ème} édition) – ICD-9, une codification reliant l'infection à de nouvelles dysfonctions d'organes (20). Cependant, des erreurs minimales concernant la méthodologie ont conduit à des estimations divergentes (21). En effet, concernant uniquement le sepsis sévère, Angus *et al.* ont estimé une incidence annuelle de 750 000 cas (300 pour 100 000 habitants) en 1995 (22). Une autre étude de Martin *et al.* reporte une incidence de 256 000 cas en 2000 (81 pour 100 000 habitants) (23). Enfin Drombrovskiy *et al.* soulignent une incidence de 391 000 cas soit 134 pour 100 000 habitants en 2003 (24) 2007). Rhee *et al.* mettent également en évidence un manque de rigueur quant à l'existence d'outils fiables afin de « mesurer » l'incidence du sepsis. Les méthodes citées reprennent les déclarations d'assurance, ou des codes spécifiques au sepsis ou à l'infection et à la dysfonction d'organe. Ainsi des campagnes de vigilances « pro-sepsis » rendraient les cliniciens plus vigilants à

propos du diagnostic du sepsis mais on observerait une diminution ou une stabilisation des infections qui sont le plus couramment à l'origine du sepsis (25) (**Figure 1**)

Ainsi, le débat continue en ce qui concerne la véritable incidence des syndromes septiques aux Etats-Unis et dans le reste du monde même si elle semble toujours en constante augmentation comme le montre la figure suivante.

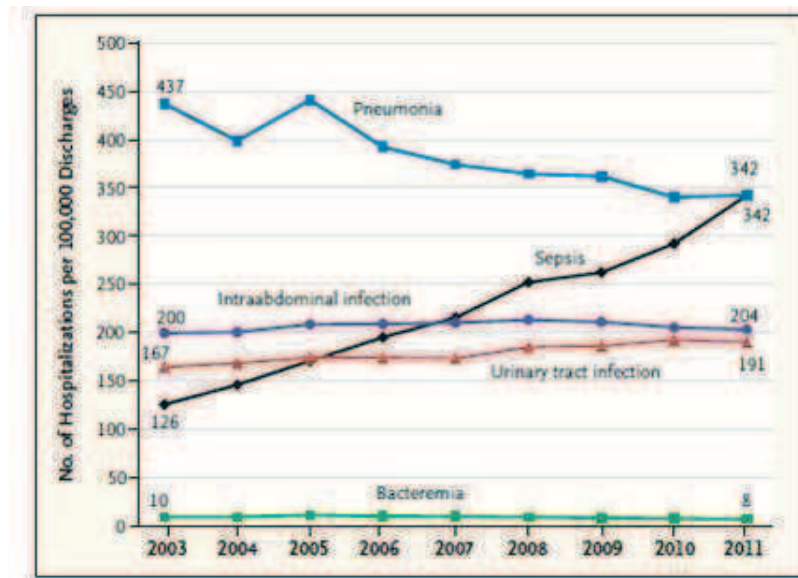


Figure 1 : Nombre d'hospitalisations pour lesquelles une infection a été répertoriée comme diagnostic principal entre 2003 et 2011 (25)

a) Incidence et mortalité

L'incidence des syndromes septiques augmente rapidement. Les raisons en sont multiples et la meilleure connaissance de la physiopathologie a déjà contribué à une augmentation du nombre de cas diagnostiqués. Néanmoins, la hausse des résistances bactériennes aux antibiotiques, l'utilisation croissante de molécules immunosuppressives (e.g., chimiothérapies anticancéreuses ou post-transplantation) ainsi que l'augmentation des procédures chirurgicales invasives peuvent expliquer la réelle élévation de l'incidence des états septiques. D'autre part, cette tendance devrait perdurer considérant le vieillissement de la population, l'augmentation des pathologies chroniques, des transplantations, chimiothérapies et procédures invasives qui constituent des comorbidités lors des syndromes septiques (26).

Aux Etats-Unis, entre 1979 et 2000, l'incidence du sepsis correspond à une augmentation annuelle de 8,7 % (23). En Australie et Nouvelle-Zélande, la proportion de patients présentant un sepsis sévère ou choc septique et admis en réanimation est passée de 7.2% en 2000 à 11.1% en

2012. En revanche, dans cette même cohorte, la mortalité diminue : 35% en 2000 versus 18.4% en 2012, alors que le nombre de décès toutes causes confondues augmente toujours (27, 28). En Europe, le sepsis sévère et le choc septique représentent également une proportion importante des patients admis en réanimation (29). Même s'il est difficile de considérer l'Europe comme une unité homogène, on peut considérer que la prise en charge des patients critiques est indépendante de leur nationalité et diffère surtout des méthodes des Etats-Unis. On observe notamment une différence dans la disponibilité des lits, ce qui affecte directement le devenir des patients. En effet, en Europe, les patients souffrant de sepsis sévère ou choc septique seront admis en réanimation environ un jour après leur hospitalisation conventionnelle. La durée de séjour est par contre plus longue : 7.8 jours versus 4.2 aux Etats-Unis (1). Cette même étude incluant plus de 25 000 patients hospitalisés aux Etats-Unis et en Europe a montré que le taux de mortalité du sepsis sévère et du choc septique est toujours supérieur à 30 % (1). Dans une cohorte observationnelle, prospective, multicentrique dans 14 hôpitaux français, 13.7% des patients présentaient les critères de choc septique. La mortalité estimée à J28 était de 42% (30). La mortalité associée aux syndromes septiques 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 (28, 30). La plupart des études mesurent la mortalité 28 jours après le début du choc. Celle-ci donne une vision à court terme des conséquences délétères des syndromes septiques, occultant notamment l'effet de ces pathologies complexes sur l'espérance de vie (31). Ainsi, dans une cohorte américaine, en tenant compte de la mortalité à 6 ans chez des patients septiques versus des non septiques, les patients septiques présentaient un taux de mortalité à long terme supérieur, même en tenant compte des comorbidités. Le sepsis est donc indépendamment associé à une mortalité plus élevée même bien après l'hospitalisation (32).

b) 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. On le considère immature chez l'enfant et sénescence chez les individus âgés. Un système immunitaire défaillant augmente le risque d'infection et d'évolution de cette infection en syndrome septique. Chez l'enfant, l'infection pulmonaire est la principale cause de sepsis. De plus, le développement d'un sepsis dans cette tranche d'âge représente la première cause de décès (33, 34). A l'inverse, 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 élevées (35, 36).

Le **genre** semble lui aussi être un facteur de risque : les hommes sont plus fréquemment touchés. En revanche, le risque de décès chez les patients septiques semble plus élevé chez les femmes (37, 38).

Les maladies altérant le système immunitaire, comme le diabète, le VIH, ou les leucémies, augmentent elles aussi à la fois le risque de développer un syndrome septique, et la gravité de ce syndrome (39, 40).

On observe aussi une influence de l'**ethnie**, les individus caucasiens présentant un risque plus faible de développer un syndrome septique (41, 42). 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 (43).

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 ou 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 (44), les cytokines (45), peuvent affecter négativement ou positivement la susceptibilité au développement des syndromes septiques (46).

c) Etiologie

Le type d'organisme à l'origine du sepsis est très important pour l'issue favorable ou non de cette infection. Les microorganismes **Gram-positifs** sont de plus en plus fréquents et sont désormais aussi communs que les infections à **Gram-négatif**. Ceci est dû essentiellement au développement des procédures invasives et au nombre accru des infections nosocomiales développées en milieu hospitalier. De plus, l'utilisation d'antibiotiques à large spectre chez ces patients restant longtemps dans les services de réanimation aboutit à une résistance bactérienne importante. Cette résistance aux antibiotiques est problématique, prolongeant la durée de séjour mais aussi celle de la ventilation mécanique (26). Une étude de Vincent *et al.* souligne d'ailleurs, dans une cohorte de 3 000 patients, cette fréquence égale entre les microorganismes Gram-positifs et Gram-négatifs, due principalement à un taux élevé d'infections staphylococciques. De plus, 18 % de ces infections étaient d'origine polymicrobienne (29). Une méta-analyse reprenant 510 études rapporte que les bactériémies Gram-négatives sont associées à une mortalité plus élevée comparées aux Gram-positives (47). Cette étude présente également l'influence du microorganisme et du site de

l'infection avec le taux de mortalité, ce qui en fait un bon rationnel pour les inclure dans les stratifications des patients dans les essais cliniques. 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.

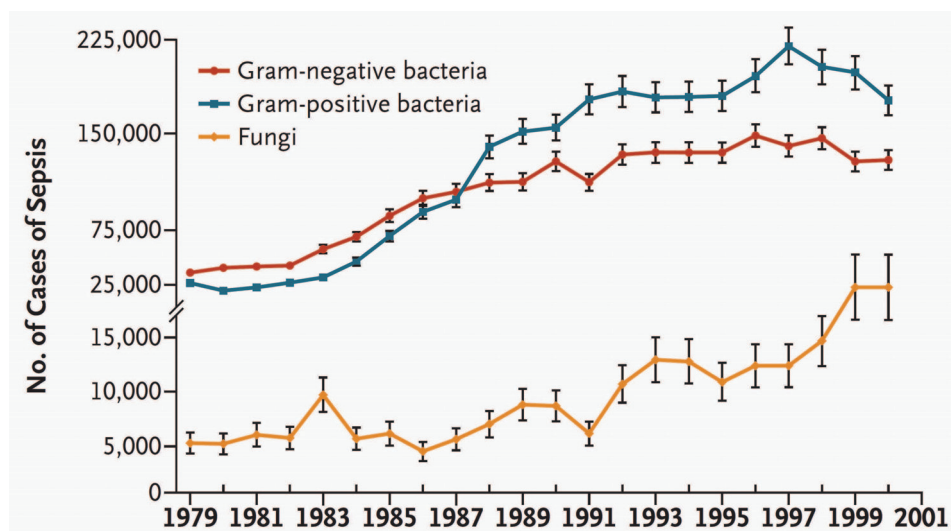


Figure 2 : Nombre de cas de sepsis par an aux Etats-Unis, en regard du pathogène associé, entre 1979 et 2001
(23)

Néanmoins, environ un tiers des patients présentant un sepsis sévère n'ont jamais d'hémoculture positive (48).

Les **points d'appel infectieux** sont multiples, bien que les sites d'infection les plus fréquemment retrouvés restent les poumons. La deuxième cause est constituée par les infections abdominales (environ 25 %), puis viennent ensuite les infections urinaires. Une étude récente montre que la source anatomique de l'infection est corrélée à la mortalité chez les patients en choc septique et que cette association est indépendante des facteurs de prédisposition de l'hôte. Un taux de mortalité intra-hospitalier plus important est retrouvé pour les infections intraabdominales secondaires à une ischémie intestinale et des infections disséminées. La mortalité est en revanche plus faible suite à une uropathie obstructive associée à une infection du tractus urinaire (49).

d) Coût de prise en charge

Les patients admis pour un syndrome septique nécessitent des soins intensifs et mobilisent l'équipe infirmière et médicale, générant ainsi des dépenses importantes. Les coûts liés au personnel représentent 40 à 60 % du budget total des services de réanimation. Etant donnée la proportion importante des dépenses fixes inhérentes à ces services, le coût total de la prise en charge dépend essentiellement de la durée du séjour hospitalier (50). Selon une étude française, le coût moyen d'une journée d'hospitalisation en réanimation pour un patient atteint de sepsis sévère est estimé à 1200 € (51). La durée moyenne de séjour dans le service de réanimation après le début du sepsis sévère est de 11 jours (52).

Le coût moyen du séjour en service de réanimation est deux fois plus élevé pour les patients qui développent un sepsis sévère (22 800€) par rapport aux autres patients admis dans ce service (9 600€) (51). Aux Etats-Unis, il a été estimé un coût moyen de 22 100\$ par patient atteint de sepsis sévère avec un coût annuel de 16.7\$ milliards (53). De même, la septicémie représente l'une des quatre pathologies les plus chères parmi les différents modes de remboursement (Medicare, Medicaid, assurance privée et sans assurance) (54). En 2011, le coût d'un séjour hospitalier pour un patient septique aux Etats-Unis est environ de 20 000\$. Dans la population pédiatrique, ce coût est estimé entre 29 829\$ et 65 639\$ par patient (55). A noter que les dépenses les plus élevées concernent les services de réanimation néonatale où les soins sont très spécialisés (53).

Les facteurs contribuant à l'augmentation des coûts sont multiples. On peut noter tout d'abord la survenue d'infections nosocomiales, qui engendre une dépense trois fois plus importante (51, 52). Les autres facteurs sont l'origine chirurgicale, l'âge, et le décès du patient. D'autre part, cette augmentation est liée au nombre de dysfonctions d'organes (particulièrement lorsque le patient présente une défaillance cardiaque), et à un score APACHE II > 25 (*Acute Physiology And Chronic Health Evaluation*) (51).

III. DIAGNOSTIC

a) 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 d'un syndrome septique. Confusion, délirium, pertes cognitives (pouvant aller jusqu'au coma), marbrures, oedème

pulmonaire, lactatémie, hyperglycémie, augmentation de la créatinine, augmentation de la bilirubine sont autant d'exemple de signes de défaillances d'organes (18).

b) Microbiologique

Le diagnostic microbiologique doit être établi dans les plus brefs délais à fin d'appliquer au plus tôt une antibiothérapie adéquate. En fonction des événements 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 colorations de Gram qui permettent 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 (56-58). 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 (59).

c) Biologique/biomarqueurs

Un biomarqueur est un paramètre objectivement mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire ou physiologique, associé à une pathologie ou à son évolution. Il peut avoir plusieurs objectifs et utilisations (60, 61):

- *La sélection et stratification des patients* : il permet d'identifier ceux à plus haut risque de développer des événements indésirables (en fonction de la sévérité et du stade de la pathologie) afin de débiter une thérapie prophylactique ou de poursuivre les tests diagnostiques.
- *Le diagnostic* : il permet d'établir un diagnostic qui orientera la décision de traitement et ceci, de manière plus fiable, plus rapide et moins coûteuse que les méthodes déjà disponibles.
- *La stratification des risques* : il permet alors d'identifier des sous-groupes de patients au sein d'une population diagnostiquée, qui pourraient présenter des effets bénéfiques plus importants ou au contraire un dommage suite à l'intervention thérapeutique.
- *Le monitoring* : il permet également de mesurer la réponse à un traitement et ainsi d'estimer les doses et la durée de celui-ci.
- *Un critère d'évaluation substitutif* : il permet un résultat à court terme dans la prédiction d'une

réponse clinique à plus long terme pour une évaluation rapide de l'innocuité et l'efficacité du traitement.

Pierrakos *et al.* ont effectué une méta-analyse en cherchant sur Pubmed les mots clés « sepsis » et « biomarqueur ». Au total, 3370 références testant 178 biomarqueurs différents ont été reportées. Parmi les 178, 18 ont été utilisés uniquement dans des études expérimentales, 58 dans des travaux expérimentaux et des études cliniques et 101 seulement dans des essais cliniques. Trente-quatre ont été identifiés spécifiquement dans le diagnostic du sepsis et parmi ceux-ci, seulement 5 possèdent une sensibilité et une spécificité supérieures à 90% (62). Le Tableau 2 reprend ces biomarqueurs spécifiques du sepsis.

Sepsis biomarker	Clinical study	Type of measurement	Outcome
1 aPTT** [35]	C	c	High negative predictive value
2 CD11b*** [33]	B	s	Higher values in neonates with sepsis than in those with possible infection
3 CD25 [87]	A	s	Distinguished between sepsis and SIRS
4 CD64** [32,287]	C	s	Low sensitivity and specificity to distinguish between viral and bacterial infections
5 Complement (C3, C4, C5a) [219]	B	s	Distinguished between sepsis and SIRS
6 EA complex [230]	C	s	Diagnosis of sepsis, increased earlier than CRP
7 ELAM-1 (cellular and soluble) [129]	C(s)	c	Increased in trauma patients with sepsis compared with no sepsis
8 Endocan [127]	B	s	Distinguished between sepsis and SIRS
9 E-Selectin (cellular and soluble) [136]	B	s	Distinguished between sepsis and SIRS
10 Fibrin degradation products [36]	B	s	High negative predictive value
11 Gas6 [241]	B	s	Higher values in patients with severe sepsis compared with patients with organ failure but no sepsis
12 G-CSF [237]	C	s	Distinguished between sepsis and SIRS
13 Gelsolin [238]	B(s)	c	Higher in septic patients compared with patients without sepsis
14 IL-1 receptor antagonist [55]	C	s	Early diagnosis of sepsis before symptoms in newborns
15 IL-8* [61]	C	s	Higher in septic neutropenic patients compared with febrile neutropenic patients without sepsis
16 IL-10 [65]	A	s	Higher in septic shock compared with cardiogenic shock
17 IL-12*** [29]	C	s	Diagnosis of sepsis in pediatric patients
18 IL-18 [70]	B(s)	s	Distinguished between Gram-positive and Gram-negative sepsis. Higher in trauma patients with sepsis than in those without
19 IP-10*** [30]	C	s	Early diagnosis of sepsis in newborns
20 Laminin [38]	A	s	Distinguished between Candida sepsis and bacterial sepsis
21 LBP [204]	C	s	Distinguished between Gram-positive sepsis and Gram-negative
22 MCP-1 [61]	C	s	Distinguished between sepsis and SIRS in neutropenic pediatric patients
23 NO, nitrate, nitrite [161]	B	s	Higher in septic shock compared with cardiogenic shock
24 Osteopontin [75]	B	s	Distinguished between sepsis and SIRS
25 PAI-1 [118]	B	s	Higher in patients with sepsis and DIC compared with no-septic patients with DIC
26 Pentraxin 3 [207]	C	s	Distinguished between septic shock and SIRS
27 Peptidoglycan [262]	B(s)	c	Higher in postoperative patients with infection compared with no-infected postoperative patients
28 pFN [270]	B	s	Distinguished between sepsis and SIRS
29 PLA2-II (soluble)*** [31]	B	s	Distinguished between bacteremic and non-bacteremic infections
30 Serum lysozyme (enzyme activity) [258]	B	s	Distinguished between sepsis and organ rejection in transplanted patients
31 ST2 (soluble) [108]	A	s	Higher in septic patients compared with those with no sepsis
32 Surfactant protein (A, B, C, D) [192]	B	s	Early diagnosis of ARDS in septic patients
33 TREM-1 (soluble) [288,289]	C	s	Distinguished between sepsis and SIRS, diagnosed pneumonia
34 Troponin [193]	B	s	Diagnosis of myocardial dysfunction in septic patients

Tableau 2 : Les 34 biomarqueurs identifiés dans le diagnostic du sepsis (62)

* sensibilité et spécificité inférieures à 90% - ** sensibilité supérieure à 90% mais spécificité inférieure à 90% - *** sensibilité et spécificité supérieures à 90% - A : étude clinique avec moins de 20 patients – B : étude clinique incluant de 20 à 50 patients – C : étude clinique comprenant plus de 50 patients – (s) : uniquement des patients chirurgicaux – (m) : uniquement des patients médicaux – s : valeur unique – c : plusieurs valeurs au cours du temps
aPTT : temps de céphaline activée – ARDS : syndrome de détresse respiratoire aiguë – CRP : protéine C réactive – DIC : coagulation intravasculaire disséminée – ELAM : Molécules d'adhésion leucocytes-cellules endothéliales – G-CSF : granulocyte colony-stimulating factor – IP : interferon-induced protein – LBP : protéine de fixation des lipopolysaccharides – MCP : monocyte chemoattractant protein – NO : oxyde nitrique – PAI : inhibiteur de l'activateur du plasminogène – pFN : fibronectine plasmatique – PLA2 : phospholipase A2 – SIRS : syndrome de réponse inflammatoire systémique – TREM : triggering receptor exprimé par les cellules myéloïdes

Le développement rapide des technologies à haut débit dans le domaine de la génomique, protéomique et métabolomique a également permis l'identification de nouveaux biomarqueurs candidats en utilisant une approche à plus large échelle (63).

De plus, étant donné qu'aucune étude clinique n'a jusqu'ici fourni de preuves concluantes quant à l'utilisation d'un biomarqueur idéal présentant une sensibilité et une spécificité suffisantes, une approche avec une combinaison de biomarqueurs a été récemment proposée. Par exemple, dans une étude prospective incluant des patients suspectés d'infections communautaires, Kofoed *et al.* ont utilisé un panel de 6 biomarqueurs dont sTREM-1 (*soluble triggering receptor* exprimé par les cellules myéloïdes), CRP (protéine C réactive), procalcitonine, l'activateur du plasminogène de type urokinase soluble, le facteur d'inhibition de la migration des macrophages et le compte de neutrophiles. La précision de la détection des causes d'inflammation bactériennes et non bactériennes était significativement plus importante avec cette combinaison plutôt qu'avec chaque biomarqueur isolé (64). Dans une autre étude de Gibot *et al.*, un bioscore composé de 3 biomarqueurs (CD64, procalcitonine et sTREM-1) a démontré de meilleures performances dans le diagnostic du sepsis chez les patients sévères comparé à l'utilisation d'un marqueur seul. La probabilité de développer un sepsis était parallèle à l'augmentation du bioscore : le taux d'infection était de 3.8% pour un bioscore à 0 (les 3 biomarqueurs en dessous de leurs seuils) et de 100% pour un bioscore égal à 3 (les 3 biomarqueurs au-dessus de leurs seuils) avec une AUC de 0.97 (65).

IV. PHYSIOPATHOLOGIE DES SYNDROMES SEPTIQUES : PHASE PRECOCE

Le point de départ de l'état septique est la colonisation locale de l'organisme par un microorganisme pathogène, induisant d'abord une réaction inflammatoire locale. Sur le site de l'infection, les macrophages résidents et cellules dendritiques détectent la présence du pathogène par l'intermédiaire des **Toll-like récepteurs** (TLR) qui reconnaissent des motifs présents sur la grande majorité des bactéries, virus ou champignons : les **Pathogen-Associated Molecular Patterns** (PAMPs). L'activation par les TLR initie une cascade de réactions aboutissant à la translocation du Nuclear factor kappa B (NF- κ B) et donc la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires dont l'IL-1 β , l'IL-6 et le *Tumor Necrosis Factor* (TNF)- α . D'autres composés de l'immunité innée se mettent également en place tels que les polynucléaires neutrophiles ou le système du complément. Chez certains patients, le sepsis se développe lorsque la réponse anti-infectieuse initiale normale chez l'hôte, est dérégulée et amplifiée au niveau systémique. Les mécanismes indispensables au niveau local pour combattre une infection deviennent alors délétères pour l'organisme. L'amplification de la réponse immunitaire au niveau systémique provoque des dommages cellulaires et des dysfonctions d'organes

conduisant au sepsis sévère voire au choc septique (3). La réponse spécifique pour un patient donné dépend de l'agent pathogène responsable de l'infection (quantité et virulence), de l'hôte (caractéristiques génétiques et comorbidités) avec des réponses différentielles au niveau local, régional et systémique. De plus, la composition et la direction de la réponse de l'hôte changent probablement en parallèle de l'évolution clinique. En général, les événements pro-inflammatoires (qui ont pour but principal d'éliminer les agents pathogènes) sont responsables de dommages tissulaires collatéraux (3).

a) Phase précoce de l'infection et reconnaissance des micro-organismes

Le sepsis peut se développer suite à la reconnaissance directe de la bactérie ou de composants bactériens (e.g. lipopolysaccharide (LPS) pour les bactéries Gram-négatives et acide lipotéichoïque pour les Gram-positives) qui vont interagir avec les TLR afin de déclencher la cascade inflammatoire.

- Motifs moléculaires associés aux pathogènes

Ces motifs présents sur la grande majorité des bactéries, virus ou champignons sont appelés les ***Pathogen-Associated Molecular Patterns*** (PAMPs). Les produits relargués lors d'un sepsis dit « stérile » ou par un tissu endommagé par l'agent infectieux sont qualifiés de *Danger-Associated Molecular Patterns* (DAMPs) (66). Les DAMPs incluent des signaux de danger endogènes tels que de l'ADN (acide désoxyribonucléique), des histones, ou des hyaluronines libérées par les cellules nécrotiques, mais aussi des alarmines qui seront capables de transmettre un signal de danger interne.

Au niveau tissulaire, les macrophages résidents et les cellules dendritiques, cellules présentatrices de l'antigène (CPA), constituent la première ligne de défense par reconnaissance des PAMPs et DAMPs. Ceci se fait par l'intermédiaire des ***Pathogen Recognition Receptors*** (PRRs) présents à la surface des CPA (67).

- Pathogen Recognition Receptors (PRR)

Les PRRs sont constitués d'une famille de récepteurs structurellement différents mais avec la propriété commune de détecter les PAMPs et DAMPs. La principale famille de PRRs est constituée par les ***Toll-like receptors*** (TLR) qui peuvent reconnaître des molécules de la paroi bactérienne (lipoprotéines, LPS, acides lipoteichoïques, flagelline...), des molécules de la paroi fongique, mais également des acides nucléiques viraux et bactériens. Les TLR sont des récepteurs

transmembranaires de type I. Ils sont caractérisés par un domaine extracellulaire riche en leucine et un domaine intracellulaire TIR (*Toll-interleukin-1 receptor*) qui partage une forte homologie avec le domaine intracytoplasmique du récepteur de l'IL-1. Suite à la liaison au ligand, le récepteur forme un hétéro ou homodimère et recrute les molécules adaptatrices du signal grâce à leur domaine TIR.

Les récepteurs de type TLR appartiennent à un système de reconnaissance, de signalisation et de protection anti-infectieuse très ancien sur le plan de l'évolution. On a décrit 10 gènes TLR chez la souris et chez l'homme, et chacune des 10 protéines correspondantes est destinée à reconnaître un assortiment distinct de motifs moléculaires qui sont normalement absents chez les vertébrés normaux. Ces motifs sont caractéristiques de composants de microorganismes pathogènes. Puisqu'il n'existe que 10 gènes fonctionnels, les récepteurs de type Toll ont une spécificité limitée en comparaison des récepteurs d'antigène du système immunitaire adaptatif et ont évolué pour reconnaître certains motifs moléculaires associés aux microbes. Cependant, bien que la diversité des récepteurs de type Toll soit limitée, ils sont capables de reconnaître des éléments de la plupart des microbes pathogènes. Par exemple, TLR2 est essentiel pour les réponses à plusieurs lipoglycans bactériens ; TLR3, 7 et 8 pour les acides nucléiques viraux (comme l'ARN double brin), TLR4 pour les LPS bactériens (endotoxines), TLR5 pour la flagelline, et TLR9 pour des oligonucléotides non méthylés riches en CG (CpG) (68, 69). Ceci est illustré dans la **Figure 3**. Parmi les dix TLR différents qui ont été identifiés au sein du génome humain, c'est le TLR4 qui possède un rôle prépondérant dans cette phase de reconnaissance des microorganismes.

Certains de ces TLR sont présents à la surface de la cellule, où ils reconnaissent les produits microbiens extracellulaires. D'autres TLR sont dans les endosomes, dans lesquels des microbes ont été ingérés (67).

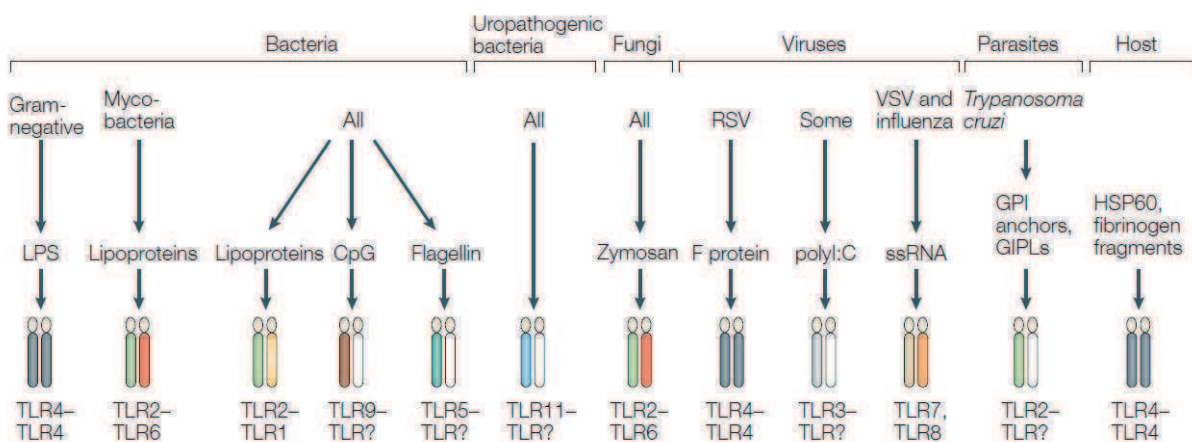


Figure 3 : Exemples de molécules exogènes et endogènes reconnues par les TLR (68)

GPI : glycosylphosphatidylinositol, HSP60 : heat-shock protein 60, polyI:C : ARN double brin, RSV : Virus respiratoire syncytial, ssRNA : ARN viral simple brin, VSV : virus de la stomatite vésiculaire

La stimulation des TLR passe par la *Myeloid differentiation primary-response protein* (Myd88) qui va, à son tour, recruter IRAK4 (*IL1-R associated kinase 4*), permettant ainsi la liaison d'IRAK1. IRAK4 induit alors la phosphorylation d'IRAK1. TRAF6 (*tumour-necrosis-factor-receptor-associated factor 6*) est recrutée par la forme phosphorylée d'IRAK1. Ce complexe se dissocie par la suite et forme un nouveau avec TAK1 (*transforming-growth-factor- β -activated kinase*), TAB1 (*TAK1-binding protein 1*) et TAB2 au niveau de la membrane plasmatique. Ceci aboutit à la phosphorylation de TAB2 et TAK1. IRAK1 est alors dégradée et le complexe restant (constitué de TRAF6, TAK1, TAB1 et TAB2) est transloqué dans le cytosol où il va s'associer avec UBC13 (*ubiquitin-conjugating enzyme 3*) et UEV1A (*ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1*). Ce qui va conduire à l'ubiquitination de TRAF6 et donc l'activation de TAK1. Cette dernière va alors phosphoryler d'une part les MAP (*mitogen-activated protein*) kinases et d'autre part, le complexe IKK (*inhibitor of nuclear factor- κ B (I κ B)-kinase complex*) composé d'IKK- α , IKK- β et IKK- γ . Le complexe IKK va phosphoryler I κ B, conduisant à son ubiquitination et sa dégradation. Ceci permet à NF- κ B de transloquer jusqu'au noyau et ainsi induire l'expression de ses gènes cibles dont notamment l'IL-1 β et le TNF α (67).

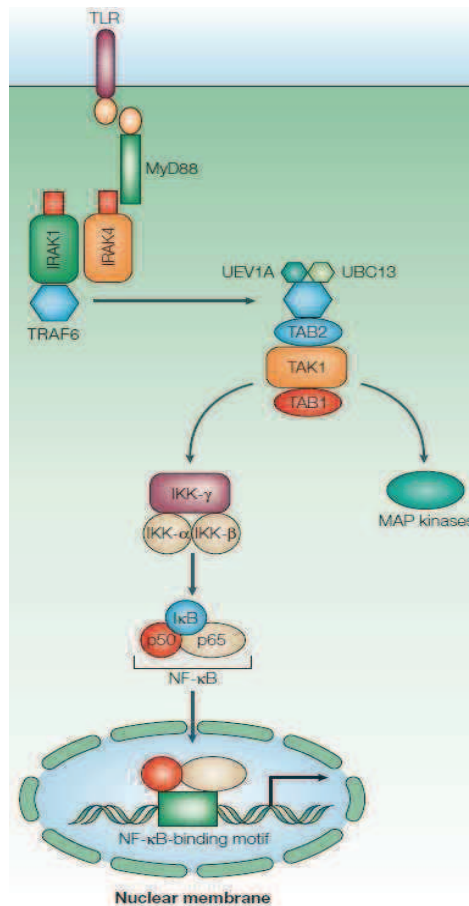


Figure 4 : La voie de signalisation du TLR via Myd88 (67)

TLR : Toll-like receptors, Myd88 : Myeloid differentiation primary-response protein, IRAK4 : IL1-R associated kinase 4, TRAF6 : tumour-necrosis-factor-receptor-associated factor 6, UBEV1A : ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1, UBC13 : ubiquitin-conjugating enzyme 3, TAB : TAK1-binding protein, TAK1 : transforming-growth-factor- β -activated kinase, IKK : inhibitor of nuclear factor- κ B-kinase complex, I κ B : inhibitor of nuclear factor- κ B, NF- κ B : nuclear factor- κ B

Néanmoins, la stimulation du TLR4 induit l'activation d'une voie de signalisation indépendante de Myd88. Celle-ci est à l'origine de l'activation d'IRF3 (*interferon-regulatory factor 3*) et conduit ainsi à une activation plus tardive de NF- κ B qui va induire l'expression des gènes inductibles de l'IFN et la production d'IFN- β (70).

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.

Parmi les PRR, les **NOD-Like Receptors** (NLRs) constituent une famille importante de protéines cytosoliques. Ils reconnaissent des fragments de peptidoglycanes bactériens et activent la voie NF- κ B. 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 (71, 72).

Les **RIG-I-Like Receptors** (RLRs) sont exprimés dans le cytosol et reconnaissent spécifiquement des acides nucléiques comme l'ARN viral. On compte trois RLRs : *retinoic acid-inducible gene 1* (RIG-I), melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5) and LGP2 (72, 73). Les RLRs sont composés de deux domaines CARDs (*caspase recruitment domains*) en N-terminal, un domaine central DEAD box helicase/ATPase et un domaine régulateur en C-terminal. L'expression des RLRs est augmentée de manière importante par une réponse IFN de type I ou par une infection virale.

Enfin, les **CLR** (*C-type lectin receptors*) 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 (74).

b) Cascade immuno-inflammatoire

Les signaux générés par l'engagement des TLR activent des facteurs de transcription qui stimulent l'expression de gènes codant des cytokines, des enzymes et d'autres protéines impliquées dans l'activation des fonctions antimicrobiennes des phagocytes et des cellules dendritiques. Deux des plus importants facteurs de transcription activés par les signaux provenant des TLR sont **NF- κ B**, qui induit l'expression de différentes cytokines et des molécules endothéliales d'adhérence, et **IRF3**, qui stimule la production d'interférons de type I, cytokines qui bloquent la réplication virale (69, 75).

- Orage cytokinique

L'activation de NF- κ B aboutit à la transcription de nombreuses **cytokines pro-inflammatoires**, telles que TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12, IL-8, l'interféron (IFN)- γ , le GM-CSF (*Granulocyte macrophage colony stimulating factor*), et l'IFN- β (76). Des concentrations élevées retrouvées chez les patients en choc septique sont synonymes d'un excès de production par les cellules de l'organisme en réponse à l'infection. Les cytokines jouent un rôle particulier car elles peuvent auto-entretenir leur production par le jeu des cascades cytokiniques et avoir des effets non seulement additifs mais aussi synergiques entre elles. Le **TNF- α** et **IL-1** sont les cytokines inflammatoires prototypiques qui jouent un rôle prépondérant dans la physiopathologie des syndromes septiques sévères. Elles sont libérées durant les premières 30-90 minutes après l'exposition au LPS et vont à leur tour activer une seconde vague de médiateurs inflammatoires incluant des cytokines, des médiateurs lipidiques et des espèces réactives de l'oxygène (3, 77).

En parallèle de cette réponse inflammatoire, l'hôte produit des **médiateurs anti-inflammatoires** dans le but de restaurer l'équilibre immunologique. Parmi les molécules anti-inflammatoires se trouvent des antagonistes comme les récepteurs solubles du TNF ou l'antagoniste du récepteur de l'IL-1, des inactivateurs de la cascade du complément et des cytokines dont l'IL-10, le TGF- β (*Transforming growth factor*), l'IFN- α , l'IL-4, l'IL-6 et l'IL-13 (3, 78).

- Recrutement des cellules inflammatoires

Lors d'une réponse optimale à une invasion bactérienne dans un espace stérile, les macrophages résidents sont capables de contenir l'infection initiale. Un contrôle local est idéal mais si l'infection submerge les premières lignes de défense, un recrutement de cellules inflammatoires sur le site de l'infection est nécessaire. Les cytokines sécrétées par les cellules résidentes stimulent la synthèse de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales. Ainsi, les polynucléaires neutrophiles circulants vont se lier de façon transitoire aux cellules endothéliales pour passer au niveau tissulaire par diapédèse. Parmi les cellules recrutées dans les tissus, on retrouve d'une part des cellules phagocytaires (neutrophiles et macrophages) mais également des cellules de l'immunité adaptative (lymphocytes) (79, 80). Lors d'une infection bactérienne, il existe donc d'importantes interactions entre les cellules présentatrices d'antigènes et les lymphocytes, effecteurs clés de l'immunité adaptative. L'antigène microbien est présenté aux lymphocytes T par les cellules présentatrices d'antigène, associé à d'autres marqueurs de surface comme le CD3 (*cluster de différenciation 3*) ou des molécules de costimulation (CD2, CD28...). Quand les signaux appropriés sont reçus, les lymphocytes T CD4 effecteurs sécrètent des cytokines comme l'IFN- γ , capable de stimuler les cellules phagocytaires. Elles vont alors pouvoir détruire les bactéries et interagir avec les

lymphocytes B. Les lymphocytes T augmentent également l'expression du CD40-ligand qui se lie au CD40 à la surface des CPA. Ceci induit un relargage d'IL-12 et le maintien de l'expression des molécules de costimulation, favorisant la communication entre les médiateurs de l'immunité innée et adaptative (79).

- Amplification systémique et état de choc (coagulation, complément, hypotension)

La généralisation de la réponse immunitaire a plusieurs conséquences au niveau de l'organisme. Les cytokines libérées au niveau systémique peuvent provoquer des lésions sur des organes même situés à distance du foyer infectieux, via l'activation des cellules endothéliales et inflammatoires présentes dans ces organes. La cause ultime de décès des patients en choc septique est la **défaillance multiple d'organes**. Il existe une relation directe entre la probabilité de survie et la sévérité de la défaillance initiale d'organe et le nombre d'organes défaillants des patients entrant en réanimation. Si quatre voire cinq organes sont touchés, le risque de décès peut atteindre 90%, quel que soit le traitement (77).

➤ Coagulation

Les cytokines jouent également un rôle procoagulant important dans le sepsis. En effet, les **troubles de la coagulation** sont fréquents et 30 à 50% des patients présentent la forme clinique la plus grave, la coagulation intra vasculaire disséminée (CIVD) (81). Même si le système de la coagulation n'est pas conventionnellement considéré comme une réaction immunitaire en réponse à une infection, il est indéniable que ces deux réponses sont intimement liées (3).

La cascade de coagulation est initiée par le LPS ou d'autres composants microbiens, en induisant l'expression du facteur tissulaire à la surface des cellules endothéliales et mononucléées. Le facteur tissulaire va à son tour activer une série de cascades protéolytiques, qui résultent en la conversion de la prothrombine en thrombine, générant la fibrine à partir du fibrinogène. En parallèle, les mécanismes fibrinolytiques régulateurs normaux sont affaiblis en raison d'une concentration plasmatique élevée de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type 1 (PAI-1) qui inhibe la formation de plasmine à partir du plasminogène. Le résultat est une augmentation de la production de fibrine ainsi qu'une diminution de son élimination. On observe alors la formation de caillots de fibrine au niveau des microvaisseaux, conduisant à une perfusion tissulaire insuffisante et une défaillance d'organe (poumons, reins, cœur). Il existe également une régulation négative des protéines naturellement anticoagulantes : antithrombine, protéine C et tissue factor pathway inhibitor (77). Ces molécules anticoagulantes, en plus de leur effet sur la génération de la thrombine,

possèdent des propriétés anti-inflammatoires, notamment en inhibant la libération de TNF- α par les monocytes. Les modifications de la cascade de la coagulation observées lors du choc septique sont résumées dans la **Figure 5**.

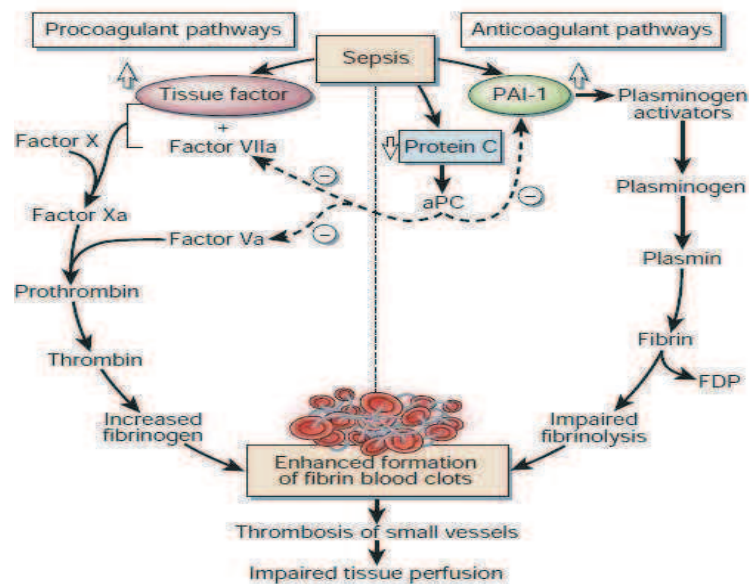


Figure 5 : Les troubles de la balance homéostatique entre les mécanismes pro et anticoagulants générés par le sepsis (77)

➤ Métabolisme cellulaire

Des anomalies dans le **métabolisme des lipides, glucides et protéines** surviennent fréquemment chez les patients septiques. Un apport en oxygène insuffisant, en raison d'altérations des capillaires (microcaillots) et d'un débit sanguin diminué, contribue au développement des mécanismes anaérobies et à la production de lactates.

De plus, même en cas d'apport en oxygène suffisant, le sepsis peut être à l'origine de dommages dans l'extraction et l'utilisation de l'oxygène cellulaire à cause de dysfonctions de la mitochondrie. Ceci peut aboutir à une diminution de production des radicaux oxygénés par certaines populations cellulaires dysfonctionnelles. Chez les patients septiques, il existe en effet une relation entre la dysfonction mitochondriale, la diminution de la concentration d'ATP (adénosine triphosphate) et la survenue d'événements indésirables. Ceci impliquerait une dysfonction de la bioénergétique comme mécanisme conduisant à la défaillance multiple d'organes (82).

➤ Augmentation de la perméabilité vasculaire

La perfusion microvasculaire, qui a pour but d'équilibrer l'apport tissulaire de l'oxygène des nutriments aux besoins tissulaires, est fortement compromise lors du sepsis. La stimulation du TLR4 par le LPS conduit à la production d'interférons de type I, qui peut résulter en la production **d'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS)** dans les cellules immunitaires et les tissus vasculaires et donc en synthèse de monoxyde d'azote (NO). La stimulation d'iNOS est aussi possible par l'intermédiaire de TNF- α et IL-1 (77).

Le NO est un puissant agent vasodilatateur, responsable de l'hypotension systémique (77). Cet excès de NO induit des lésions dans les microvaisseaux et une hyporéactivité vasculaire aboutissant à des défaillances d'organes, probablement par des mécanismes d'apoptose (76).

La combinaison de (i) l'hypovolémie due à la vasodilatation, (ii) 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**.

➤ Défaillance multi-viscérale

L'ensemble de ces phénomènes peut entraîner chez les patients en choc septique une défaillance de tous les organes (foie, rein, cœur, poumon, système nerveux central).

Alors que les mécanismes multifactoriels à la base du développement de défaillance d'organe ne sont que partiellement connus, la diminution de la perfusion tissulaire et l'hypoxie jouent un rôle primordial (77).

La **Figure 6** résume les lésions organiques potentielles au cours du sepsis.

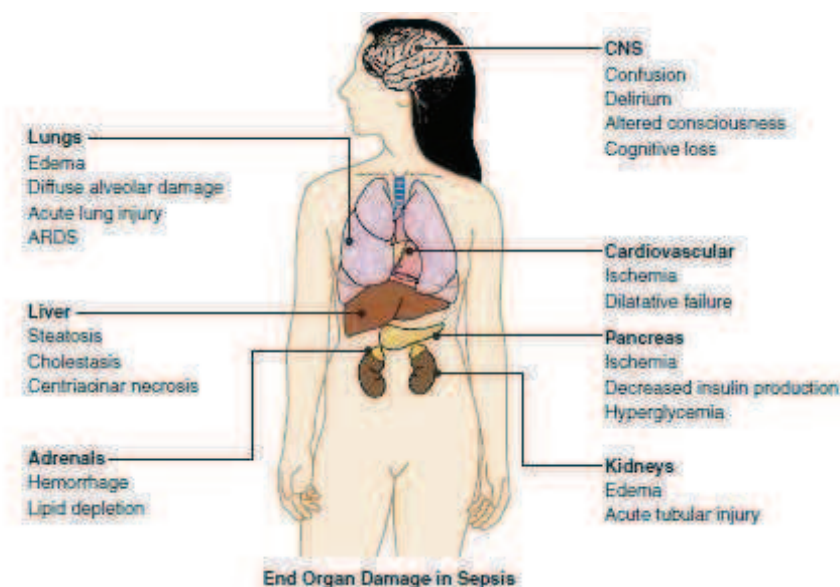


Figure 6 : Exemples de lésions organiques au cours du sepsis (81)

ARDS : Syndrome de détresse respiratoire aigu.

V. PRISE EN CHARGE THERAPEUTIQUE DES SYNDROMES SEPTIQUES

Devant le problème majeur de santé publique que représentent les syndromes septiques, un groupe d'experts internationaux s'est réuni en 2002 afin de définir des recommandations de traitement basées sur l'analyse critique d'études cliniques concernant différentes thérapeutiques. Il s'agit de la **Surviving Sepsis Campaign**, qui a pour objectif de développer un protocole de prise en charge des patients en choc septique et sepsis sévère, pratique et rapide à mettre en place pour les cliniciens. Ceci dans le but de diminuer la mortalité liée aux syndromes septiques (83). En 2012, un nouveau groupe d'experts (68 représentants de 30 organisations internationales) s'est rencontré afin de mettre à jour ces recommandations. Celles-ci ont été classées en 3 catégories : 1/ celles ciblant directement le sepsis sévère, 2/ celles pour le soin courant des patients gravement malades et à fort potentiel de développer un sepsis sévère, 3/ les recommandations pédiatriques (84).

Ainsi, le traitement doit être débuté le plus tôt possible dans des unités spécialisées de soins intensifs. Il consiste d'abord en **l'éradication de l'agent infectieux en cause** (*i.e.*, élimination de la source et anti-infectieux ciblés pour chaque patient). Le traitement est ensuite **symptomatique** avec une réanimation intense (*i.e.*, remplissage vasculaire, ventilation mécanique si nécessaire) pour pallier aux éventuelles défaillances d'organe. Enfin, plusieurs approches adjuvantes ont été envisagées mais, à ce jour, aucune d'entre elles n'est consensuellement acceptée (**Figure 7**).

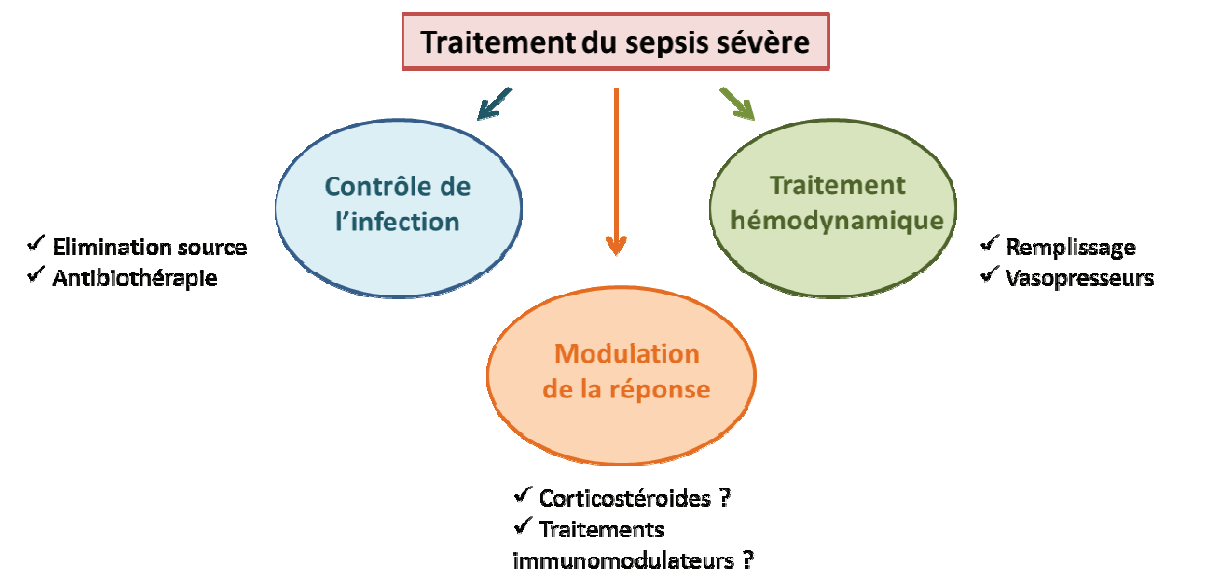


Figure 7 : Stratégie de traitement du sepsis sévère d'après Vincent *et al.* (85)

a) Traitement étiologique anti-infectieux

- Élimination de la source

Pour tous les patients présentant un sepsis sévère, la présence d'un foyer infectieux devrait être évaluée pour aider à la mise en place des mesures d'élimination de cette source. Le contrôle de la source consiste en une **intervention physique**. Spécifiquement, le drainage d'un abcès ou d'un foyer local d'infection, le débridement de tissus nécrosés infectés, le retrait de dispositifs médicaux potentiellement infectés ou le contrôle définitif de la contamination microbienne. Si besoin, d'autres disciplines médicales comme la radiologie, la chirurgie ou la gastroentérologie peuvent aider au diagnostic et au contrôle de la source infectieuse (2, 83).

L'élimination du foyer infectieux doit être la moins invasive possible. Il faut en effet rester vigilant à propos des complications possibles comme des saignements, des fistules ou des lésions organiques. Ainsi, l'intervention chirurgicale doit être considérée uniquement lorsque les autres alternatives sont à éliminer. De plus, elle doit être associée à un rapport bénéfice/risque minime (par exemple utiliser la voie percutanée plutôt qu'un drainage chirurgical pour un abcès) et doit être réalisée au mieux dans les 12h après le diagnostic.

- Antibiothérapie

L'antibiothérapie doit être débutée le plus tôt possible, dans la première heure après le diagnostic du choc septique ou du sepsis sévère. En effet, comme illustré dans la **Figure 8**, une étude de Kumar *et al.* souligne le lien entre le délai de mise en place de l'antibiothérapie et le risque de mortalité (86). On note une diminution de la survie de 7.6% pour chaque heure de délai d'administration.

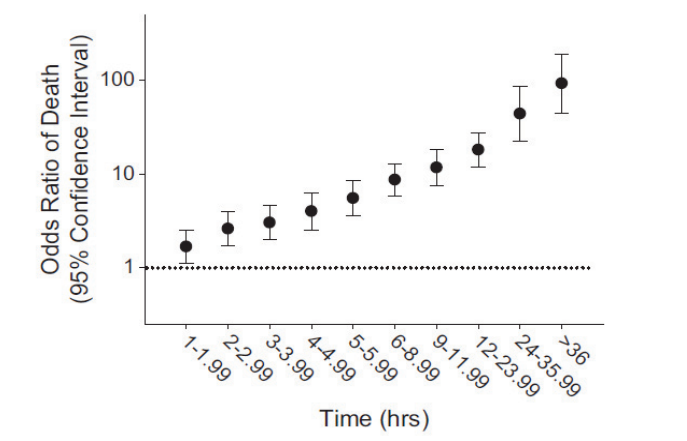


Figure 8 : Relation entre le délai de mise en place de l'antibiothérapie et le risque de mortalité des patients en choc septique (86)

Une étude plus récente de Ferrer *et al.* montre également l'importance de la mise en place rapide de l'antibiothérapie chez des patients en sepsis sévère et choc septique. Un total de 17 990 patients ont été inclus et ont reçu des antibiotiques après le diagnostic du sepsis. La mortalité hospitalière était de 29.7% dans cette cohorte. De manière intéressante, une augmentation significative de la mortalité était associée avec le nombre d'heures de délai avant la première administration d'antibiotiques (de 24.6% - 0-1h à 33.1% - 6h). De plus, les résultats étaient similaires entre les patients en sepsis sévère et choc septique, indépendamment du nombre d'organes lésés (87).

Initialement, un **traitement empirique** est mis en place, il doit être préférentiellement à large spectre (une ou plusieurs molécules ayant une action contre un maximum d'agents pathogènes bactériens et/ou fongiques et/ou viraux) et capables de diffuser à des concentrations adéquates au niveau de la source présumée du sepsis (88).

Le traitement est **réévalué quotidiennement** dans le but d'optimiser l'efficacité, de limiter le développement de résistances, de réduire la toxicité et le coût. Une désescalade vers l'antibiotique le plus approprié doit être réalisée dès que la bactérie et son antibiogramme sont connus pour éviter que le patient ne développe une infection causée par un pathogène résistant aux antibiotiques ou des effets indésirables liés au médicament. Il faut néanmoins rester vigilant sur le fait les hémocultures sont négatives dans 50% des cas de sepsis sévère et choc septique si les patients reçoivent déjà une thérapie antimicrobienne empirique. La décision de continuer, restreindre ou stopper les antibiotiques repose donc également sur un jugement clinique. Ainsi le traitement empirique ne doit pas durer plus de 3 à 5 jours. En général l'antibiothérapie est administrée de 7 à 10 jours (2).

Le choix des antibiotiques est complexe et dépend de nombreux facteurs : les antécédents du patient, notamment s'il présente des allergies médicamenteuses, l'existence d'une pathologie sous-jacente, le site d'infection, la pharmacocinétique/dynamique des antibiotiques choisis et la sensibilité des agents pathogènes communautaires ou hospitaliers. Il faut dans tous les cas éviter de prescrire des antibiotiques récemment utilisés par le patient car le risque de développer des bactéries résistantes est alors plus important (88).

- Prévention de l'infection

Les bonnes pratiques de prévention des infections doivent être mises en place par une équipe expérimentée dans les services de réanimation. Notamment le lavage rigoureux des mains,

l'hygiène des cathéters, l'aspiration des sécrétions et les mesures de protection (gants) sont importants. D'après les recommandations de la *Surviving Sepsis Campaign*, la **décontamination orale sélective** (DOS) et la **décontamination digestive sélective** (DDS) devraient être introduites afin de réduire l'incidence des pneumopathies associées à la ventilation. De plus, chez les patients présentant un sepsis sévère, le gluconate de chlorhexidine peut aussi être utilisé comme décontaminant oropharyngé dans la même indication. Cependant, l'utilisation de ces techniques reste encore sujette à débat en pratique quotidienne (2).

b) Traitement hémodynamique et défaillances d'organes

- Remplissage

Le choc septique est accompagné d'une hypoperfusion tissulaire résultant notamment de pertes externes, d'une augmentation de la perméabilité des capillaires avec le développement d'œdèmes, et d'une augmentation du volume plasmatique par vasoplégie et hypovolémie relative. L'hypovolémie et l'hypoperfusion sont associées aux défaillances d'organes. Par conséquent, un remplissage suffisant et mis en place précocement est capital pour restaurer et maintenir une perfusion tissulaire adaptée (85).

Il existe deux grands types de liquides de remplissage : les **colloïdes** (albumine, gélatine, dextrans, hydroxyethylamidon (HEA)) et les **cristalloïdes** naturels ou artificiels (NaCl 0.9%, Ringer). L'utilisation des colloïdes fait cependant débat en raison d'effets indésirables majeurs reportés. Alors que l'albumine semble être neutre et bénéfique (89), les HEA sont à l'origine d'insuffisance rénale sévère (90), de saignements et même dans une étude, d'une augmentation de la mortalité (91). Ainsi, les recommandations 2013 de la *Surviving Sepsis Campaign* indiquent que les cristalloïdes constituent le liquide de remplissage de premier choix pour les patients en choc septique et sepsis sévère. Si la quantité à utiliser est trop importante, on utilisera alors l'albumine (colloïde) (2).

- Vasopresseurs

Si le remplissage seul est incapable de restaurer une perfusion suffisante, des molécules vasoactives seront administrées. Plusieurs agonistes α -adrénergiques ont été proposés, essentiellement des **catécholamines** (dopamine, noradrénaline). Ces dernières sont très efficaces et agissent rapidement, permettant ainsi un dosage facile. La noradrénaline est le vasopresseur à utiliser en première intention et l'adrénaline sera ajoutée si besoin est d'un deuxième agoniste α -adrénergique (elle peut aussi substituer la noradrénaline).

Les vasopresseurs sont administrés afin d'assurer le maintien d'une pression artérielle moyenne (PAM) supérieure à 65 mm Hg, permettant de garder une perfusion tissulaire suffisante pour le fonctionnement des organes (2). Néanmoins, la PAM optimale doit être considérée individuellement puisqu'elle peut être plus élevée chez des patients souffrant notamment d'athérosclérose ou d'hypertension que chez de jeunes personnes sans comorbidités cardiovasculaires associées. Par exemple, une valeur cible de PMA de 65 mm Hg pourrait être trop faible chez un patient présentant une hypertension sévère et non contrôlée alors qu'elle sera adéquate chez un jeune patient (sans contexte d'hypertension). Ainsi, compléter par d'autres paramètres comme la pression artérielle, l'évaluation de la perfusion régionale et globale, les concentrations en lactates, la perfusion de la peau, le statut mental ou le débit urinaire, est important (84).

- Hémofiltration

Une autre approche possible est **d'éliminer activement les médiateurs en excès** en utilisant des stratégies extracorporelles. Les techniques d'hémofiltration permettent de retirer de nombreux composés bactériens et substances potentiellement nocives pour l'organisme, mais aussi des produits bénéfiques comme les hormones ou des médicaments (antibiotiques notamment).

Des études cliniques ont fourni des données contradictoires concernant les effets de ces techniques sur l'outcome. Une étude multicentrique présentée par Cruz *et al.* a souligné que l'hémofiltration (avec la polymyxine B comme adjuvant), associée à la prise en charge conventionnelle, améliorerait significativement l'hémodynamique, les dysfonctions d'organe, et réduisait la mortalité à 28 jours dans une population de sepsis sévère et choc septique (92). En revanche, une autre étude de Payen *et al.* rapporte que l'utilisation de l'hémofiltration chez des patients en sepsis sévère n'améliore ni le nombre et la sévérité des dysfonctions d'organe, ni ne modifie les concentrations plasmatiques de cytokines pro-inflammatoires (93).

Par conséquent, même si cette méthode peut s'avérer bénéfique dans le futur, des études complémentaires sont nécessaires pour définir clairement le débit de filtration optimal, le timing, la taille des pores du filtre et l'utilisation d'autres adjuvants comme par exemple la polymyxine, avant son utilisation quotidienne (85).

c) **Thérapies adjuvantes**

- Corticostéroïdes

L'administration de **stéroïdes** aux patients présentant un syndrome septique a été proposée initialement pour leurs propriétés anti-inflammatoires. Cependant, les doses importantes prescrites initialement pour cette indication n'ont pas montré d'effet bénéfique sur l'outcome et ont conduit à l'arrêt de cette thérapeutique (94, 95).

Dans les années 1990, l'hypothèse d'une insuffisance surrénalienne relative (production trop faible ou réponse réduite au cortisol) chez les patients septiques a permis l'instauration de faibles doses en clinique (85). En effet, les corticoïdes à faible dose améliorent la réponse vasculaire aux catécholamines. Annane *et al.* ont démontré que l'administration de doses modérées de corticostéroïdes (50mg hydrocortisone en IV (intraveineux) toutes les 6h) chez des patients en choc septique présentant une insuffisance surrénalienne (évaluée par le dosage de l'hormone corticotrope (ACTH)) améliorait la survie (96). Néanmoins, d'autres études comme celle de Sprung *et al.* n'ont pas confirmé les effets bénéfiques des faibles doses de corticostéroïdes (97). On peut noter que cette dernière étude incluait des patients présentant un sepsis moins sévère que dans la première étude d'Annane et qu'il est ainsi possible que les corticostéroïdes diminuent la mortalité dans les chocs septiques plus sévères. Leur utilisation devrait être envisagée dans cette perspective.

Les recommandations 2013 de la *Surviving Sepsis Campaign* consistent en une administration d'hydrocortisone intraveineuse uniquement chez les patients en choc septique dont la pression sanguine n'est améliorée ni par le remplissage vasculaire ni par les vasopresseurs (2).

Néanmoins, dans une méta-analyse récente de Voldeba *et al.*, aucun effet bénéfique supportant l'utilisation des stéroïdes dans le traitement du sepsis n'a été retrouvé. L'analyse séquentielle des essais cliniques suggère que des études incluant plusieurs milliers de patients seraient nécessaires afin de changer la donne (98).

- Contrôle de la glycémie

L'**hyperglycémie** associée aux états septiques sévères est la conséquence d'une accumulation des hormones hyperglycémiantes comme le glucagon, les catécholamines et les hormones de croissance, et de l'augmentation simultanée de la résistance à l'insuline.

C'est une étude de Leuven en 2001 qui a pour la première fois, associé l'administration d'insuline avec une diminution de la mortalité (99). Néanmoins, Falciglia *et al.* ont rapporté, dans une cohorte multicentrique de patients de réanimation, une hyperglycémie associée à une mortalité plus élevée indépendamment de la sévérité du patient (100). Ainsi, un contrôle minutieux de la glycémie est lié à une amélioration de la survenue d'événements indésirables chez les patients critiques. Cependant, des protocoles trop stricts peuvent également être à l'origine d'hypoglycémie.

Par conséquent, une fenêtre raisonnable de travail serait de commencer les doses d'insuline lorsque le patient présente deux glycémies consécutives strictement supérieures à 180 mg/dl. Cette approche vise à obtenir une glycémie inférieure ou égale à 180 mg/dl plutôt qu'une valeur cible supérieure à 110 mg/dl. La glycémie devra être vérifiée toutes les 1 à 2 heures jusqu'à ce que les doses d'insuline et les valeurs de glucose soient stables, puis toutes les 4h (2). Cette valeur cible de 180 mg/dl provient de l'essai clinique NICE-SUGAR (*Normoglycemia in Intensive Care Evaluation-Survival Using Glucose Algorithm Regulation*). Cette étude multicentrique qui a recruté 6104 patients, compare un groupe contrôle « intensif » (valeurs cibles comprises entre 81 et 108 mg/dl) avec un groupe « conventionnel » (valeurs cibles inférieures ou égales à 180 mg/dl). Une hypoglycémie sévère ainsi qu'une mortalité plus élevées étaient à noter dans le groupe « intensif » (101).

- Protéine C activée

Le lien entre la coagulation et l'inflammation a conduit à considérer que les protéines clés impliquées dans la cascade de la coagulation pourraient avoir des effets bénéfiques dans le sepsis. La protéine C activée, en plus de son action anticoagulante, possède d'importantes propriétés anti-inflammatoires et anti-apoptotiques.

En effet, l'administration de protéine C activée ou drotécogin alpha (activée) tôt dans la prise en charge du sepsis sévère et du choc septique a montré une réduction de la mortalité au sein d'un essai clinique multicentrique randomisé (102). Néanmoins, il existe une polémique quant à la validité des résultats de cette étude, notamment à la lumière de travaux réalisés ultérieurement et ne présentant aucun bénéfice chez les patients (103, 104). L'utilisation de cette molécule est également associée à un risque hémorragique accru. De plus, son coût important pourrait en limiter l'administration pour les patients (105).

Ainsi, la protéine C activée (Xigris®) a été retirée du marché en 2011.

- Traitements immunomodulateurs

Un grand nombre de molécules immunomodulatrices a été testé dans des études expérimentales et cliniques. Quelques exemples sont repris dans le **Tableau 3**.

Cependant, la majorité de ces essais cliniques n'a montré qu'un intérêt limité, en dépit de résultats précliniques prometteurs. Les raisons sont multiples : dosage utilisé inadapté, données précliniques insuffisantes, cinétique d'administration incorrecte, sévérité de la maladie inadéquate, marqueur d'efficacité inadapté... (106).

Thérapies testées dans des essais cliniques	Exemples
Traitements anti-endotoxines	Anticorps anti-endotoxines
	Analogues du LPS
	Élimination du LPS
Antagonistes de médiateurs spécifiques	TNF (anticorps anti-TNF, récepteurs du TNF)
	IL-1 ou IL1-RA
Coagulants	Protéine C activée
	Antithrombine
	Inhibiteur du facteur tissulaire
Interventions non spécifiques	Corticostéroïdes
	Hémofiltration haut-débit

Tableau 3 : Exemples de thérapies immunomodulatrices testées dans des essais cliniques d'après Vincent *et al.* (106)

Les **traitements anti-endotoxines** ont été les premiers expérimentés puisque la structure de l'endotoxine, constituant des bactéries Gram (-), est connue depuis les années 1960. Des anticorps anti-endotoxines sont présents naturellement dans le sang circulant et apportent une protection relative lors de l'exposition à l'endotoxine. Ainsi, plusieurs anticorps monoclonaux anti-endotoxines ont été développés. Dans une étude de Ziegler *et al.* de phase III, aucune diminution de la mortalité n'était mise en évidence pour la cohorte totale mais une réduction du nombre de décès était observée dans un sous-groupe de patients présentant une bactériémie à Gram (-) (107). Cependant, McCloskey *et al.* n'ont rapporté aucune différence dans les taux de mortalité chez les patients en choc septique avec une bactériémie à Gram (-) avec le même anticorps monoclonal. De plus, cet essai clinique fut stoppé en raison d'une augmentation du nombre de décès chez les patients sans bactériémie à Gram (-) (108).

L'endotoxine semble être un acteur précoce dans la physiopathologie du sepsis, ainsi si le traitement n'est pas administré assez tôt dans la prise en charge, il est peu probable que celui-ci soit efficace. La difficulté est donc d'identifier très rapidement quels patients présentent un sepsis à Gram (-) pour leur administrer une molécule anti-endotoxine. Cependant, les hémocultures peuvent prendre jusqu'à 48h et sont même négatives pour 50% des patients septiques (109).

Le **TNF- α** est un médiateur clé dans la réponse inflammatoire du sepsis et est à l'origine de nombreuses variations physiologiques observées dans le sepsis lorsqu'il est administré à des volontaires sains. De plus, la persistance de concentrations élevées en TNF- α est associée à une mortalité plus importante des patients septiques. Des préparations d'anticorps monoclonaux murins anti-TNF- α ont été les premières molécules anti-TNF- α testées dans le choc septique. En dépit de

premiers résultats plutôt prometteurs, un essai clinique plus important n'a montré aucun bénéfice sur la mortalité, la durée du sepsis ou la résolution des dysfonctions d'organes, même dans un sous-groupe de patients avec une concentration plasmatique de TNF- α initialement élevée (110).

Le TNF- α agit via deux récepteurs distincts : TNFR1 (p55) et TNFR2 (p75) qui sont régulés séparément au niveau de la membrane plasmique. Des récepteurs solubles sont produits par clivage de la forme liée. Ils sont augmentés dans le sepsis, agissant probablement comme un rétrocontrôle négatif sur l'activité de TNF- α . Un essai clinique avec le TNFR1 a présenté des résultats encourageants avec une tendance à la diminution de la mortalité à 28 jours chez des patients en sepsis sévère (111). Cependant, un autre essai clinique impliquant également le TNFR1 n'a pas permis de corroborer ces résultats (112).

L'**IL-1** agit de manière synergique avec le TNF- α . Des études se sont intéressées à un récepteur antagoniste de l'IL-1, l'IL-1RA, une protéine naturellement produite par les macrophages et qui se fixe sur le récepteur de l'IL-1. Un premier essai clinique testant un antagoniste recombinant a permis de confirmer les données de phase II, montrant une augmentation dose dépendante de la durée de survie chez des patients septiques présentant des dysfonctions d'organes et/ou un risque de mortalité prédit supérieur ou égal à 24% (113). Mais un second essai de phase III réalisé par la suite n'a montré aucune différence dans les taux de survie (114). Plusieurs explications pour expliquer ces résultats discordants ont été évoquées et notamment des différences dans les deux cohortes étudiées. Malgré l'utilisation en utilisant les mêmes critères d'inclusion, l'augmentation des sepsis avec une bactériémie à Gram(+) rend les patients moins sensibles à ce type de thérapie (114).

Le **TLR4** est un récepteur cellulaire important, stimulé par l'endotoxine et impliqué dans la production de cytokines pro-inflammatoires par activation de la voie du NF- κ B. Bloquer l'expression ou l'activité du TLR4 peut ainsi potentiellement réduire la réponse pro-inflammatoire en réponse à l'infection. Pourtant, dans un essai clinique de phase III testant un inhibiteur synthétique de la signalisation médiée par TLR4 (anti-LPS), l'Eritoran®, ce traitement n'a montré aucun effet sur la mortalité à 28 jours comparé à un placebo (28 vs 27% de mortalité, $p = 0.59$). Ce résultat était aussi retrouvé dans les sous-groupes de patients présentant ou non une bactériémie à Gram (-) (115).

Les **statines** sont devenues les médicaments les plus largement prescrits dans le traitement du cholestérol. Ainsi, 20% des patients admis à l'hôpital en prennent déjà à leur entrée. Grâce à des études observationnelles, l'utilisation de statines a été montrée comme associée à une réduction du taux de mortalité chez les patients septiques. C'est pourquoi le nombre d'essais cliniques testant ces molécules dans des cohortes septiques n'a cessé d'augmenter ces dernières années (116).

Néanmoins, comme le montrent Papazian *et al.* sur une cohorte de 284 patients, l'utilisation de la simvastatine comme thérapie adjuvante dans le sepsis n'a pas amélioré le taux de mortalité à 28 jours, comparée à un placebo (117). De même, une méta-analyse récente recense 7 essais cliniques datant d'avant août 2014, comparant ainsi 1720 patients septiques. Les résultats sont clairs : les statines ne diminuent pas la mortalité hospitalière, ni la mortalité à 28 jours chez les patients en sepsis, comparées à un placebo (118).

d) Echec des essais cliniques testant des thérapeutiques immunomodulatrices

Pendant de nombreuses années, la physiopathologie des syndromes septiques a été considérée comme la conséquence d'une réponse pro-inflammatoire excessive. Ainsi, les thérapeutiques anti-inflammatoires sont apparues comme des molécules de choix. Ayant des effets bénéfiques dans les modèles animaux, elles ont ensuite testées chez l'homme. Les résultats sont pourtant décevants en comparaison des essais expérimentaux beaucoup plus convaincants. Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer ces échecs répétés :

- Un manque d'efficacité des molécules testées
- *La dose de l'agent testé inadaptée*
- Un défaut de stratification des patients traités
- Une absence de contrôle de l'effet biologique attendu
- Des modèles animaux peu représentatifs de l'expression clinique septique chez l'homme
- Une population septique très hétérogène

e) Conclusion

En termes de thérapeutiques adjuvantes, différentes stratégies dirigées contre les acteurs de la réponse inflammatoire ont été testées sans succès dans le choc septique (certaines sont présentées dans le **Tableau 3**).

L'échec des essais cliniques testant des thérapeutiques anti-inflammatoires soulève plusieurs problèmes, notamment la difficulté à mettre en place des modèles animaux pertinents (119) ou l'hétérogénéité des patients. Surtout, cela a contribué à remettre en cause la vision essentiellement pro-inflammatoire du choc septique (120).

3. EVOLUTION DES CONNAISSANCES DE LA PHYSIOPATHOLOGIE

Le choc septique est traditionnellement caractérisé par une réaction inflammatoire systémique excessive en réponse à un pathogène. Le décès des patients septiques a longtemps été associé uniquement à une hyper-activation du système immuno-inflammatoire, mais suite aux échecs répétés des essais cliniques utilisant des molécules anti-inflammatoires, cet aspect de la physiopathologie des syndromes septiques a été remis en cause (15). En effet, des **mécanismes anti-inflammatoires de compensation** se mettent rapidement en place et peuvent expliquer le phénomène d'immunoparalysie observé pendant la phase tardive du choc septique.

I. MECANISMES ANTI-INFLAMMATOIRES DE COMPENSATION

Plusieurs mécanismes sont responsables de cette compensation anti-inflammatoire, notamment la production de médiateurs anti-inflammatoires, le phénomène de tolérance à l'endotoxine, l'induction de l'apoptose ou encore les régulations centrale et épigénétique.

a) Production de médiateurs anti-inflammatoires

Des travaux portant sur les cytokines circulantes ont montré qu'en parallèle des molécules pro-inflammatoires, les concentrations de l'**IL-10**, puissante cytokine anti-inflammatoire étaient également augmentées chez les patients septiques. En effet, Van Dissel *et al.* ont montré qu'il existe une corrélation entre un ratio IL-10 sur TNF- α élevé et la mortalité chez des patients présentant une infection communautaire (121). De même, Gogos *et al.* décrivent une augmentation des réponses pro et anti-inflammatoires dans une cohorte de patients en choc septique avec des concentrations plus importantes chez les non-survivants. La production d'IL-10 y est présentée comme facteur pronostic de sévérité (corrélée au SAPS II : *Simplified Acute Physiologic Score II*) et de survie (122).

Historiquement, c'est la présence d'un autre composé dans le plasma de patients méningococciques qui a démontré la présence de molécules anti-inflammatoire au cours des états septiques. Dans cette étude de Girardin *et al.*, en plus du **TNF- α** , son **récepteur soluble** était également retrouvé en concentration importante et était associé à un mauvais pronostic (123).

Nous retrouvons d'autres médiateurs anti-inflammatoires en quantité augmentée lors des syndromes septiques, notamment le **TGF- β** , des **récepteurs solubles** (récepteur au TNF- α , récepteur antagoniste de l'IL-1), le cortisol ou encore les prostaglandines. Tous ces composés ont pour fonction

de réduire la production ou d'inhiber l'action des cytokines pro-inflammatoires (IL-1, TNF- α , IL-6, IL-12). Ils auraient ainsi un rôle protecteur. En effet, les souris déficientes en cytokines anti-inflammatoires (IL-10, TGF- β) sont très sensibles au choc septique induit par l'injection de LPS en raison d'une réaction inflammatoire incontrôlée (124).

Cependant, libérées en grande quantité, ces molécules peuvent également avoir des effets délétères.

Leur production pourrait être la conséquence directe de la réponse pro-inflammatoire initiale et jouerait un rôle de rétrocontrôle négatif.

b) Phénomène de tolérance à l'endotoxine

Les adaptations physiologiques permettant de réguler la réponse inflammatoire excessive observée lors du choc septique sont importantes pour défendre l'hôte. Un exemple de ces mécanismes protecteurs est le phénomène de tolérance à l'endotoxine, pendant lequel les cellules, exposées à de faibles concentrations d'endotoxine (*i.e.*, LPS), entrent dans un état transitoire insensible et sont incapables de répondre à des stimulations ultérieures. Ces cellules deviennent alors « tolérantes » à l'endotoxine. Ainsi, des souris ayant reçu une dose sublétales de LPS sont protégées d'une seconde dose létale de LPS. Ce phénomène a été observé aussi bien dans des études *in vitro* que dans des modèles *in vivo* ou chez l'homme. L'incidence de cette tolérance à l'endotoxine a en effet été rapportée dans différents contextes cliniques tels que le sepsis (125, 126).

Les patients septiques présentent des caractéristiques similaires au phénomène de tolérance à l'endotoxine. En effet, une réponse altérée des monocytes circulants en réponse au LPS a été observée. Notamment, on remarque une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-6, l'IL-1 et l'IL-12 après stimulation *ex vivo* par les monocytes des patients, par rapport à des volontaires sains (127). En parallèle, il se produit une induction d'expression des gènes codant pour des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10, le TGF- β et l'IL1-RA (125). De plus, la fonctionnalité des monocytes est également altérée avec une diminution de l'expression du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) de classe II, ou HLA-DR (*Human Leucocyte Antigen*), conduisant à une présentation de l'antigène atténuée. Dans de nombreuses études, la survenue d'infections nosocomiales et/ou la mortalité en réanimation sont associées à une baisse persistante de l'expression monocyttaire de HLA-DR (mHLA-DR) (sepsis, traumatismes, chirurgie, brûlures) (128, 129).

c) Induction de l'apoptose

L'induction de l'apoptose des cellules immunitaires effectrices apparaît comme une des caractéristiques du sepsis. Par ailleurs, un nombre important d'études a montré que le dérèglement de ce processus pourrait être à l'origine des dysfonctions immunitaires et défaillances multiples d'organes observées chez les patients (15, 128, 130).

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est un processus normal d'autodestruction d'une cellule en réponse à un signal interne. Ce mécanisme peut être induit par deux voies principales différentes et convergentes : la **voie extrinsèque**, qui fait intervenir des récepteurs membranaires de mort cellulaire, et la **voie intrinsèque** via les mitochondries. Au cours du choc septique, les deux voies sont altérées.

Pionniers dans le domaine, Hotchkiss *et al.* ont réalisé des autopsies de patients septiques 30 à 90 minutes après leur décès (afin d'éviter des changements cellulaires dus à l'autolyse). Ceci a révélé une augmentation importante de l'apoptose des lymphocytes (T CD4+ et B) et des cellules épithéliales gastro-intestinales, confirmant des résultats similaires obtenus chez l'animal. Bien qu'aucune perte des lymphocytes T CD8+ ou des NK n'ait été observée, la diminution était importante pour les B et T CD4+. Des études ultérieures sur des cohortes pédiatriques ont confirmé que les patients septiques présentent une déplétion induite par l'apoptose des lymphocytes T CD4+ et B (131). Nous remarquons qu'au contraire, l'apoptose des neutrophiles est retardée chez les patients septiques, prolongeant leur durée de vie (132).

Deux mécanismes principaux par lesquels l'apoptose contribue à l'état d'immunoparalysie au cours du sepsis ont été décrits.

Le premier correspond à la déplétion en cellules effectrices primordiales au bon déroulement de la résolution de l'infection. Cette importante diminution des lymphocytes T CD4+ et B a un impact sur le système immunitaire adaptatif mais aussi sur la réponse innée en raison des nombreuses interactions entre les deux systèmes. De plus, il existe également une induction de l'apoptose des cellules dendritiques, qui en présentant l'antigène sont à l'interface entre les réponses innée et adaptative.

Le second mécanisme est l'induction de l'anergie. En effet, la destruction des corps apoptotiques par les macrophages induit la synthèse de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 ou le TGF- β tout en supprimant la production de cytokines pro-inflammatoires. D'autre part, la destruction des corps apoptotiques par les cellules dendritiques et macrophages ne permet pas l'expression des molécules de costimulation. En effet, les corps apoptotiques n'expriment pas les molécules de costimulation. Ceci a pour conséquence, soit d'inhiber les lymphocytes T qui entrent en contact avec les CPA, soit d'induire leur apoptose (131).

d) Régulation nerveuse

Les systèmes immunitaire et nerveux sont interconnectés et coopèrent pour défendre l'organisme lors d'une agression. Le système nerveux central régule l'immunité innée grâce à des voies hormonales et neuronales. Une communication bidirectionnelle existe et ces deux systèmes travaillent ensemble pour, dans un premier temps activer et amplifier la réponse inflammatoire locale afin de contenir et éliminer les pathogènes, puis résoudre l'inflammation et retrouver un état homéostatique.

A l'échelle systémique, l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien, sous contrôle du système nerveux central, a des effets inhibiteurs sur la réponse immunitaire via la production de cortisol. Ce dernier a de multiples conséquences immunomodulatrices médiées par le récepteur aux glucocorticoïdes. En parallèle, trois cytokines (TNF- α , IL-1 et IL-6) fortement produites lors du sepsis ont un rôle synergique important dans l'activation de cet axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien en stimulant la production de CRH (*Corticotrophin-releasing hormon*), induisant la formation d'ACTH, et donc la synthèse de cortisol par le cortex surrénalien.

Ces connexions entre les systèmes immunitaire et nerveux sont représentées sur la **Figure 9** (133).

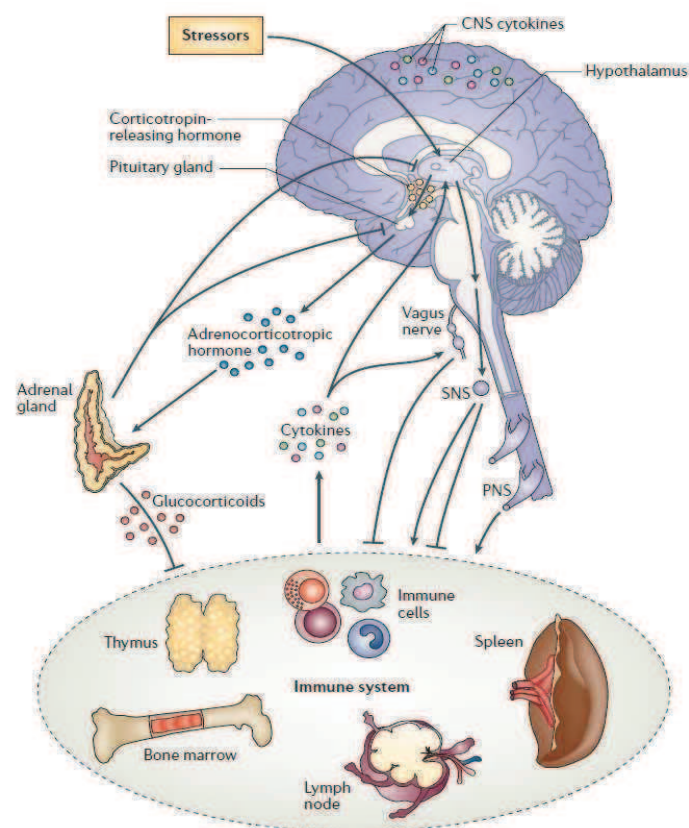


Figure 9 : Connexions entre les systèmes nerveux et immunitaire (133)

CNS = Système nerveux central, SNS = Système nerveux sympathique, PNS = Système nerveux périphérique

e) Régulation épigénétique

L'épigénétique est un terme général regroupant tous les mécanismes qui gouvernent l'expression des gènes sans modifier la séquence ADN existante de l'organisme. Ces mécanismes réversibles incluent des modifications chimiques de l'ADN et/ou des histones associées, ce qui conduit à une modification de l'accessibilité de l'ADN aux facteurs de transcription (134). A la différence des mutations génétiques qui sont permanentes car reliées à des altérations de l'ADN, et retrouvées dans toutes les cellules, les modifications épigénétiques sont responsables des modifications transitoires de la transcription pour un type cellulaire donné. Plusieurs mécanismes épigénétiques sont nécessaires pour réguler l'expression du génome humain au cours du cycle cellulaire, au cours de l'ontogénèse, et en relation avec les sollicitations de l'environnement.

L'importance de l'épigénétique dans le développement du système immunitaire et l'apparente corrélation entre la chronicité d'une pathologie et la régulation épigénétique des gènes inflammatoires, en fait une thématique de recherche importante. Celle-ci joue un rôle dans l'immunité innée et l'immunité adaptative (134).

II. CONSEQUENCES SUR LE SYSTEME IMMUNITAIRE

L'immunosuppression développée au cours des états septiques sévères touche les différentes lignées de l'immunité cellulaire (**Figure 10**). L'objectif de ce travail portant sur l'étude des polynucléaires neutrophiles, nous passerons rapidement sur les dysfonctions monocytaires (immunité innée) et lymphocytaires (immunité adaptative).

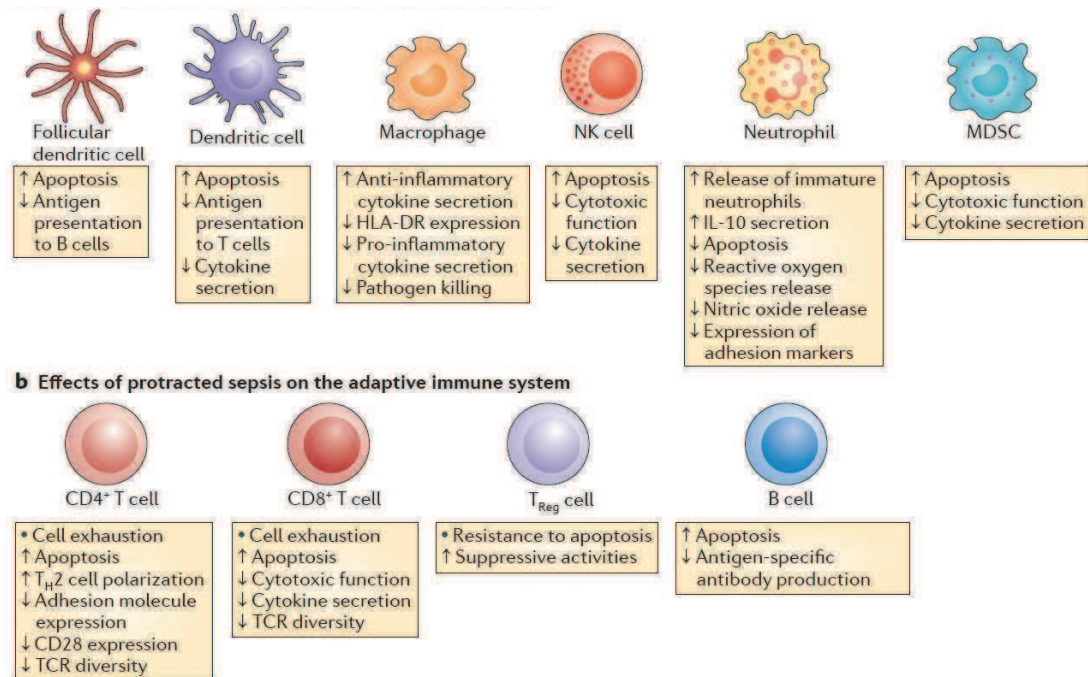


Figure 10 : Conséquence du sepsis sur l'immunité innée et adaptative (15)

a) Système immunitaire inné

- Polynucléaires neutrophiles

Lors de la **phase précoce** du choc septique, le nombre de polynucléaires neutrophiles (PNN) circulants est augmenté avec une proportion importante de PNN immatures au niveau du sang circulant et leur survie est allongée (135). De plus, les réponses fonctionnelles telles que la phagocytose et le métabolisme oxydatif sont renforcées alors que le chimiotactisme est inhibé (136-138). En effet, il y a un défaut dans le recrutement des PNN caractérisé par une incapacité des neutrophiles à migrer vers le site de l'infection combiné à une séquestration inappropriée de ces cellules dans les organes tels que les poumons, le cœur, le foie ou les reins. A cause d'une hyperactivation de ces PNN, d'une augmentation de leur capacité à produire des espèces réactives de l'oxygène et de leur fonction phagocytaire, ils vont créer un environnement nocif pour les organes voisins. Cette accumulation de neutrophiles dans les tissus participe alors aux dysfonctions d'organes observées dans la physiopathologie des états septiques sévères (139).

Des données récentes de la littérature décrivent également un nouveau rôle immunosuppresseur pour les PNN suggérant non seulement un nouvel aspect de leur implication dans la réponse immunitaire mais également dans la physiopathologie du choc septique (5-7, 140).

Cette partie sera détaillée par la suite.

- Monocytes

Au cours du sepsis, deux fonctions fondamentales sont principalement touchées : la **réponse à l'endotoxine** (phénomène de tolérance à l'endotoxine) et aux produits microbiens, et la **présentation de l'antigène** grâce à l'expression des molécules du CMH de classe II (HLA-DR) (15, 129).

En effet, les monocytes des patients septiques sécrètent moins de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12) alors que la production de médiateurs anti-inflammatoires comme l'IL-10 ou l'IL-1RA est inchangée, voire augmentée (125). Le LPS peut ainsi toujours activer les monocytes mais la signalisation intracellulaire s'oriente alors vers un profil anti-inflammatoire. Des études cliniques soulignent que l'ampleur et la persistance de cet état réfractaire sont associées avec une augmentation des infections nosocomiales et de la mortalité (141). Deux conséquences majeures de la tolérance à l'endotoxine observée pour les monocytes sont l'importante libération de molécules immunosuppressives (IL-10) et la diminution de la présentation de l'antigène, suite à une baisse d'expression de HLA-DR. La production continue d'IL-10 contribue à amplifier l'immunosuppression et pourrait ainsi favoriser la survenue d'infections secondaires. Effectivement, en bloquant l'IL-10, on inverse ce phénomène de tolérance *ex vivo* et de ce fait, l'immunosuppression induite par le sepsis (142). De plus, la survie est augmentée dans ces modèles animaux de sepsis (143).

La **diminution d'expression du HLA-DR** à la surface des monocytes est un biomarqueur très étudié (129). Les molécules du complexe HLA-DR font partie du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II et participent à la présentation de l'antigène aux lymphocytes, étape clé du déclenchement de la réponse immunitaire spécifique. La diminution de leur expression est donc un reflet direct d'une perte de fonctionnalité. De plus, il a été montré que la perte de mHLA-DR est également associée à l'incapacité des monocytes à produire des cytokines inflammatoires. Surtout, la diminution du mHLA-DR est associée à un risque accru de développer une infection nosocomiale ou de décéder (128). Ainsi, la mesure de l'expression du mHLA-DR est un bon marqueur prédictif de la sévérité des patients et pourrait permettre leur stratification avant la mise en place d'un traitement immunostimulant (129).

- Altérations des 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 faire partie des cellules résidant 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 (144, 145). Néanmoins Weber *et al.* ont observé une augmentation du nombre de pDC dès les premiers jours suivant le diagnostic du syndrome septique (146). Néanmoins, 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 (147, 148). Poehlman *et al.* ont également montré que leur capacité à produire des cytokines est aussi affectée. Lors de la stimulation *ex-vivo* de cellules dendritiques ils ont observé une diminution de la production des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , TNF α , et IL-6 et une augmentation de la production de l'IL-10, cytokine anti-inflammatoire (148). 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 (149). Ainsi, les modifications fonctionnelles et phénotypiques des cellules dendritiques, similaires à celles des monocytes, correspondent en partie à une diminution de leurs capacités à stimuler les lymphocytes T. Elles participeraient donc à l'établissement de l'immunodépression.

- Dysfonctions des NK

Les cellules NK (*Natural Killer*) sont des lymphocytes appartenant à la réponse immunitaire innée, principalement localisées dans les tissus. Elles présentent des propriétés cytotoxiques qui leur permettent d'éliminer des cellules infectées ou des cellules tumorales. De plus elles sont capable 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, associé à une augmentation de la mortalité (150, 151). On observe aussi une altération de leur capacité à produire des cytokines en réponse à une stimulation *ex-vivo* (150). 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 (150).

b) Système immunitaire adaptatif

D'importantes altérations du système immunitaire adaptatif apparaissent lors de l'immunosuppression : notamment **l'anergie des lymphocytes T**. Ces perturbations altèrent l'élimination des infections primaires et potentialisent l'occurrence d'infections nosocomiales secondaires. A ce jour, les altérations lymphocytaires telles que l'induction de l'apoptose, l'augmentation du pourcentage de lymphocytes T régulateurs (Treg), et les altérations phénotypiques (molécules de costimulation et co-inhibition) et fonctionnelles ont été relativement bien décrites dans des modèles animaux et en clinique. L'intensité et la durée de ces altérations sont associées au risque d'infection nosocomiale secondaire et de mortalité (129).

Ceci est illustré dans la **Figure 11**.

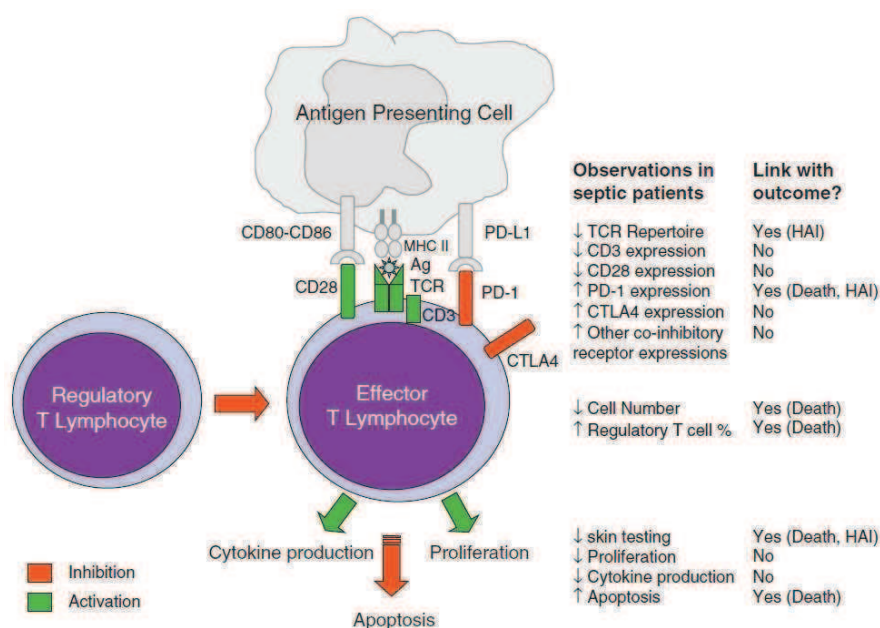


Figure 11 : Altérations des lymphocytes T au cours du sepsis et association avec l'outcome clinique (129)

• Lymphopénie

Les patients septiques présentent une **lymphopénie sévère** due en partie aux processus apoptotiques comme expliqué précédemment (152). Comme le montrent Le Tulzo *et al.*, cette induction de l'apoptose des lymphocytes circulants chez les patients en choc septique (comparés à des patients graves de réanimation), est à l'origine d'une lymphopénie sévère et persistante associée

à une mortalité accrue (153). Ainsi, le degré d'apoptose, la durée et l'étendue de la lymphopénie sont corrélés avec la sévérité du choc septique et également à la survenue d'infection nosocomiale (129). En conséquence, la mesure de l'apoptose pourrait être considérée comme un marqueur pronostique et aider à la stratification des patients septiques.

De plus, l'importante contribution de l'apoptose lymphocytaire dans les désordres immunitaires des patients en choc septique conduisent à de nouvelles approches thérapeutiques. Plusieurs voies ont été évoquées comme la surexpression de *B cell lymphoma 2* (Bcl-2) ou encore l'inhibition des caspases (128). Néanmoins, même si elles montrent des résultats prometteurs dans des modèles murins, leur utilisation en clinique semble plus problématique.

La diversité du **répertoire T** joue également un rôle important dans la capacité de l'hôte à produire une réponse immunitaire anti-infectieuse suffisante. Ainsi, une diversité optimale du TCR permet une protection efficace contre les pathogènes. En effet, l'organisme n'étant pas capable de prédire la variété des antigènes qu'il pourra rencontrer, le système immunitaire s'appuie sur la mise en place et le maintien de la diversité du répertoire du TCR. Une diminution de cette diversité a été retrouvée par Venet *et al.* dans une cohorte de patients en choc septique, très précocement après le début du choc et qui persiste au moins jusqu'au 7^e jour (avec néanmoins une diversification entre ces deux temps de prélèvement). Cette altération du répertoire est associée à un taux élevé de mortalité et au développement d'infections nosocomiales (154).

- Lymphocytes T régulateurs

Une **augmentation du pourcentage des Treg** circulants est décrite chez les patients en choc septique. Elle est observée immédiatement après le début du choc et persiste uniquement chez les patients non-survivants (155). Une association entre le pourcentage de Treg et la survenue d'infections nosocomiales est également retrouvée (156). De plus, Venet *et al.* ont montré que cette augmentation relative serait plutôt due à une baisse du nombre de lymphocytes T effecteurs plutôt qu'à un nombre absolu de Treg plus élevé (157). Les Treg sont donc peut-être plus résistants à l'apoptose induite par le sepsis, grâce à une expression plus importante de la protéine anti-apoptotique Bcl-2.

Par ailleurs, des études récentes soulignent l'association entre l'augmentation du pourcentage de Treg et la diminution de la prolifération des lymphocytes T et donc une inhibition de leur fonction (158). Ils peuvent également avoir une action sur l'immunité innée en inhibant les fonctions des monocytes (159) et neutrophiles (160, 161) dans un contexte de stimulation au LPS.

- Altérations phénotypiques

L'activation complète des lymphocytes T dépend de la reconnaissance des molécules de costimulation se trouvant sur les CPA. Les costimulateurs les mieux définis sont le CD80 (B7-1) et le CD86 (B7-2), présents sur les CPA et dont l'expression est fortement augmentée lorsque celles-ci rencontrent des pathogènes. Ces protéines B7 sont reconnues par un récepteur à la surface du lymphocyte T, le CD28. La signalisation assurée par CD28 et B7 est essentielle pour déclencher les réponses des T naïfs. Des protéines homologues de CD28 sont également nécessaires pour limiter et mettre fin aux réponses immunitaires. Les prototypes des récepteurs inhibiteurs sont CTLA-4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*), qui comme CD28, reconnaît B7 sur les APC, et PD-1 (*Programmed cell death 1*), qui reconnaît des ligands différents mais apparentés sur de nombreux types cellulaires.

En parallèle de la diminution de l'expression du HLA-DR à la surface des monocytes, une diminution des molécules de costimulation (CD28) associée à une augmentation de l'expression de CTLA-4 ont été observées chez les patients en sepsis sévère (162). De plus, Guignant *et al.* ont montré une augmentation de l'expression de PD-1 à la surface des lymphocytes T CD4+ et une expression augmentée de PD-1 et de ses ligands au niveau monocyttaire. D'autre part, cette augmentation d'expression du système PD-1 est associée aux concentrations plasmatiques d'IL-10 et inversement corrélée aux capacités prolifératives des cellules des patients septiques (163). De plus, une étude récente de Pan *et al.* considère PD-1 comme un biomarqueur précoce en reflétant non seulement la réponse immunitaire mais aussi la sévérité et le pronostic du choc septique chez des patients. Ils ont également souligné l'implication de la voie de signalisation Notch dans la régulation d'expression de PD-1 (164).

L'absence de molécules de costimulation lors de la présentation de l'antigène et l'induction de protéines inhibitrices participent à l'établissement de l'état d'anergie observé lors du sepsis.

- Anergie lymphocytaire

L'anergie lymphocytaire est illustrée par une perte de la réaction d'hypersensibilité retardée lors d'une stimulation par des antigènes cutanés (*e.g.* tuberculine), qui est associée avec un risque accru de mortalité et de développement d'infections secondaires (165). En effet, la durée prolongée de l'état septique, caractérisé par une charge antigénique élevée et des concentrations en cytokines pro et anti-inflammatoires importantes, constitue un cadre idéal pour le développement de l'anergie lymphocytaire. Une étude de Boomer *et al.* à partir de rates de patients décédés, apporte plusieurs

éléments qui participent à la mise en place de cet état d'anergie : importante inhibition de la synthèse d'IFN- γ et de TNF- α par les lymphocytes T stimulés, augmentation de l'expression de PD-1 à la surface des cellules CD4+ et PDL1 (ligand de PD-1) sur les macrophages (166).

Ainsi, une altération de la prolifération lymphocytaire est observée chez les patients après un traumatisme important (chirurgie majeure, brûlures, polytraumatisme ou choc septique). Cette diminution est associée à une production moindre de cytokines telles que l'IL-2 ou l'IFN- γ par les cellules mononuclées du sang périphérique (128). De plus, le défaut de prolifération lymphocytaire et de sécrétion d'IL-2 et d'IFN- γ est corrélé à une augmentation de la mortalité des patients septiques (162, 166).

La réponse inflammatoire (pro- et anti-) est résumée dans le **Figure 12**.

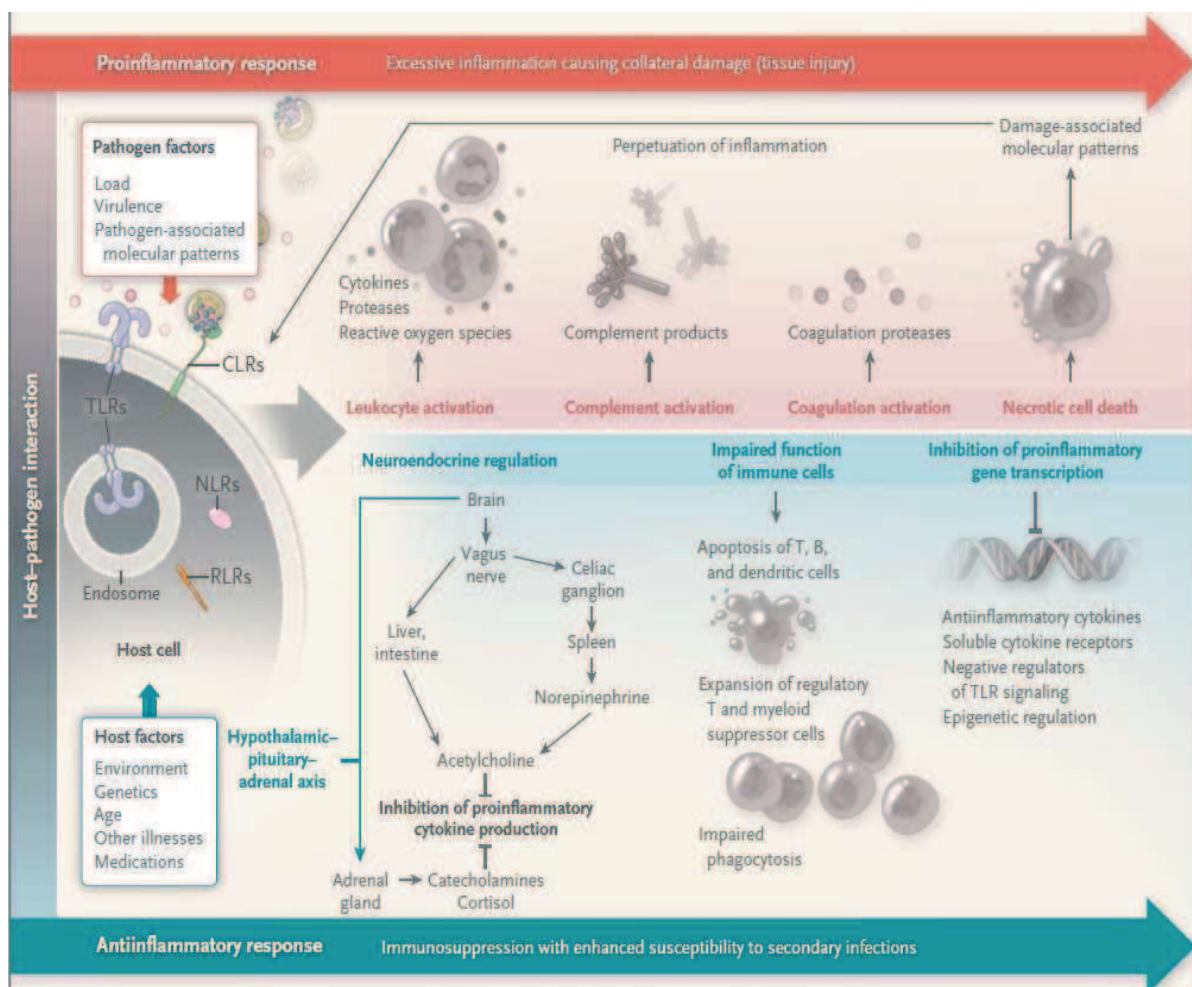


Figure 12 : La réponse de l'hôte au cours du sepsis sévère (3)

III. CHRONOLOGIE DES REPONSES PRO ET ANTI-INFLAMMATOIRES ET CONSEQUENCES CLINIQUES

La réponse immunologique au cours du temps est illustrée dans la **Figure 13** (167).

Alors que les réponses pro et anti-inflammatoires se mettent en place rapidement après le début du sepsis, la phase initiale hyper-inflammatoire est prédominante. Son ampleur dépend de différents facteurs tels que la virulence du pathogène, la charge bactérienne, les facteurs génétiques de l'hôte, son âge, ses comorbidités et son statut nutritionnel. Si le patient meurt dans les premiers jours suivant le choc, le décès pourra être probablement dû à l'état d'hyper-inflammation et à l'orage cytokinique conduisant à une défaillance multiple d'organes (notamment collapsus cardiovasculaire et défaillances d'organe) (**Figure 13 A**).

Cependant, plus de 70% des patients décèdent après les 3 premiers jours avec le développement d'infections nosocomiales secondaires et de réactivations virales ou fongiques (167) (**Figure 13 B**). Chez certains patients, une absence de clairance bactérienne est également observée. Ceci explique, au moins en partie, l'échec des thérapies anti-inflammatoires dans le choc septique.

Ces considérations ouvrent la voie sur de nouvelles pistes thérapeutiques. Cependant, ces thérapies ne seront proposées qu'aux patients présentant un terrain d'immunodépression favorisant ces décès tardifs.

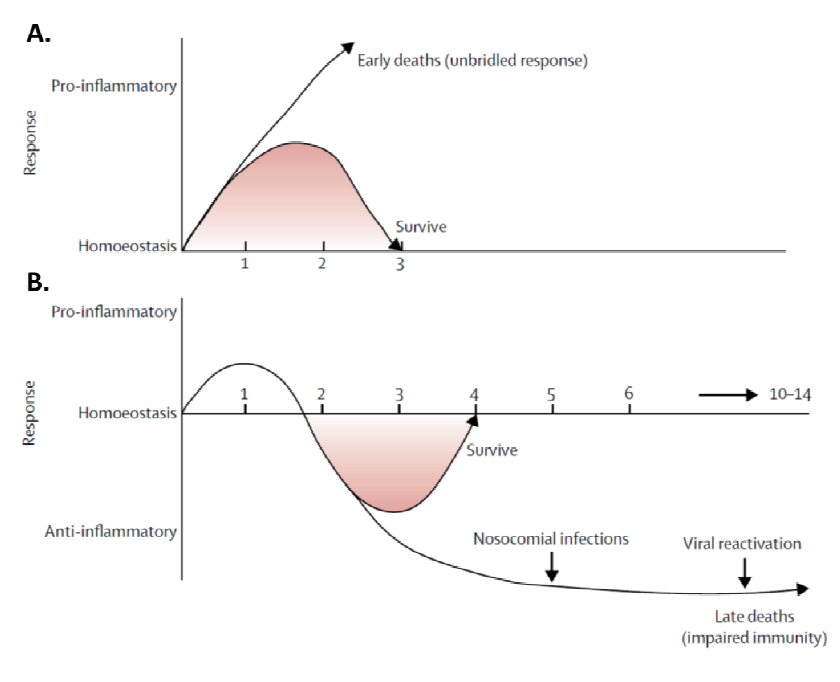


Figure 13 : Profils des réponses immunologiques lors du sepsis au cours du temps (167)

A : Pour les décès en phase précoce – B : Pour les décès en phase tardive.

IV. PERSPECTIVES THERAPEUTIQUES EN LIEN AVEC L'IMMUNOSUPPRESSION

Les patients qui normalisent progressivement leurs fonctions immunitaires vont évoluer favorablement et rester indemnes d'infection nosocomiale. A l'inverse, les patients dont les dysfonctionnements immunitaires persistent au cours du temps auront tendance à développer plus d'infections secondaires et seront à risque élevé de décès. Ce groupe représente plus de 50% des patients ayant présenté un choc septique, et compte pour 65% de la mortalité totale. La prise en compte de cette immunodépression et de son éventuel traitement est donc devenue un réel enjeu thérapeutique. Les **thérapies immunostimulantes** sont maintenant considérées dans les syndromes septiques comme traitement adjuvant potentiel et les premiers essais cliniques donnent des résultats prometteurs. Différentes stratégies sont représentées dans la **Figure 14** (15).

Nous détaillerons plus particulièrement l'IFN- γ , le GM-CSF (*Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor*) et l'IL-7.

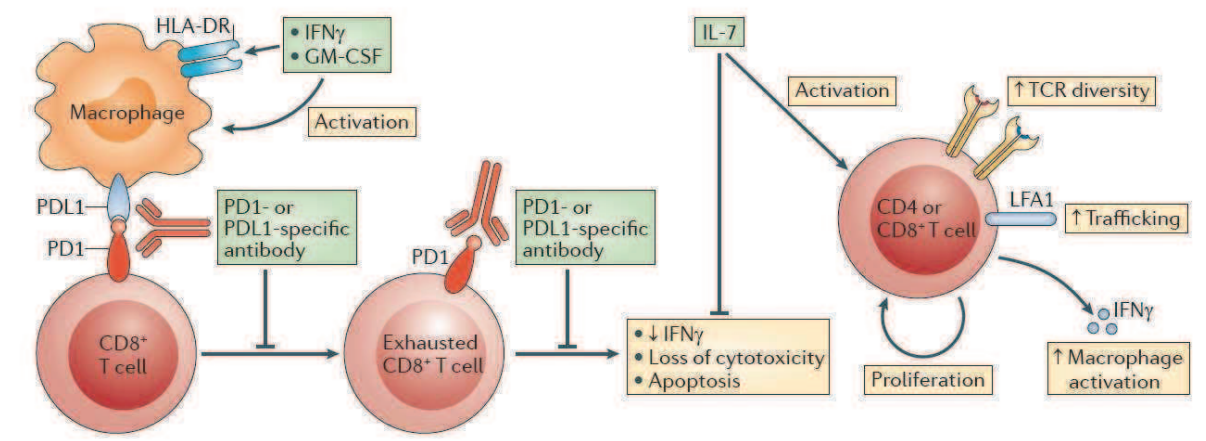


Figure 14 : Thérapies immunostimulantes du sepsis (15)

IFN- γ : Interféron- γ , PD1 : Programmed-Death 1, PDL1 : Programmed-Death Ligand 1, GM-CSF : Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor

a) IFN- γ

L'IFN- γ , principalement produit par les lymphocytes T et les cellules NK, joue un rôle majeur dans l'activation de nombreuses fonctions monocytaires essentielles à l'élimination des agents infectieux. Lors du sepsis, on observe une importante déplétion d'IFN- γ . Ainsi, des études cliniques ont utilisé de l'IFN- γ recombinant dans des cohortes septiques. Ce traitement a permis de restaurer les propriétés des monocytes des patients, notamment pour les cellules avec une expression diminuée de HLA-DR et une chute du TNF- α en réponse au LPS. Dans une étude de Docke *et al.*, l'IFN- γ a été administré à neuf patients atteints de sepsis et présentant une diminution d'expression

monocytaire de HLA-DR (< 30 % deux jours de suite). Cette molécule a été bien tolérée et a conduit à une augmentation de l'expression monocytaire de HLA-DR chez tous les patients, ainsi qu'à une restauration de leur capacité à produire du TNF- α après stimulation par le LPS (168). D'autres voies d'administration ont été abordées, comme l'inhalation, par Nakos *et al.*, dans une cohorte de patients immunodéprimés (immunodépression objectivée par une expression du HLA-DR monocytaire < 30%). Sans avoir d'effet direct sur la survenue d'événements indésirables, l'administration d'IFN- γ par inhalation a permis de diminuer l'incidence des pneumonies associées à la ventilation (169).

L'IFN- γ a également montré des résultats prometteurs dans d'autres contextes tels que les infections fongiques invasives à *Candida* ou *Aspergillus*, responsables d'infections sévères et associées à des taux de mortalité importants. L'administration d'IFN- γ a ici permis une restauration immunitaire illustrée par une augmentation de l'expression du HLA-DR et de la production de cytokines importantes dans la défense antifongique (IL-1 β , TNF- α , IL-17, IL-22) (170).

Actuellement, l'IFN- γ fait l'objet d'un essai clinique aux Pays-Bas chez des patients entrant dans la phase d'immunosuppression (clinicaltrials.gov number : NCT01649921). Les biomarqueurs témoignant de ce statut immun sont la mesure de l'expression du HLA-DR sur les monocytes, l'expression de PD-1 et la mesure de l'IL-6 plasmatique.

b) GM-CSF

Le **GM-CSF** est un facteur de croissance hématopoïétique qui accroît les défenses antimicrobiennes par augmentation de la survie, de la prolifération, de la différenciation et de la phagocytose des polynucléaires neutrophiles et des monocytes/macrophages. Compte tenu des nombreuses altérations fonctionnelles des monocytes et des neutrophiles observées chez les patients septiques, le GM-CSF a fait l'objet d'essais cliniques. Dans une étude multicentrique, randomisée, en double aveugle et contrôlée par placebo chez 38 patients atteints de sepsis sévère ou de choc septique, Meisel *et al.* ont investigué la phase d'immunosuppression grâce à l'expression du mHLA-DR. L'administration de GM-CSF a permis une restauration de l'expression du HLA-DR, une diminution de la période de ventilation mais aussi de la durée du séjour en service de réanimation (171). Le GM-CSF présente également un potentiel chez les enfants comme le montrent Hall *et al.* dans une cohorte pédiatrique. Ici, l'immunosuppression était monitorée grâce à la capacité de production de TNF- α *ex vivo* des cellules stimulées avec du LPS (les patients avec une réponse TNF- α inférieure à 200 pg/ml étaient traités avec du GM-CSF). Dans cette étude, le GM-CSF était capable de restaurer la production de TNF- α et de diminuer la survenue d'infections nosocomiales (172).

D'autres essais cliniques utilisant le GM-CSF avec des cohortes plus importantes sont en projet et les résultats de ces études sont nécessaires pour évaluer l'impact d'un traitement par GM-CSF sur la survie des patients et la survenue d'infections nosocomiales (173).

c) IL-7

En considérant les altérations lymphocytaires observées chez les patients septiques, l'**IL-7** est récemment apparue comme une molécule de choix dans le traitement des états septiques sévères. En effet, l'IL-7 est une cytokine indispensable pour la survie, l'homéostasie, le développement et la prolifération des lymphocytes. Ses effets sont médiés via le récepteur hétérodimérique IL-7R, composé d'une chaîne α (CD127) et d'une chaîne commune à d'autres récepteurs de cytokines (γ c ou CD132). L'IL-7 induit la synthèse de facteurs anti-apoptotiques (Bcl-2), et d'autre part, inhibe l'apoptose par suppression de l'activité de protéines pro-apoptotiques. Elle est aussi impliquée dans la régulation de la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ en réponse à une lymphopénie et favorise la diversité du répertoire du TCR (*T cell receptor*). Son administration restaure la production de cytokines, diminue l'expression des molécules de co-régulation inhibitrices (PD-1) et diminue le pourcentage des Treg circulants (174).

Dans les essais cliniques, l'IL-7 a été utilisée dans le traitement des patients présentant des lymphopénies idiopathiques ou des pathologies induites par une lymphopénie sévère (patients infectés par le VIH). Les premiers résultats sont prometteurs. L'IL-7 induit une augmentation rapide et stable plusieurs mois des cellules T, une augmentation de la diversité du répertoire et une diminution du pourcentage de Treg circulants (175). Néanmoins, à ce jour, aucun essai n'a été mené en clinique humaine dans l'indication du sepsis. Pourtant, deux approches expérimentales renforcent l'idée que l'IL-7 pourrait être utile chez les patients septiques présentant de sévères altérations lymphocytaires. Premièrement, dans les modèles animaux de choc septique reproduisant la situation clinique (modèle de péritonite induisant une immunodépression favorisant les infections secondaires), l'IL-7 prévient la mortalité et les infections secondaires fongiques ou bactériennes, améliore la survie des lymphocytes ainsi que leur chimiotactisme, restaure la production d'IFN- γ et la réactivité aux tests cutanés (176, 177). Deuxièmement, *ex vivo*, l'IL-7 restaure la fonctionnalité des lymphocytes de patients septiques. Dans un travail récent mené par Venet *et al.*, il a été montré que l'administration d'IL-7 améliorerait toutes les anomalies induites par le choc septique : prolifération lymphocytaire (des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺), production d'IFN- γ , phosphorylation de STAT5, induction de Bcl-2 après stimulation du TCR (*via* des anticorps anti-CD3/CD2/CD28). L'IL-7 permettait un retour à des valeurs observées chez des sujets sains (178). Ces résultats montrent que la voie de

l'IL-7 (récepteur/signal intracellulaire) reste mobilisable après un choc septique.

Il est raisonnable de penser que l'IL-7 représente une réelle alternative thérapeutique en agissant sur les nombreuses facettes des altérations lymphocytaires induites par le choc septique. De plus, considérant le rôle clé des lymphocytes T CD4+ dans l'orchestration de la réponse immunitaire, l'hypothèse d'une stimulation de l'immunité innée (179) et, plus particulièrement, de l'augmentation de l'expression monocyttaire de HLA-DR *via* la production d'IFN- γ , est également fondée. Elle reste néanmoins à être établie.

Un essai clinique est actuellement en cours afin de tester l'effet de l'IL-7 sur la restauration lymphocytaire chez des patients en choc septique (NCT02640807). Il inclut notamment des patients présentant un score SOFA supérieure à 2 et un compte absolu de lymphocytes inférieur à 900 cellules/mm³.

d) Autres molécules

Une autre approche à fort potentiel dans l'immunosuppression du sepsis implique le blocage des **molécules de co-inhibition PD-1 et PDL1**. Comme décrit précédemment, PD-1 et PDL1 sont largement exprimés sur les cellules immunitaires effectrices, les cellules endothéliales et les cellules épithéliales bronchiques chez les patients septiques (166). Bloquer la voie de signalisation PD-1/PDL1 améliore d'ailleurs la survie dans des modèles de sepsis bactérien (180, 181) et diminue significativement la mortalité lors de sepsis fongique causé par *Candida albicans* (182). Ainsi, PD-1 exprimé par les lymphocytes et PDL1 à la surface des monocytes pourraient être considérés comme des biomarqueurs potentiels pour la sélection des patients en sepsis candidats à l'immunothérapie. Une étude récente a montré que le blocage *in vitro* de PD-1 améliorait également la production d'IFN- γ et diminuait l'apoptose des lymphocytes T chez des patients présentant une infection active à *Mycobacterium tuberculosis* (183). Par conséquent, à partir de ces résultats expérimentaux chez l'homme et l'animal, une thérapie anti-PD-1 dans le sepsis semble être une perspective intéressante qui stimulera les fonctions phagocytaires des monocytes/macrophages ainsi que les lymphocytes T. Une étude clinique testant l'intérêt de PDL1 comme thérapeutique du sepsis est actuellement en cours aux Etats-Unis (Angus DC).

La **thymosine α 1** est actuellement testée dans des essais cliniques pour le traitement des hépatites C et B (chronique) et le cancer (184-186). De plus, elle aurait des indications dans les déficits immunitaires primitifs et le VIH (187). Plus récemment, la thymosine a également fait l'objet d'une étude clinique avec des patients septiques. Même si les mécanismes d'action de ce peptide ne sont pas encore complètement définis, la thymosine posséderait une action immunomodulatrice sur

les cellules du système immunitaire inné, notamment sur les capacités phagocytaires des macrophages. Elle est aussi capable d'induire la maturation des lymphocytes T et cellules dendritiques et d'augmenter l'expression de l'IL-12 (188, 189). L'administration précoce de thymosine α 1 dans le traitement du sepsis (essai clinique randomisé) a montré une réduction de la mortalité à 28 jours (26% versus 36% dans le groupe contrôle) associée à une augmentation du HLA-DR monocytaire (190).

e) Conclusion

Etant donné l'hétérogénéité des cohortes septiques, les futures thérapies immunostimulantes pourraient être personnalisées sur la base de critères cliniques ou **guidées par l'utilisation de biomarqueurs**. Par exemple, utiliser le GM-CSF en se basant sur l'expression du HLA-DR à la surface des monocytes (171). C'est le cas d'un essai en cours en France utilisant les GM-CSF chez des patients en choc septique présentant un HLA-DR monocytaire inférieur à 8 000 sites (NCT02361528). De même, une étude récente réalisée par notre équipe a mis en évidence l'intérêt du CD127 soluble (sCD127), la forme soluble du récepteur à l'IL-7 (plus particulièrement le récepteur α), pour identifier un groupe de patients avec un plus grand risque de mortalité. L'association entre la mesure du sCD127 et les altérations lymphocytaires permettra d'imaginer l'utilisation de ce biomarqueur pour stratifier les patients dans de prochains essais cliniques, notamment pour tester l'IL-7 (Demaret *et al.* ICM 2014, *in press*).

Il est donc nécessaire de mieux comprendre la réponse immunitaire de l'hôte à un choc septique afin de proposer des thérapeutiques individualisées et adaptées (167). Il faut pour cela étudier les différents acteurs de l'immunité innée et adaptative. A ce jour, de nombreuses études portent sur les altérations monocytaires telle que la diminution de l'expression de HLA-DR. Cette diminution d'expression mesurée en cytométrie en flux apparaît en effet comme un marqueur fiable de l'immunosuppression chez les patients en état critique (129). Des altérations lymphocytaires sont aussi associées à la mortalité ou à la survenue d'infections nosocomiales chez ces patients (156, 158).

Cependant, peu d'éléments sont connus sur le rôle des polynucléaires neutrophiles dans la phase immunosuppressive du choc septique. Les études se sont surtout focalisées sur les altérations des PNN lors de la phase précoce pro-inflammatoire du choc. Mais des travaux récents leur conférant des propriétés immunosuppressives apportent une nouvelle lumière sur l'implication potentielle des neutrophiles dans la phase anti-inflammatoire du choc (5-7, 140).

4. LES POLYNUCLEAIRES NEUTROPHILES

I. RAPPELS PHYSIOLOGIQUES

Les granulocytes tirent leur nom de leurs granules cytoplasmiques fortement colorés ; ils sont aussi appelés leucocytes polymorphonucléaires à cause de la forme particulière de leur noyau. Les polynucléaires neutrophiles (PNN) représentent la population prédominante (**60 à 75% des globules blancs totaux**) parmi les cellules immunitaires du sang circulant (4). Ils se développent dans la moelle osseuse à partir de cellules souches hématopoïétiques lors de la **granulopoïèse** (191). Les PNN matures sont caractérisés par un **noyau plurilobé** et la présence de **nombreux granules cytoplasmiques** contenant plus de 700 protéines. Comparés aux macrophages, ils ont une durée de vie relativement courte, survivant quelques jours (192). A noter que cette étude de Pillay *et al.* mettant en évidence une durée de vie de 5.4 jours pour les neutrophiles humains a été critiquée notamment pour son approche méthodologique. En effet, l'utilisation d'eau lourde ingérée par des volontaires sains permettrait de marquer également les PNN de la moelle osseuse, surestimant ainsi leur durée de vie dans le sang (193, 194). Néanmoins, lors d'une inflammation, les neutrophiles sont activés et leur durée de vie augmente, assurant une présence constante de PNN au niveau du site inflammatoire. Ceci est le résultat de l'action de nombreuses cytokines, facteurs de croissance et produits bactériens (195, 196). Une durée de vie plus longue permet aux PNN d'effectuer des tâches plus complexes dans le tissu, comme participer à la résolution de l'inflammation ou stimuler la réponse immunitaire adaptative mais leur persistance peut également être à l'origine de dommages passifs.

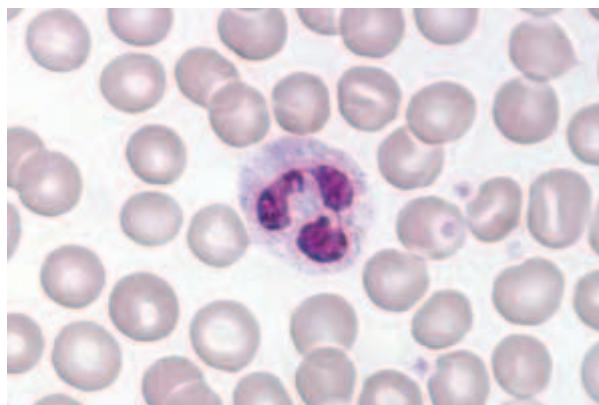


Figure 15 : Frottis de sang humain normal mettant en avant un polynucléaire neutrophile

Les neutrophiles sont produits en nombre croissant lors d'une réponse immunitaire et migrent du sang dans les foyers infectieux ou inflammatoires. Les PNN issus de la moelle osseuse se divisent en trois compartiments (197) :

- Les cellules souches composées de cellules souches hématopoïétiques et de progéniteurs pluripotents
- Le pool « mitotique » contenant les cellules en cours de différenciation (myéloblastes, promyélocytes, myélocytes)
- Le pool « post-mitotique » avec les métamyélocytes, les band cells et les neutrophiles matures.

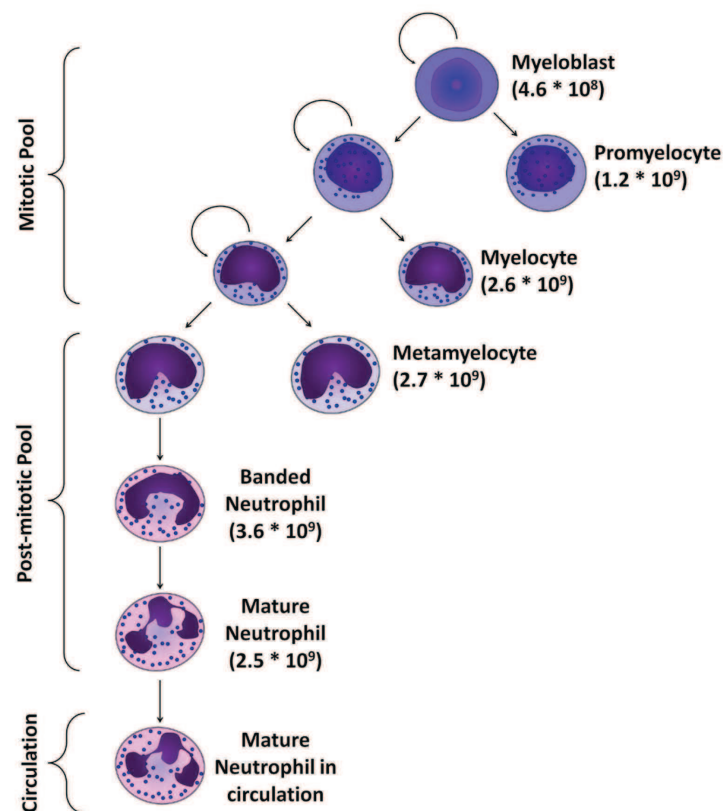


Figure 16 : Production de la lignée des neutrophiles dans la moelle osseuse (198)

Cette dernière partie représente 95% des neutrophiles du système immunitaire et cette réserve est facilement mobilisée et recrutée rapidement sur les sites infectieux. Environ 50% des PNN sanguins circulent dans les vaisseaux (= **pool circulant**) et 50% sont collés aux parois (= **pool marginé**) : il y a un équilibre permanent entre ces 2 compartiments. Ainsi, dans des conditions

physiologiques, les neutrophiles peuvent être retrouvés dans la moelle osseuse, la rate, le foie et les poumons (195).

Les PNN sont indispensables à la défense contre les microorganismes. Grâce à leur rôle de **sentinelle**, ils constituent la première ligne d'action du système immunitaire inné (4). Les neutrophiles sont les plus nombreux et les plus importants acteurs de la réponse immunitaire innée : ils ingèrent divers microorganismes par phagocytose et les détruisent dans des vésicules intracellulaires au moyen d'enzymes lytiques et d'autres substances antimicrobiennes concentrées dans leurs granules cytoplasmiques (199). Des déficiences héréditaires dans la fonction des neutrophiles conduisent à de graves infections bactériennes, fatales si elles ne sont pas traitées (200, 201).

II. ADHESION ET MIGRATION

Si les microorganismes parviennent à passer les barrières physiques telles que la peau ou les muqueuses, ils accèdent aux tissus et activent les cellules endothéliales qui vont alors attirer les neutrophiles circulants. La migration des PNN vers le site de l'infection est une étape importante dans le contrôle de l'infection (202).

Les trois étapes traditionnelles nécessaires à l'activation et la transmigration des neutrophiles à travers les vaisseaux sanguins ont récemment été redéfinies. En effet, le **roulement sur la paroi endothéliale**, l'**activation** et l'**adhésion ferme** des PNN ont été analysés et affinés par les experts. Un roulement plus lent, une adhésion plus ferme, une reptation intraluminale liée à une migration intra- et para-cellulaire sont désormais reconnus comme des phases distinctes, additionnelles (202).

a) Le roulement

Le roulement des neutrophiles est médié principalement par les **sélectines** qui interagissent avec PSGL1 (*P-Selectin glycoprotein ligand 1*) et d'autres ligands glycosylés exprimés par les PNN. La **L-sélectine (CD62L)** est exprimée par la plupart des leucocytes, y compris les PNN. En revanche, on retrouve la E-sélectine (CD62E) et la P-sélectine (CD62-P) à la surface des cellules endothéliales activées. Les neutrophiles sont fixés à l'endothélium, puis le flux sanguin brise cette liaison, qui va se reformer en aval, et ainsi de suite, ce qui entraîne un roulement des leucocytes sur la surface endothéliale. L'interaction entre PSGL1 et la P-sélectine va permettre la capture et le roulement des neutrophiles à la surface des cellules endothéliales et des plaquettes (les plaquettes activées

expriment également la P-sélectine). De manière complémentaire, la liaison entre PSGL1 et la L-sélectine, donc entre deux neutrophiles, va médier l'adhérence de nouveaux neutrophiles sur le site inflammatoire/infectieux et ainsi améliorer le recrutement des PNN à ce niveau (202, 203). L'interaction entre PSGL1 et la L-sélectine est également à l'origine de l'activation d'une variété de kinases, dont la famille des Src (« *Sarcoma* »), phosphoinositide 3-kinase (PI3K) et p38 mitogen-activated protein kinase (202, 204). Cette cascade initie de nombreux changements dans la biologie du neutrophile et prépare la voie pour l'activation des intégrines et l'adhésion ferme.

b) L'adhésion ferme

Les **intégrines** participent également au roulement des neutrophiles. Les plus pertinentes font partie des sous-familles des intégrines $\beta 1$: VLA4 (*very late antigen 4*) et $\beta 2$: LFA1 (*lymphocyte function-associated antigen 1*). Ces molécules présentent une haute affinité pour les molécules d'adhésion présentes à la surface de l'endothélium (interactions **VLA4-VCAM1** (*vascular cell-adhesion molecule 1*) et **LFA1-ICAM1** (*inter-cellular cell adhesion molecule 1*)), permettant une adhésion ferme à la paroi du vaisseau sanguin et ainsi une interruption du roulement en préparation de la migration transendothéliale (202). Les intégrines constituent des récepteurs « activables ». En effet, une signalisation intracellulaire via des molécules de surface est nécessaire pour augmenter leur capacité à se lier avec leur ligand. L'avidité de l'adhésion médiée par les intégrines dépend de l'affinité de celles-ci (changements conformationnels individuels des hétérodimères d'intégrines) et de la valence de la liaison avec leur ligand (densité des hétérodimères d'intégrines par rapport à la surface membranaire impliquée dans l'adhésion cellulaire) (205, 206). Ainsi, des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que l'arrêt des PNN pendant le roulement est médié par l'interaction entre des intégrines **activées** et des membres de la superfamille des immunoglobulines exprimées par les cellules endothéliales (VCAM1 et ICAM1).

c) L'activation

Les **chimiokines** et autres **chimioattractants** jouent un rôle important dans l'étape d'adhésion. En effet, au cours de l'inflammation, les cellules endothéliales sont activées par les cytokines inflammatoires (TNF- α , IL-1) pour exprimer des molécules d'adhésion et sécréter des chimiokines. Celles-ci sont les activateurs physiologiques les plus puissants des intégrines. En particulier, elles régulent rapidement l'avidité de ces dernières en agissant à la fois sur l'affinité et la valence (207, 208). Ceci est la conséquence de ce que l'on nomme la signalisation « de l'intérieur vers l'extérieur » (ou « **inside-out signalling** »). L'interleukine 8 (IL-8) est notamment un acteur essentiel pour la migration des neutrophiles dans de nombreux contextes inflammatoires chez l'homme et

l'animal. La réponse à l'IL-8 est médiée par l'interaction avec deux récepteurs de haute affinité : CXCR1 et CXCR2. Ces récepteurs ont différents ligands avec des affinités variables ; alors qu'ils interagissent avec l'IL-8 avec une affinité équivalente, CXCR2 fixe également d'autres chimiokines telles que GRO- α (CXCL1), GRO- β (CXCL2), et GRO- γ (CXCL3)(209).

Il est également admis qu'en plus d'assurer l'adhésion des PNN à la surface de l'endothélium, les intégrines sont capables de générer des signaux intracellulaires à l'origine de la régulation de différentes fonctions cellulaires, comme la mobilité, la prolifération et l'apoptose (202). Il s'agit ici de la signalisation « de l'extérieur vers l'intérieur » (ou « **outside-in signalling** »). Les voies de signalisation « de l'intérieur vers l'extérieur » et « de l'extérieur vers l'intérieur » peuvent être activées simultanément (210).

d) Migration transendothéliale

La transmigration à travers la membrane des vénules constitue l'étape finale du processus de migration des PNN dans les tissus inflammatoires. Elle peut se dérouler avec rupture minimale de la structure complexe des vaisseaux sanguins. En effet, avant de traverser les murs de vénules post-capillaires, les neutrophiles « rampent » (« **crawl** ») à la recherche de sites préférentiels de transmigration (211). Ceci se réalise notamment par l'intermédiaire de **MAC1** (CD11b – intégrine) et **ICAM1** (202). Les neutrophiles ont tendance à ramper perpendiculairement par rapport au flux sanguin, il s'agit de la plus courte distance entre le point d'adhérence du PNN jusque la jonction endothéliale. Pendant cette étape, ils doivent maintenir une constante adhésion avec la surface de l'endothélium. Ainsi, alors qu'ils se libèrent des liaisons existantes pour avancer, ils en forment simultanément de nouvelles sur d'autres parties de leur surface cellulaire pour sécuriser cette liaison permanente avec l'endothélium (212). Les leucocytes migrants doivent traverser plusieurs barrières distinctes dont les cellules endothéliales ainsi que leur membrane basale.

La migration à travers les cellules endothéliales se réalise rapidement (< 2-5 minutes) mais pénétrer la membrane basale peut prendre plus de temps (> 5-15 minutes) (202). La transmigration se déroule via des **voies transcellulaires** (à travers les cellules endothéliales) ou **paracellulaires** (entre les cellules endothéliales). *In vitro*, la transmigration paracellulaire a lieu préférentiellement au niveau de jonctions tricellulaires de l'endothélium, *i.e.* où il y a peu de protéines de jonction et les cellules endothéliales ne sont pas tout à fait alignées (213), mais ceci n'a pas été confirmée *in vivo*. La voie paracellulaire requiert la libération des liaisons protéiques intercellulaires jonctionnelles, comme celles formées par la VE (vascular endothelial)-cadherin. Les neutrophiles utilisent préférentiellement la voie paracellulaire (212) mais aussi la transmigration transcellulaire qui est

moins efficace et dure 20-30 minutes (214). Les cellules endothéliales forment alors un « dôme » autour du neutrophile grâce à des projections de type microvilli qui vont entourer le PNN. Ces projections sont enrichies en ICAM1 et VCAM1 et se fixent sur le neutrophile par l'intermédiaire de LFA1 et VLA4 (215). Ce processus reste différent de la phagocytose puisque le PNN n'entre à aucun moment dans le compartiment intracellulaire de la cellule endothéliale (212). Lors de la migration transcellulaire, les cellules endothéliales subissent des réarrangements de leur cytosquelette ainsi que dans leur attachement à la matrice extracellulaire. La membrane basale endothéliale est une structure continue composée de protéines de la matrice extracellulaire (collagènes, laminines). On pourrait donc facilement penser que les neutrophiles utilisent leur arsenal de protéases (Matrix Metalloproteinase – MMP, serine protéases comme la neutrophil elastase) qui possèdent une activité contre les protéines de la matrice, pour « couper » cette membrane. Néanmoins, l'ajout d'inhibiteur de protéase ne montre aucun effet sur la migration transcellulaire, peut-être à cause de la quantité trop importante des protéases présentes. Elles pourraient plutôt aider la migration des neutrophiles via une matrice extracellulaire moins poreuse (216). Par exemple, le CD177, un ligand atypique de PECAM-1 exprimé par les neutrophiles, se fixe sur PR3 (*neutrophil-derived proteinase 3*) et médie son transfert vers les jonctions endothéliales pour faciliter la transmigration des neutrophiles (217).

La **Figure 17** résume les différentes étapes de la migration des neutrophiles.

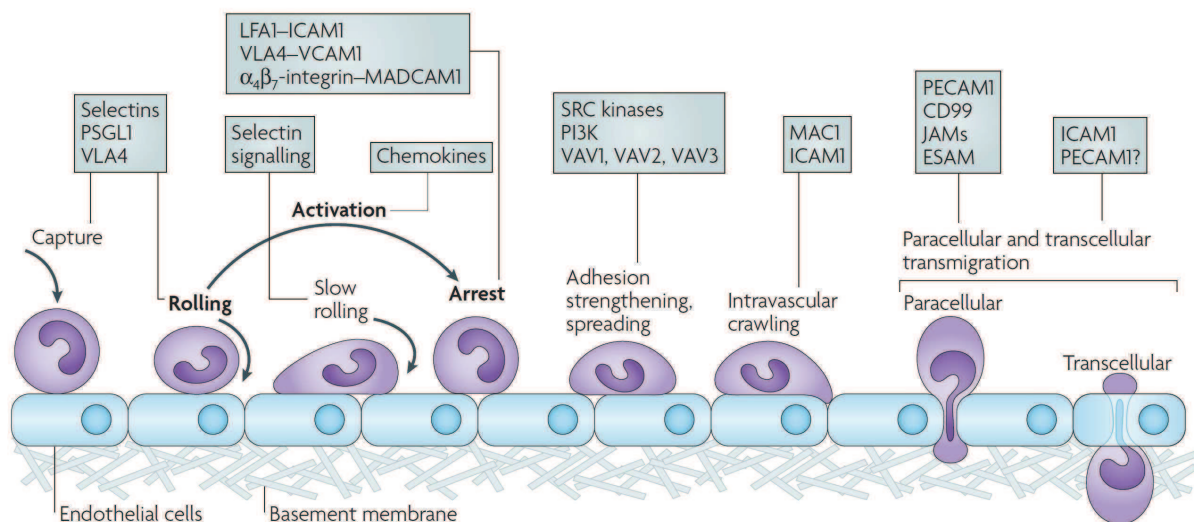


Figure 17 : Schématisation des différentes étapes de la migration des neutrophiles (202)

Un autre niveau de complexité est apporté par la **transmigration inverse** des neutrophiles, c'est-à-dire un flux à partir des organes périphériques vers un retour dans la circulation. Ceci a été observé pour la première fois dans un modèle de cellules endothéliales *in vitro* (218), puis chez la souris et le poisson-zèbre *in vivo* (219). L'étude chez la souris montre que la transmigration inverse se

produit lorsque la protéine d'adhésion jonctionnelle JAM-C est down-régulée dans les cellules endothéliales (220). De plus, il a été montré dans une autre étude chez l'homme, qu'une faible proportion (environ 1-2% des PNN circulants) de neutrophiles ayant subi une transmigration inverse, sont présents chez des patients avec une polyarthrite rhumatoïde. De plus, ces neutrophiles étaient sensiblement plus résistants à l'apoptose comparés aux neutrophiles extravasés (218).

La transmigration inverse pourrait constituer un moyen de protection des PNN qui ne sont pas nécessaires pour combattre l'infection. Néanmoins, il est également possible que regagner la circulation sanguine serait un moyen de mieux disséminer l'inflammation dans les autres organes et conduire ainsi à une inflammation chronique/systémique (212).

III. ELIMINATION DES PATHOGENES

Une fois que les PNN ont reconnu leur cible, ils disposent d'un arsenal bactéricide considérable tel que la phagocytose, le métabolisme oxydatif ou encore la NETose (NET : *Neutrophil Extracellular Trap*).

a) Phagocytose

Les neutrophiles présentent une capacité de phagocytose très efficace et rapide. Ils possèdent des récepteurs qui reconnaissent directement les lipopolysaccharides et les polysaccharides des pathogènes, permettant ainsi de les enrober et de les emprisonner à l'intérieur d'une vacuole : le phagosome. Tout ceci est possible grâce à un remaniement complexe des lipides membranaires et des réarrangements du cytosquelette. Les phagosomes fusionnent avec les lysosomes pour former des **phagolysosomes** (197). Le PNN peut également phagocyter des particules **opsonisées** grâce aux récepteurs Fcγ ou du complément. En particulier, FcγRIIA (CD32) et FcγRIIIB (CD16) et les récepteurs du complément CR1 (CD35) et CR3b (221). Les voies de signalisation en aval de ces types de récepteurs sont différentes. L'ingestion de cibles opsonisées par IgG se fait par l'agrégation des FcγR et la phosphorylation de leurs motifs ITAMS (*immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*) via l'activation des tyrosines kinases de la famille Src. Les ITAMS phosphorylés servent de sites d'ancrage pour les domaines SH2 des tyrosines kinases Syk qui activent à leur tour la phosphatidylinositol-triphosphate kinase et les protéines Rho (222). Suite à cette étape d'activation, des protrusions de membrane vont s'étendre autour de la surface de la particule opsonisée pour former une « coupe phagocytaire » et l'ingérer. La phagocytose des cibles opsonisées par le complément implique un processus différent. Dans ce cas, les particules opsonisées s'enfoncent dans la cellule, ce qui provoque de légères protrusions (221).

b) Métabolisme oxydatif

Différents mécanismes tels que la dégranulation, la libération d'enzymes et de protéines à activité bactéricide comme la myéloperoxydase ou la lactoferrine, ou l'activation de la NADPH oxydase, sont alors mis en œuvre au niveau du phagolysosome pour détruire la bactérie (199, 221).

- Granules

Les PNN contiennent des granules, acteurs indispensables dans la réponse inflammatoire grâce à des mécanismes ajustés. Il en existe différents types. La biogenèse des granules suit le même schéma de différenciation que le neutrophile (cf Fig). Lors de la maturation, les premiers formés au stade du promyélocyte sont les **granules azurophiles** ou granules primaires, qui sont rarement sécrétés à l'extérieur de la cellule, fusionnant plutôt avec le phagolysosome pour détruire les pathogènes ingérés. Ils contiennent la **myéloperoxydase** (MPO), une enzyme essentielle dans le métabolisme oxydatif. On retrouve également les défensines, le lysozyme, la *bactericidal/permeability-increasing protein* (BPI) et un grand nombre de sérines protéases comme la *neutrophil elastase* (NE) et la *cathepsin G* (CG). Ces granules débordent donc de composés antimicrobiens et constituent un premier barrage dans les armes moléculaires des PNN. Les **granules secondaires** ne contiennent pas de myéloperoxydase mais sont caractérisés par la présence de lactoferrine, qui en se liant au fer, possède des propriétés bactéricides et bactériostatiques. Les **granules tertiaires ou spécifiques** contiennent plutôt des enzymes servant à la dégradation de la matrice extracellulaire (gélatinase, collagénase) et des métalloprotéases. Ces granules sont les derniers formés lors de la maturation du PNN. Il existe également des **vésicules sécrétoires**, formées par endocytose à la fin de la maturation. Elles contiennent des protéines dérivées du plasma comme l'albumine et leur membrane sert de réservoir pour des molécules utilisées lors de la migration du neutrophile (4, 199, 223).

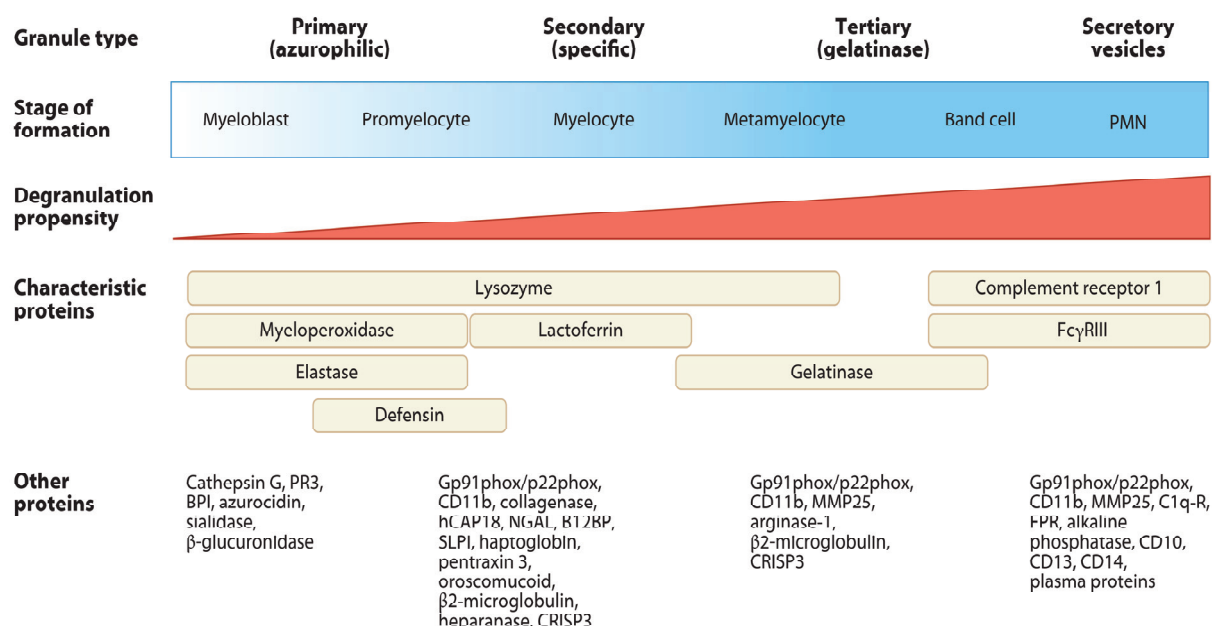


Figure 18 : Contenu des granules en fonction de la maturité des neutrophiles (4)

- Protéines antimicrobiennes

Les neutrophiles produisent une multitude de peptides et de protéines, capables d'éliminer directement ou de manière indirecte les pathogènes. La diversité de ces molécules laisse penser que certaines évoluent pour agir ensemble alors que d'autres peuvent être redondantes. Il existe 3 types d'agents antimicrobiens : les **protéines** (BPI) et **peptides** (défensines, cathelicidines) **cationiques** qui se lient aux membranes microbiennes, les **enzymes** (lysozyme, elastases...) et les **protéines** qui **privent** les microorganismes des **nutriments essentiels** à leur survie (lactoferrine, calprotectine). Leurs principaux mécanismes sont résumés dans le **Tableau 4** (4, 199).

Protéines antimicrobiennes	Mécanisme d'action
Peptides et protéines cationiques	
α -défensines	▪ Perméabilise la membrane contenant des phospholipides chargés négativement ▪ Inhibe la biosynthèse de l'ADN, ARN et des protéines ▪ Inhibe la synthèse de la paroi cellulaire
Cathelicidines (LL-37)	▪ Formation de pores transmembranaires
BPI	▪ Favorise la perméabilité bactérienne et l'hydrolyse des phospholipides bactériens en se fixant au LPS
Enzymes protéolytiques	
Lysozyme	▪ Dégrade la paroi cellulaire bactérienne
Neutrophil Elastase (NE), Cathepsin G (CG)	▪ Clive les facteurs de virulence bactériens et les protéines de la membrane externe
Protéines chélatrices	
Lactoferrine	▪ Altère la croissance bactérienne en se liant au fer
Calprotectine	▪ Altère la croissance bactérienne en se liant au manganèse et au zinc

Tableau 4 : Principales protéines antimicrobiennes et leurs mécanismes d'action d'après Amulic *et al.*(4)

- Espèces réactives de l'oxygène

Lors de leur activation, les PNN vont également produire des **espèces réactives de l'oxygène** (ERO) grâce au métabolisme oxydatif. Les ERO peuvent être différentes quant à leur stabilité, leur réactivité et leur perméabilité membranaire mais elles partagent la même fonction qui est de modifier et d'endommager d'autres molécules. Le complexe NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) oxydase se forme à partir du flavocytochrome membranaire b_{558} (constitué de deux sous unités : $p91^{phox}$ (phagocyte oxydase) et $p22^{phox}$) et de 3 protéines cytoplasmiques : $p47^{phox}$, $p67^{phox}$ et Rac2. Il débute la cascade des dérivés oxygénés en réduisant l'oxygène moléculaire en superoxyde (197). Celui-ci n'est pas un oxydant puissant mais se transforme rapidement en peroxyde d'hydrogène par dismutation. Le superoxyde peut également réagir avec l'oxyde nitrique (produit en grande quantité au niveau des sites inflammatoires) pour former le peroxynitrite. Lors de la dégranulation dans le phagosome, la MPO peut réagir avec le peroxyde d'hydrogène pour former une variété de molécules réactives. Parmi celles-ci, l'acide hypochloreux, qui est plus réactif que le

superoxyde, présente des propriétés antimicrobiennes *in vitro* en oxydant les groupements amines et ainsi former les chloramines (4, 199, 223).

c) NETose

Les neutrophiles peuvent être également soumis au phénomène de NETose. Ce concept a été introduit pour la première fois en 2004 et décrit une forme active de mort cellulaire se déroulant en quelques minutes et qui conduit à la libération de chromatine décondensée dans le milieu extracellulaire. Ces structures fibreuses, appelées **Neutrophil Extracellular Traps (NETs)** contiennent aussi bien des histones que des protéines cytoplasmiques ou issues des granules (qui se désintègrent en même temps que le noyau). Les NETs sont capables de piéger différents pathogènes extracellulaires grâce à de puissantes propriétés antimicrobiennes et immunomodulatrices (224). La nature des mécanismes mis en jeu dans leur formation n'est pas encore bien définie. La décondensation de la chromatine, particulièrement dense dans les PNN matures, est associée avec la citrullination de l'histone H3 par PAD4 (*peptidylarginine deiminase 4*) (225). De plus, l'élastase libérée par les granules azurophiles dégrade les histones et réagit avec la myéloperoxydase pour aboutir à la décondensation de la chromatine, nécessaire à la formation des NETs. Celle-ci est aussi dépendante du peroxyde d'hydrogène généré par la NADPH oxydase et métabolisé par la myéloperoxydase (226). Une étude récente de Keshari *et al.* montre que les cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β et IL-8) sont également capables de stimuler le métabolisme oxydatif et donc la formation des NETs (227).

Les NETs peuvent également avoir des effets néfastes pour l'hôte en exposant des molécules du soi au milieu extracellulaire, amenant à des mécanismes d'auto-immunité (228). Ils seraient notamment impliqués dans la physiopathologie du lupus érythémateux systémique caractérisé par la formation d'autoanticorps souvent dirigés contre la chromatine ou des composants de PNN (229).

L'exploration des NETs en microscopie a révélé la présence de neutrophiles viables après la formation des NETs. Ces PNN anucléés étaient même capables de fonctions phagocytaires avec la formation de phagosomes matures. Ces données générées par Yipp *et al.* suggèrent que la NETosis n'implique pas nécessairement une mort cellulaire (230).

La richesse du potentiel antimicrobien du neutrophile est illustrée dans la **Figure 19** (231).

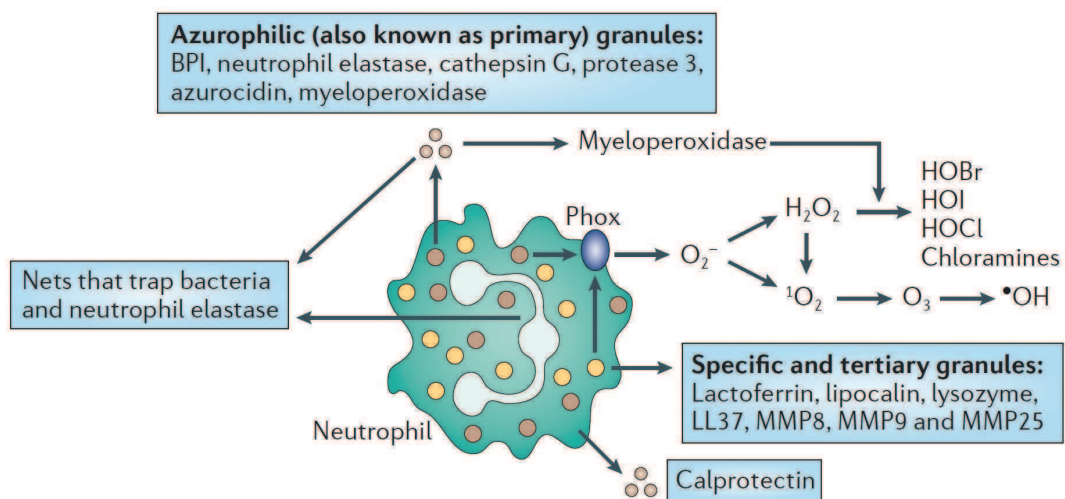


Figure 19 : Potentiel antimicrobien des neutrophiles (231)

H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène – HOBr : acide hypobromeux – HOCl : acide hypochloreux – HOI : acide hypoiodieux – MMP : *matrix metalloproteinase* – $^1O_2$: singlet d'oxygène – O_2^- : superoxyde – O_3 : ozone – Phox : phagocyte oxydase.

d) Résolution de l'inflammation

Les neutrophiles sont généralement considérés comme des composants passifs dans la résolution de l'inflammation puisqu'ils vont être dégradés et éliminés rapidement. Néanmoins, ils seraient impliqués dans une induction active de la résolution via la production de médiateurs lipidiques : les **résolvines** (résolvine E1, E2, D1 et D2) et **protectines** dérivées des acides gras polyinsaturés essentiels comme l'oméga-3 (232). Ces médiateurs lipidiques inhibent la migration transendothéliale et l'infiltration tissulaire des PNN (233, 234). Lors des étapes tardives, finales, de l'inflammation, les PNN effectuent également un changement dans la biosynthèse des eicosanoïdes. Elle ne se fait plus à partir du leucotriène B4 mais de lipoxine A4, qui est un inhibiteur du recrutement des neutrophiles grâce à son interaction avec LXA4 (232). La contribution des neutrophiles dans la résolution de l'inflammation inclue également le blocage et la séquestration des chimiokines et cytokines (235, 236). Les PNN, particulièrement ceux qui ont été stimulés par l'IL-10, constituent aussi une source importante de IL-1RA (237). Enfin, les neutrophiles apoptotiques représentent une étape importante dans cette résolution grâce à l'expression de signaux « *eat-me* », déclenchant ainsi leur phagocytose, ce qui est à l'origine d'une régulation de l'inflammation et favorise la réparation tissulaire (238).

IV. CYTOKINES – IMMUNE CROSSTALK

En étant l'une des premières cellules présentes sur le site de l'infection, le neutrophile possède un **rôle central dans l'immunité**. Ils sécrètent des cytokines et chimiokines nécessaires à l'initiation de la réponse immunitaire adaptative. Les PNN sont notamment impliqués dans le recrutement et l'activation des cellules dendritiques et interagissent avec les lymphocytes (4).

Comparés à d'autres types cellulaires tels que les macrophages, les neutrophiles produisent de plus faibles quantités de cytokines mais grâce à un recrutement abondant au niveau du site inflammatoire, leur contribution au pool total de cytokines est conséquente (231). De plus, les protéases sécrétées par les PNN sont également capables de moduler la signalisation cellulaire et la régulation immunitaire (239).

La cytokine la plus abondamment produite est l'IL-8 dont le rôle premier est de recruter d'autres neutrophiles (240). De même, l'IL-1 β et le TNF- α produites par le PNN ont la capacité d'induire la production de chimioattractants par les autres cellules.

a) Monocytes et macrophages

L'afflux de PNN est suivi très rapidement par un recrutement de monocytes, suggérant une relation entre ces deux phénomènes. En effet, les neutrophiles sont capables de recruter des monocytes via de nombreux mécanismes : expression de chimioattractants spécifiques des monocytes tels que MCP-1 (*Monocyte Chemotactic Protein-1*) ou MIP-1 α (*Macrophage inflammatory protein-1 α*) mais aussi stimulation de leur extravasation grâce à des protéines contenues dans les granules et donc libérées lors de la dégranulation (LL-37, CG) (241). De plus, les PNN modulent la production de cytokines des monocytes et macrophages (242), améliorant ainsi directement leur activité antimicrobienne. Enfin, ces monocytes recrutés, différenciés en macrophages répriment le chimiotactisme des PNN et s'assurent de l'élimination des corps apoptotiques (4, 231).

b) Cellules dendritiques

Les PNN sont aussi capables de recruter et stimuler les cellules dendritiques (DC), notamment grâce à l'interaction entre Mac-1 (CD18) et DC-SIGN (DC-specific ICAM3-grabbing non-integrin). Ceci est l'origine d'une production locale de TNF- α . L'intérêt d'une telle interaction *in vivo* est observé lorsque des DC spléniques issus de souris déplétées en neutrophiles et infectées par *Toxoplasma gondii* montrent une réduction de la production d'IL-12 et de TNF- α (243).

Au contraire, ils peuvent aussi ralentir le fonctionnement des DC dans les ganglions lymphatiques en inhibant la présentation antigénique aux lymphocytes CD4 (4). De plus, les ectosomes (de larges vésicules membranaires sécrétées par bourgeonnement ou shedding à partir

de la membrane plasmique) libérés par les neutrophiles sont capables d'inhiber la maturation des DC. Ainsi, en réponse à une stimulation au LPS, on observe une réduction de leur activité phagocytaire, et de l'expression de marqueurs de surface (CD40, CD80, CD83, CD86), une altération de la production de cytokines (IL-8, IL-10, IL-12, and TNF- α) et une incapacité d'induire la prolifération des lymphocytes T. Ceci serait peut-être dû à une augmentation de la production de la cytokine immunosuppressive TGF β 1 (*transforming growth factor- β 1*) (244).

c) Natural killer cells (NK)

Les études sur les interactions existant entre les PNN et les NK ont surtout été réalisées *in vitro* mais leur interprétation reste complexe étant donné la difficulté d'obtenir des suspensions cellulaires pures. Il a été montré récemment que les neutrophiles, NK et DC interagissaient dans un « ménage à trois » grâce à l'implication de cytokines mais aussi de contacts directs cellule-cellule (4). De plus, les ERO formées par les granulocytes possèdent des fonctions inhibitrices sur les activités cytotoxiques des NK, leur survie ou l'expression des NCRs (*natural cytotoxicity receptors*) (245). En réalité, les NK sont sensibles à de nombreuses molécules issues des PNN. Ces effets sont résumés dans le **Tableau 5** suivant.

Molécules dérivées des PNN	Effet(s) sur les NK	Références
Arginase I	Inhibition de la prolifération induite par IL-2	(246)
	Inhibition de la libération d'IFN- γ induite par IL-12 et IL-18	
Azurocidine	Augmentation de l'activité cytotoxique	(247)
Cathepsine G	Augmentation de l'activité cytotoxique	(247)
Défensines	Augmentation de l'activité cytotoxique	(247)
Elastase	Augmentation de l'activité cytotoxique	(247)
Lactoferrine	Augmentation de l'activité cytotoxique	(248)
Protéines lysosomales	Inhibition de l'activité cytotoxique	(249)
ERO	Induction de l'apoptose	(250)
	Inhibition de l'activité cytotoxique	(251)
	Inhibition de la prolifération	(252)
Sérine protéases	Suppression de la cytotoxicité cellulaire anticorps-dépendante	(253)

Tableau 5 : Effet des molécules dérivées des neutrophiles sur les NK d'après Costantini *et al.* (245)

De manière intéressante, les NK ont également une action sur les neutrophiles. Placés en coculture en présence de cytokines telles que l'IL-2, l'IL-15 ou l'IL-18 en concentrations insuffisantes pour l'activation des neutrophiles, Costantini *et al.* ont montré que les NK activés sont capables de prolonger la survie des PNN grâce à la libération de facteurs solubles. En effet, la séparation physique des deux populations par une membrane de transwell n'annihile pas ces effets (254). De plus, les NK sont à l'origine d'une up-régulation de l'expression de CD11b, favorisent l'excrétion de CD62L et induisent l'expression du CD64 sur les neutrophiles en coculture. Enfin, les NK activées sont capables de potentialiser la production d'ERO et la capacité phagocytaire des PNN (254, 255).

d) Lymphocytes

Ce crosstalk entre les PNN, premiers acteurs de l'immunité innée, et les lymphocytes, cellules de l'immunité adaptative, peut être surprenant. Pourtant, les neutrophiles et lymphocytes T modulent et impactent quantitativement et qualitativement les fonctions des uns et des autres (256). Les PNN affectent indirectement les fonctions des T via les cellules dendritiques comme expliqué précédemment, mais aussi de manière plus directe en sécrétant de l'IL-12, cruciale dans la différenciation Th1. Ils expriment également des chimioattractants spécifiques des lymphocytes T, et des facteurs de développement et de maturation des B. Une communication via les cytokines se met également en place : par exemple, l'IFN- γ , sécrété par les T, prolonge la survie des PNN et augmente leur capacité phagocytaire. De plus, l'IL-17, sécrétée par les lymphocytes T *helper* 17 (Th17), stimule la granulopoïèse, ainsi que le recrutement et la survie des neutrophiles (4, 231).

Les neutrophiles sont également capables de présenter l'antigène. En effet, à partir de souris chez qui les cellules présentatrices d'antigène n'expriment pas le CMH I, Beauvillain *et al.* ont montré que des PNN « pulsés » par des antigènes sont capables d'induire la différenciation des lymphocytes T CD8+ cytotoxiques (257). Ils expriment également le CMH II et des molécules de costimulation dans des conditions inflammatoires (258).

Les **cellules myéloïdes suppressives** (MDSC : Myeloid-derived Suppressor Cells) représentent une population hétérogène de progéniteurs myéloïdes et de cellules immatures myéloïdes (IMC : Immature Myeloid Cells) dotée de propriétés immunosuppressives. Chez les individus en bonne santé, les IMC sont produites dans la moelle osseuse et se différencient rapidement en granulocytes, macrophages ou cellules dendritiques matures. En revanche, dans certaines conditions

pathologiques, il existe un blocage dans la différenciation des IMC en cellules matures aboutissant à l'expansion de cette population. La propriété commune des MDSC reste leur capacité à **inhiber la prolifération et les fonctions des lymphocytes T**. De nombreux mécanismes sont mis en jeu dans cette immunosuppression mais le contact cellulaire proche est toujours nécessaire. (259).

L'un des premiers mécanismes décrits pour la suppression des cellules par les MDSC murins a été associé au métabolisme de la L-arginine. Cet acide aminé est le substrat de 2 enzymes : l'arginase (Arg) et l'oxyde nitrique synthase (NOS). La L-arginine étant essentielle au fonctionnement des lymphocytes T, ces enzymes représentent des composantes cruciales dans leur inhibition. Plusieurs études (260, 261) ont mis en évidence un lien étroit entre la disponibilité de l'arginine et la régulation de la prolifération des T. De plus, l'inhibition des ERO dans les MDSC, notamment par l'ajout de catalase, aboutit à l'annihilation des effets suppresseurs de ces cellules (262).

Dans l'ensemble, il semblerait que les neutrophiles ont un effet sur l'immunité adaptative en stimulant la réponse immunitaire humorale et en inhibant la réponse immunitaire cellulaire.

e) Cytokines

Une fois stimulés, les neutrophiles sont capables de produire des **cytokines pro-inflammatoires** (TNF- α , IL-1 β), des **chimiokines** (IL-8) mais aussi des **cytokines anti-inflammatoires** (IL1-ra et TGF β) et immunorégulatrices (IFN- γ , IL10). Les PNN ont longtemps été considérés comme dépourvus d'activité transcriptionnelle et capables de synthétiser pas ou peu de protéines. Cependant, il est désormais évident que les neutrophiles sont à l'origine d'une riche diversité de cytokines. De plus, cette production est largement influencée par des molécules stimulantes comme le LPS, le plus puissant. Enfin, il est à noter que la synthèse par les neutrophiles passe par une étape d'accumulation de l'ARNm des cytokines correspondantes (221, 263).

Le **Tableau 6** suivant résume l'expression des cytokines par les PNN *in vitro*.

Cytokines exprimées par les neutrophiles <i>in vitro</i>	
Cytokines pro-inflammatoires	TNF- α , IL-1, IL-12
Cytokines anti-inflammatoires	IL-1Ra
Chimiokines	IL-8, GRO- α , MIP-1 α , MIP-1 β
Autres cytokines et facteurs de croissance	IFN- α , IFN- β , G-CSF, VEGF, FasL
Sécrétion toujours controversée	IL-6, GM-CSF, IFN- γ , IL-10

Tableau 6 : Différentes cytokines exprimées par les PNN *in vitro*, d'après Witko Sarsat *et al.* (221).

La communication complexe entre les neutrophiles et les autres cellules de l'immunité est représentée schématiquement dans la **Figure 20**.

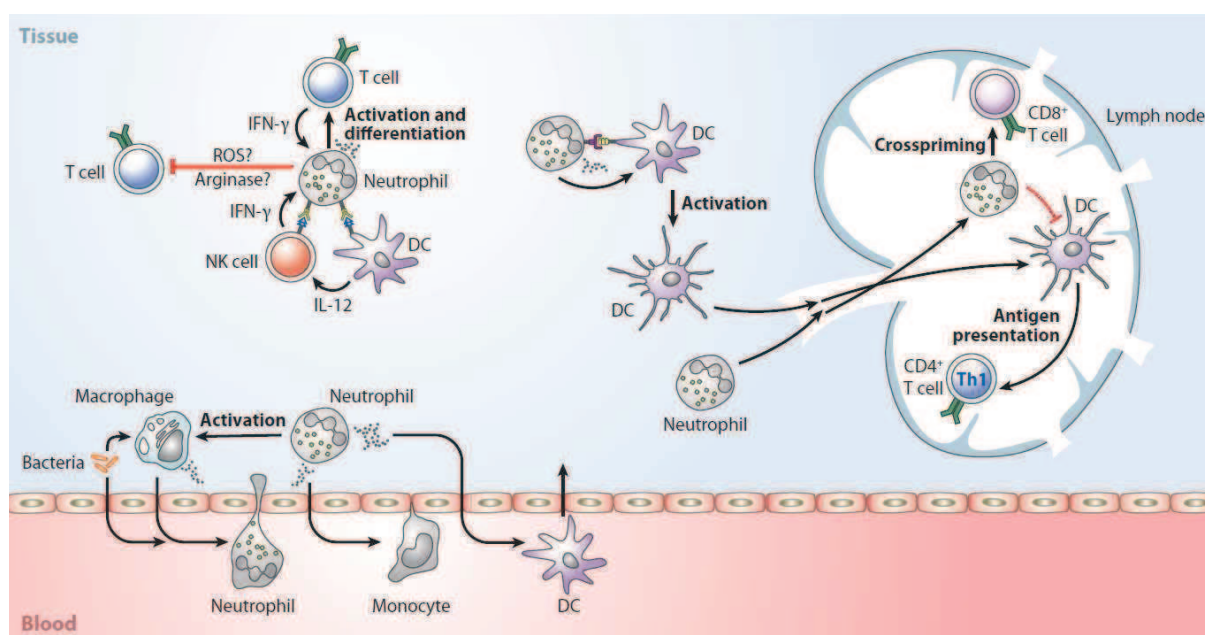


Figure 20 : Représentation schématique de la communication du neutrophile avec les autres cellules de l'immunité (4)

V. APOPTOSE

Bien que les neutrophiles jouent un rôle majeur dans l'élimination des pathogènes, ils peuvent également se montrer potentiellement délétères pour les cellules environnantes s'ils sont

continuellement stimulés. Leur survie peut être à l'origine du développement de défaillances d'organes en produisant en excès les médiateurs pro-inflammatoires et ainsi, nuire à l'hôte. Il est donc important que les PNN soient efficacement éliminés en même temps que les micro-organismes nocifs à l'origine de leur activation (264).

En l'absence d'inflammation, les PNN circulent pendant une courte période avant de devenir **sénescents** et d'être éliminés par le foie, la rate ou la moelle osseuse grâce à des mécanismes apoptotiques. Ce processus de mort cellulaire programmée est essentiel dans la régulation de l'homéostasie des neutrophiles. En effet, non seulement l'apoptose réduit le nombre de PNN présents mais limite également leur recrutement en amont. L'apoptose des PNN peut être initiée par un stimulus propre à la voie extrinsèque (e.g. TNF- α , Fas ligand), ou à la voie intrinsèque (e.g. ERO ou médié par la mitochondrie). Les PNN apoptotiques sont ensuite ingérés par les macrophages. Les neutrophiles peuvent également subir une apoptose à la suite d'une phagocytose, un processus nommé mort cellulaire induite par phagocytose (PICD – *phagocytosis-induced cell death*) (265).

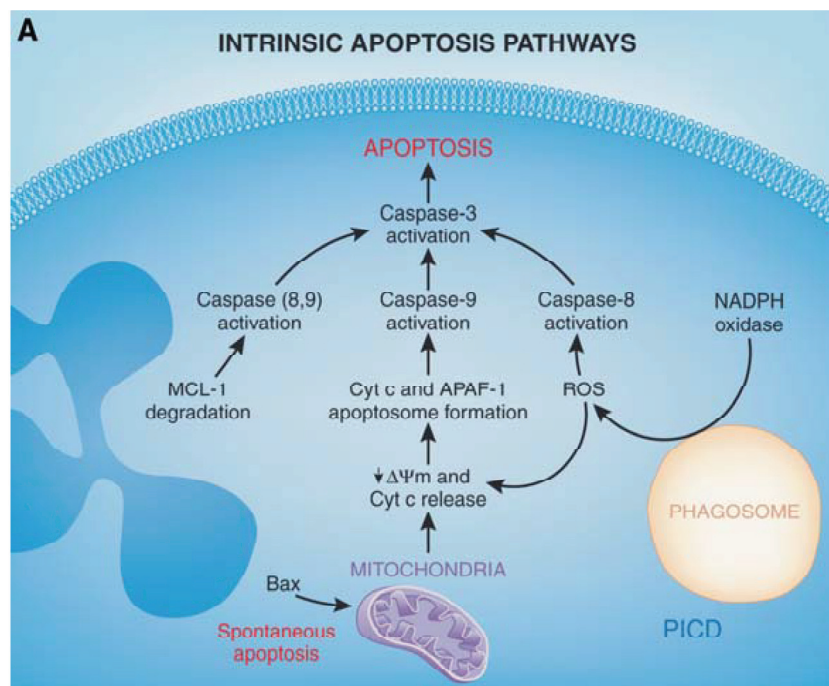
La **Figure 21** représente les différentes voies d'activation de l'apoptose des neutrophiles (265). **L'apoptose spontanée** constitue un **processus intrinsèque**, c'est-à-dire que le signal d'initiation vient de l'intérieur de la cellule. L'initiation de la voie intrinsèque est régulée spécifiquement par l'interaction de nombreuses protéines pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 qui vont jouer un rôle dans l'activation (« *Bcl-2-associated X protein* » (Bax), « *Bcl-2-antagonist killer* » (Bak), « *Bcl-2-interacting mediator of cell death* » (Bim), « *BH3-interacting domain death agonist* » (Bid), « *Bcl-2-binding component 3* » (PUMA)) mais aussi dans l'inhibition de l'apoptose (Bcl-2, « *B-cell Lymphoma extra-large* » (Bcl-XL), « *Myeloid Cell Leukemia sequence 1* » (MCL1)) (266). Ces médiateurs vont ainsi contrôler la perméabilité et la fonctionnalité mitochondriale. La libération du cytochrome c à travers la membrane mitochondriale externe va permettre la formation de l'apoptosome. Ce complexe multi-protéique est formé par l'interaction du cytochrome c avec Apaf1 (*Apoptotic Peptidase Activating Factor-1*) et la pro-caspase-9 dans le cytosol (267). L'apoptosome permet le clivage de la pro-caspase-9 en forme active qui stimulera à son tour d'autres caspases dont la caspase-3.

Les signaux de la **voie extrinsèque** sont généralement des protéines solubles qui se fixent sur des récepteurs de surface entraînant ainsi l'activation de voies de signalisation intracellulaires. Les neutrophiles expriment à leur surface Fas (CD95) et son ligand FasL (CD95L) (268). Fas est une protéine transmembranaire contenant un domaine de fixation pour FasL et une partie intracellulaire FADD (*Fas-associated death domain*). FADD contient également un domaine de liaison à la pro-

caspase 8 sous sa forme dimérique active, puis déclenche la cascade d'activation des différentes caspases dont la caspase-3. L'interaction entre Fas et FasL est déclenchée de manière autocrine ou paracrine (265, 266).

De même, le TNFR est une protéine transmembranaire associant un domaine de fixation pour le TNF- α et une partie intracellulaire TRADD (*TNFR-associated death domain*). TNF- α est capable d'induire des effets pro- ou anti-apoptotiques en fonction de sa concentration. Van den Berg *et al.* ont souligné qu'à faible concentration ($<0.1\text{ng/ml}$), le TNF- α retarde l'apoptose et stimule plutôt la production de cytokines pro-inflammatoires alors qu'en quantité plus élevée, il initie ce phénomène de mort cellulaire programmée (269). L'apoptose médiée par le TNFR ou TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) ne dépend pas seulement de l'activation des caspases (270). En effet, Maiani *et al.* ont montré qu'en ajoutant un inhibiteur complet de caspase, cela n'entraînait pas de diminution de l'apoptose induite par TNFR ou TRAIL mais bien de celle stimulée par Fas/FasL.

L'apoptose induite par TRAIL apparaît importante pour les PNN sénescents lors de leur retour dans la moelle osseuse après leur passage dans la circulation (271).



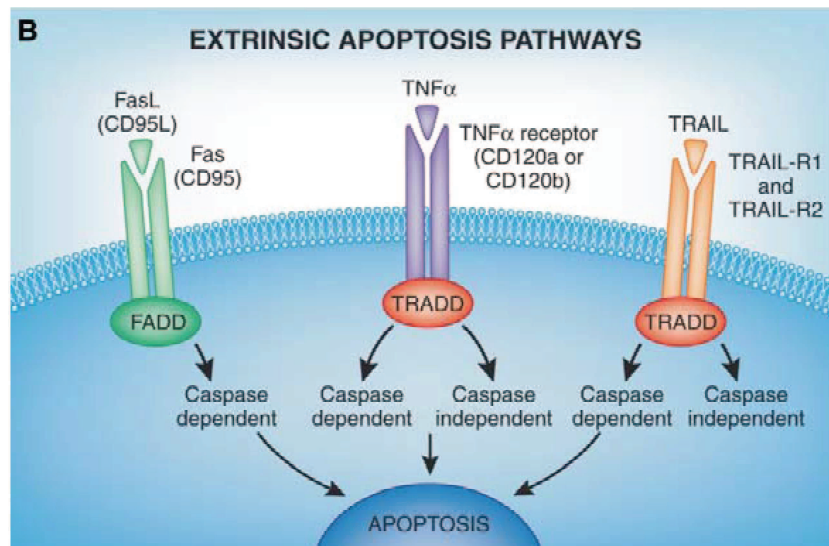


Figure 21 : Mécanismes de l'apoptose des neutrophiles A : voie intrinsèque B : voie extrinsèque (265).

Dès qu'ils arrivent au niveau du site de l'infection, leur durée de vie est prolongée par la présence de médiateurs inflammatoires, comme le GM-CSF, ou de chimiokines (IL-8, GRO- α). En effet, ils augmentent la stabilité de la mitochondrie et réduisent l'activité de la caspase 3 (272) en diminuant l'expression de Bcl-2 (273). Au contraire, les cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 accélèrent l'apoptose des neutrophiles activés par du LPS (274).

Les cellules apoptotiques maintiennent une intégrité membranaire pendant une période donnée et il est nécessaire qu'elles soient éliminées rapidement afin d'éviter une nécrose secondaire ou la libération de molécules cytotoxiques qui pourraient entraîner une inflammation ou endommager les tissus de l'hôte. D'ailleurs la redondance des mécanismes d'élimination des PNN en apoptose souligne le fait que cet aspect est majeur pour préserver l'homéostasie du système immunitaire. La clairance des cellules apoptotiques par les macrophages implique différents récepteurs : notamment le récepteur de la phosphatidylsérine (275), les récepteurs du complément (276), les lectines, le CD14 et le CD44 (277).

VI. PATHOLOGIES

a) Déficits

- Neutropénie congénitale sévère

Lors de la neutropénie congénitale sévère (NCS), la **différenciation des neutrophiles est bloquée au stade promyélocyte/myélocyte**, conduisant à une neutropénie isolée associée à des

infections bactériennes et fongiques récurrentes, de localisation très variable. Les sites les plus fréquents sont cutanéomuqueux, ORL et pulmonaires. Les manifestations stomatologiques, quasi constantes après l'âge de deux ans, sont marquées par une gingivite érosive, hémorragique et douloureuse, associée à des papules de la langue et des faces muqueuses. Les infections peuvent être très sévères voire létales. Une évolution vers une leucémie aiguë ou une myélodysplasie affecte environ 15% des patients. Cette pathologie nécessite un traitement par G-CSF au long cours. Grâce à ce facteur de croissance, les patients sont capables de produire de faibles quantités de PNN mais suffisamment pour les protéger d'infections éventuelles (197). A cette date, les mutations de quatre gènes ont été impliquées dans la neutropénie congénitale sévère. Ces gènes sont celui de la neutrophile élastase (ELA2) (278), le gène GFI1 (279), le gène HAX1 (280) et les mutations activatrices du gène de la maladie de Wiskott Aldrich (WASP) (281). Ces quatre mutations ont des transmissions différentes : autosomique dominante pour ELA2 et GFI1, autosomique récessive pour HAX1 et récessive liée à l'X pour WASP. Selon le type de mutation, les patients présentent soit une neutropénie isolée (ELA2) ou des syndromes additionnels comme une lymphopénie (GFI1), une monocytopénie (WASP) ou des convulsions/troubles mentaux (HAX1).

- Granulomatose septique chronique

La granulomatose septique chronique (CGD) est une maladie héréditaire caractérisée par un défaut de destruction des bactéries et des champignons phagocytés par les neutrophiles et les macrophages, lié à une **anomalie de la NADPH oxydase** (282). En effet, les phagocytes ne sont pas capables de produire le superoxyde O_2^- . La sévérité de la CGD est d'ailleurs inversement corrélée avec la capacité de production d'ERO résiduelle (283). Le mode de transmission de cette maladie est de type récessif lié à l'X ou autosomique récessif. Il en existe quatre formes génétiques différentes. Le déficit en chaîne lourde du cytochrome (lié à l'X) est le plus fréquent et est associé avec une apparition précoce ainsi qu'une morbidité et mortalité élevées (283). Le traitement consiste essentiellement en une prévention des infections bactériennes et fongiques par des antibiotiques et des antifongiques. Dans certaines situations, une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques peut être indiquée (197). Les patients présentent également un tableau d'activation immune chronique, possiblement due à la libération excessive d'IL-1 β faisant suite à la diminution de l'autophagie (284). Ainsi, les maladies auto-immunes comme le lupus érythémateux ou la polyarthrite rhumatoïde sont plus importantes chez ces patients (282, 283).

- Déficits d'adhésion leucocytaire

Le déficit d'adhésion leucocytaire (DAL) est une immunodéficiencia primaire caractérisée par une **anomalie du processus d'adhésion leucocytaire** conduisant à une leucocytose sévère et des infections récurrentes (285). Le DAL résulte d'une altération dans les étapes du processus inflammatoire, à savoir, la migration des leucocytes depuis les vaisseaux jusqu'au siège de l'infection, ce qui nécessite l'adhésion des leucocytes à l'endothélium. La prévalence est inconnue, mais moins de 350 cas ont été rapportés à ce jour. Les premiers signes apparaissent en général dans la petite enfance. Trois entités cliniques distinctes, correspondant à trois altérations différentes dans la cascade d'adhésion leucocytaire, ont été décrites. Le DAL-I est caractérisé par la survenue fréquente d'infections bactériennes sévères engageant le pronostic vital. Il est dû à des mutations du gène ITGB2 (21q22.3) codant pour la $\beta 2$ intégrine CD18 (286). Le DAL-II se manifeste par une leucocytose, des infections récurrentes, un retard de croissance sévère et un déficit intellectuel sévère. Il résulte de mutations du gène SLC35C1 (11p11.2) codant pour un transporteur guanosine 5'-diphosphate fucose (287). Le DAL-III (aussi appelé variant du DAL-I) est caractérisé par des infections bactériennes sévères ajoutées à un trouble important de la coagulation et est dû à des mutations du gène FERMT3 (11q13.1) codant pour la kindlin-3 dans les cellules hématopoïétiques (288).

Le diagnostic repose sur les manifestations cliniques et sur une numération complète du sang révélant une neutrophilie. Pour les DAL-I et DAL-II, une analyse en cytométrie en flux doit être réalisée pour CD18 et CD15 respectivement. Un test d'agrégation plaquettaire doit être réalisé pour les patients atteints de DAL-III. Dans tous les cas, l'analyse génétique confirme le diagnostic. La prise en charge dépend du type de DAL. Le traitement vise à contrôler les infections et inclut la prise d'antibiotiques et, dans certains cas, une transplantation de moelle osseuse. Sans transplantation, les patients atteints de DAL-I et DAL-III décèdent à la suite d'une infection dans les deux premières années de vie. Le taux de survie chez les patients atteints de DAL-I ayant reçu une transplantation de moelle osseuse est de 75 %. Certains patients atteints de DAL-II vivent jusqu'à l'âge adulte (197).

- Autres

WHIM est un acronyme pour désigner un **syndrome** incluant la présence de verrues (Warts), une hypogammaglobulinémie (H), des infections bactériennes à répétition (I) et une neutropénie avec moelle hyperplasique (M=myélodysplasie). En effet, des mutations au niveau de CXCR4 vont entraîner une rétention des PNN au niveau de la moelle osseuse (289). De plus, ces patients présentent également une lymphopénie et une monocytopénie.

Les **déficits spécifiques des granules** sont très rares et généralement les patients souffrent

plutôt d'infections récurrentes à cause d'un manque de protéines des granules secondaires et tertiaires. Une mutation est notamment responsable de ce déficit, elle touche un facteur de transcription impliqué tardivement dans la régulation de la granulopoïèse, le CCAAT/enhancer-binding protein ϵ (cEBP ϵ) (290). En revanche, les déficits héréditaires en MPO sont fréquents chez l'homme mais le plus souvent asymptomatiques, excepté chez les patients souffrant de diabète (291).

b) Syndrome de détresse respiratoire aigüe (SDRA)

Le **syndrome pulmonaire aigu** (*acute lung injury* – ALI) et sa forme la plus sévère, le **syndrome de détresse respiratoire aigüe** sont caractérisés par un œdème pulmonaire lié à une augmentation de la perméabilité de la barrière alvéolo-capillaire et donc à une mauvaise oxygénation artérielle. L'œdème, ainsi que les détériorations endothéliales et épithéliales sont accompagnés par un afflux de neutrophiles dans l'espace broncho-alvéolaire. Par conséquent, l'activation et le recrutement des PNN sont considérés comme des étapes importantes dans la progression du SDRA (292, 293). En effet, la migration des neutrophiles dans les poumons n'est pas suffisante pour provoquer un ALI ; leur activation est également requise. D'ailleurs, chez les patients présentant un SDRA, la concentration de neutrophiles dans le lavage broncho-alvéolaire (LBA) est directement corrélée avec la sévérité et la mortalité. Steinberg *et al.* ont souligné une différence notable de PNN présents dans le LBA de patients survivants et non-survivants avec une augmentation chez ces derniers (294). Un des mécanismes responsable de la prépondérance des neutrophiles activés au niveau broncho-alvéolaire repose sur un retard d'apoptose à travers la voie PI3 kinase-AKT. Celle-ci est à l'origine de la prévention de libération de cytochrome c, de l'inhibition de l'activation de Bad (pro-apoptotique), de l'augmentation de la transcription des facteurs anti-apoptotiques Mcl-1 et Bcl-2 et de l'inhibition de la caspase 9 (292).

c) Infection et inflammation chronique

Physiologiquement, une inflammation est toujours suivie d'une phase de résolution, phase importante pour l'homéostasie tissulaire (295). L'impuissance des neutrophiles à entrer en apoptose ou certains désordres dans l'élimination des corps apoptotiques aboutit à **l'inflammation chronique**.

On peut alors observer une accumulation des substances cytotoxiques qui sera associée avec l'apparition de pathologies sévères telles que la maladie broncho-pulmonaire chronique obstructive (BPCO) et la polyarthrite rhumatoïde (PR), le lupus et les troubles cardiovasculaires. La sévérité de l'inflammation est très souvent corrélée à une issue clinique de mauvais pronostic (4). Lors de l'activation locale, les PNN ayant transmigrés libèrent leur agents toxiques, protéases et oxydants,

responsables de la lésion tissulaire, et les chimiokines qui vont entretenir une boucle de recrutement. Notamment, les *matrix metalloproteases* (MMPs) clivent la matrice extracellulaire composée d'élastine et de collagène et dégradent ainsi les récepteurs de l'immunité et les collectines, ouvrant une brèche dans la défense immunitaire.

La **BPCO** est une cause majeure de mortalité dans les pays industrialisés où le tabac en est le principal instigateur. Une infiltration chronique de PNN dans les poumons de patients est à l'origine de dommages tissulaires et de dysfonctions d'organes. Une molécule clé contrôlant la réponse inflammatoire dans le poumon est la leucotriène A4 hydrolase (LTA4H). Cette enzyme possède deux activités opposées. Premièrement, son activité hydrolase transforme le leukotriène A4 en leucotriène B4, un puissant chimioattractant des neutrophiles et pro-inflammatoire. De plus, LTA4H est une aminopeptidase capable d'inactiver le PGP (*proline-glycine-proline tripeptide*), lui conférant alors des propriétés anti-inflammatoires. La fumée de cigarette inhibe sélectivement l'activité aminopeptidase de LTA4H, favorisant ainsi l'accumulation de leucotriène B4 et de PGP. Ce dernier est également un chimioattractant. Le recrutement des PNN est donc stimulé, ce qui va entretenir l'inflammation chronique du poumon (296). La NADPH oxydase, plutôt connue comme la source principale des ERO, joue paradoxalement un rôle pour limiter l'inflammation, notamment au niveau du poumon (297). En effet, Davidson *et al.* ont montré que la NADPH oxydase était capable d'activer Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2), un facteur de transcription à l'origine de voies anti-oxydative et cytoprotective (298).

Les neutrophiles constituent les leucocytes les plus abondants présents dans le fluide synovial des patients souffrant de **polyarthrite rhumatoïde**. Leur rôle dans la pathogénèse de cette maladie a d'ailleurs été largement démontré. Notamment, la synthèse de leucotriène B4 par les PNN au niveau des articulations est essentielle (299). En effet, il agit de manière autocrine via le récepteur BLT1 pour promouvoir le recrutement d'une première vague de neutrophiles dans l'articulation (300). Ensuite, la deuxième vague est stimulée par la production de chimiokines (notamment l'IL-8) et cytokines par le tissu synovial.

Ces exemples illustrent les complexes cascades de régulation impliquant les lipides, les cytokines et les chimiokines pour orchestrer le recrutement des PNN lors d'une inflammation chronique.

d) Auto-immunité

Les PNN et surtout leurs produits sont considérés à la fois comme des cibles et des médiateurs de l'auto-immunité. MPO et PR3, notamment, sont les principales cibles des ANCA

(*antineutrophil cytoplasmic antibodies*), des auto-anticorps dirigés contre des antigènes présents dans le cytoplasme des neutrophiles. La **granulomatose de Wegener** par exemple, est aussi systématiquement associée avec la présence d'ANCA. L'étendue des dommages tissulaires chez les patients atteints de la maladie de Wegener est d'ailleurs directement corrélée avec l'infiltrat de PNN et non avec les marqueurs traditionnels de l'auto-immunité comme l'activation des lymphocytes T ou le titrage des auto-anticorps (301). De même, les ANCA se fixent sur la MPO ou PR3 exprimées à la surface des neutrophiles activés, favorisant ainsi la dégranulation et la libération de chimioattractants et d'ERO qui vont ensemble, conduire à un cercle vicieux de dommages tissulaires et d'inflammation (4).

Les auto-anticorps produits lors du **lupus érythémateux disséminé** (LED) sont également des ANCA (ou dirigés contre la chromatine). Le LED est une maladie auto-immune multi-organes caractérisée par une production d'IFN et une granulopoïèse importantes ainsi que des dysfonctions des lymphocytes T et B (302). Alors que les PNN ont longtemps été suspectés comme agent responsable, leur rôle dans la pathophysiologie du LED reste à définir. La dégradation des NETs par la DNase I, retrouvée normalement dans le sérum de sujets sains, semble compromise chez certains patients. Cet effet est d'ailleurs corrélé avec une quantité importante d'anticorps anti-nucléaires, la présence d'auto-anticorps spécifique des NETs et d'inhibiteurs de DNase I (229, 303). De plus, une dégradation altérée des NETs est associée avec le développement du lupus néphrétique, une des formes les plus sévères du LED.

e) Cancer

Les cellules inflammatoires constituent un composant essentiel du microenvironnement de la tumeur et jouent un rôle dans sa progression. L'infiltration des neutrophiles (*tumour-associated neutrophils* – TANs) au sein de la tumeur n'est généralement pas prédominante, laissant la place aux TAMs (*tumour-associated macrophages*). Ainsi la relation entre l'infiltration des TANs et le pronostic du cancer chez l'homme n'est pas systématiquement vérifiée. Cependant, leur rôle dans la progression de la maladie dans certains types de cancers est de plus en plus démontré (304, 305). Par exemple, l'évolution de la tumeur sous l'influence du TNF dans le cas des cancers ovariens implique les lymphocytes Th17 qui favorisent le recrutement des neutrophiles (306).

Les TAMs et TANs jouent également un rôle dans l'angiogenèse de la tumeur. Les chimiokines sont notamment fréquemment présentes au sein des tumeurs et favorisent cette néovascularisation. GRO- α (CXCL1) par exemple a démontré une activité angiogénique médiée par VEGF-A (*vascular endothelial growth factor A*) (307, 308).

La myélopoïèse est profondément modifiée au cours de l'inflammation et du cancer et ceci aboutit à la formation des MDSC. De nombreuses études retrouvent cette expansion de MDSC dans le cancer et l'associent à l'immunosuppression reconnue dans cette pathologie (309). Dans plusieurs types de modèles de tumeurs, 20 à 40% des splénocytes sont des MDSC (elles ne représentent que 2 à 4% dans des conditions normales) et ces cellules sont aussi présentes dans les tissus tumoraux et les ganglions lymphatiques. Chez l'homme, une étude d'Almand *et al.* (310) met en avant cette expansion des MDSC chez des patients avec différents types de cancer. De plus, ces cellules sont responsables de la suppression de réponse T spécifique de l'antigène chez les patients et pourraient donc être impliquées dans l'immunosuppression du cancer. Une autre étude de Brandau *et al.* (311) souligne l'expansion de MDSC et surtout une diminution de l'expression des récepteurs aux chimiokines CXCR1 et CXCR2 compromettant leurs propriétés de migration. Les MDSC restent ainsi dans le compartiment sanguin et présentent un taux d'apoptose réduit par rapport aux polynucléaires neutrophiles. Il peut donc être intéressant d'essayer d'éliminer ces cellules suppressives pour améliorer la réponse anti-tumorale et par exemple renforcer le potentiel des vaccins. Kusmartsev *et al.* (312) ont utilisé l'acide tout-trans-rétinoïque (ATRA) dans deux différents modèles murins tumoraux. Ils ont mis en évidence que l'ATRA est responsable de la diminution du nombre de MDSC dans ces modèles grâce à une stimulation de leur différenciation en cellules dendritiques, macrophages et granulocytes. De plus, cette chute du nombre de cellules suppressives est associée à une meilleure réponse immunitaire des lymphocytes T CD4 et CD8 et l'amélioration d'un traitement anti-tumoral vaccinal.

VII. CONCLUSION

Les PNN apparaissent comme d'importants composants des voies régulatrices et effectrices des systèmes immunitaires inné et adaptatif. D'ailleurs, les patients présentant des déficiences congénitales au niveau des neutrophiles souffrent d'infections sévères, souvent fatales, soulignant leur rôle important dans la défense immunitaire. De même, une réponse exacerbée peut conduire à des maladies auto-immunes ou inflammatoires. Alors qu'ils étaient considérés uniquement comme des cellules à courte durée de vie, de nombreuses études ont mis en avant leurs multiples fonctions. Ils sont notamment engagés dans des interactions bidirectionnelles avec différents composants du système immunitaire et sont capables d'en influencer la réponse selon le contexte. De plus, la découverte récente des NETs souligne l'importance du potentiel de nouvelles implications des neutrophiles.

Dans la partie suivante, nous allons aborder le lien entre les PNN et la physiopathologie du choc septique.

5. IMPLICATION DES POLYNUCLEAIRES NEUTROPHILES DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DES SYNDROMES SEPTIQUES

I. PHASE PRO-INFLAMMATOIRE

De par leur rôle central comme première ligne de défense anti-infectieuse, un certain nombre d'études s'est intéressé au rôle des PNN dans la physiopathologie du choc septique (139, 313).

De nombreuses modifications phénotypiques et fonctionnelles des PNN ont essentiellement été rapportées pendant la phase précoce des états septiques sévères. Nous allons détailler ces altérations fonction par fonction.

a) Myélémie

Si on considère les anciennes définitions, le syndrome de réponse inflammatoire systémique s'accompagne d'une augmentation de la production de PNN au sein de la moelle osseuse, parfois décuplée, et le recrutement dans la circulation sanguine de neutrophiles immatures (10, 135). Ainsi, la **présence de PNN immatures** dans le sang périphérique traduisant une activité de la moelle osseuse augmentée a été évaluée dans plusieurs études comme marqueur diagnostique dans le sepsis grâce à différentes techniques (314, 315).

- Proportion de neutrophiles immatures (automate d'hématologie cellulaire)

Ha *et al.* ont comparé dans une étude rétrospective de 184 patients en sepsis, l'intérêt clinique de la proportion de neutrophiles immatures (IG%) mesurée sur un automate d'hématologie cellulaire (Sysmex XE-2100) avec d'autres biomarqueurs (le compte de globules blancs, la protéine C réactive, les lactates et la procalcitonine). L'IG% était capable de discriminer les patients compliqués (sepsis sévère et choc septique) des non compliqués (sepsis) (Odds Ratio 2.53 – p=0.004) en analyse multivariée mais pas la mortalité à 28 jours. Ainsi, l'IG% reflète la sévérité et non la mortalité lors du sepsis (316). Nierhaus *et al.* ont souligné la supériorité du pouvoir discriminant du compte de PNN immatures pour différencier les patients infectés des non infectés par rapport à des marqueurs fréquemment utilisés tels que la protéine C réactive ou l'interleukine-6, et en particulier pendant les premières heures critiques (317). De même, van der Geest *et al.* ont étudié l'intérêt du pourcentage de granulocytes immatures (mesuré à J0, J1 et J3 après la suspicion clinique d'une infection microbienne) dans la prédiction de l'infection. Les infections, bactériémies et choc septiques étaient

vérifiés à J7. Ils ont ainsi mis en avant le pourcentage de granulocytes immatures comme un marqueur utile pour prévenir l'infection, son étendue et sa sévérité chez des patients graves (318).

- Delta neutrophil index (automate d'hématologie cellulaire)

Le *delta neutrophil index* (DN) représente la différence entre les sous-populations de leucocytes identifiées par une réaction cytochimique à la myéloperoxydase et par une analyse des lobules du noyau grâce à un automate d'hématologie cellulaire (ADVIA). Il permet notamment d'obtenir la fraction des granulocytes immatures. Une étude rétrospective de Seok *et al.* avait pour objectif de définir le rôle du DN dans la prédiction du diagnostic et du pronostic chez des patients septiques. Les valeurs médianes du DN étaient de 0% dans le groupe contrôle, 0.8% dans le groupe réponse inflammatoire systémique, 3.4% chez les patients en sepsis et 18.6% pour les patients en sepsis sévère. Les courbes ROC ont également mis en avant que le DN était un meilleur marqueur prédictif du sepsis que la protéine C réactive, avec un cut-off à 2.7%. Enfin, cette étude montre que le DN est significativement plus important chez les patients non-survivants (11.5% vs 4.7%, $p=0.008$) et qu'il constitue un facteur indépendant de prédiction de la mortalité à 28 jours (319). De plus, dans une cohorte de 237 patients avec une suspicion de sepsis, le taux de mortalité des cas présentant un $DN > 40\%$ est plus élevé que chez ceux avec un DN de 5-10% (79% vs 15%, $p<0.05$) (320). Attention néanmoins à la valeur du DN dans les différentes cohortes, il serait pour l'instant difficile d'extrapoler un cut-off éventuel à une nouvelle étude.

- Cytométrie en flux

Guérin *et al.* ont évalué la valeur pronostique sur la mortalité à 28 jours des différentes sous-populations de leucocytes (comprenant les granulocytes immatures) chez des patients en sepsis. Dans cette étude, les PNN immatures étaient caractérisés par un phénotype $CD10^{dim}CD16^{dim}$. Le taux de survie pour les patients sans neutrophiles $CD10^{dim}CD16^{dim}$ était de 99%, 85% avec une sous-population $CD16^{dim}$ et seulement 63% chez les patients présentant les PNN $CD10^{dim}CD16^{dim}$ (8).

b) Neutrophiles circulants

Au-delà du compte de neutrophiles immatures, la **proportion des PNN circulants** au moment du diagnostic peut également être considérée comme un facteur pronostique important dans le choc septique. Le travail de Bermejo-Martin *et al.* chez des patients en choc septique définit un seuil de neutrophiles à $7\,226\text{ cells/mm}^3$. En dessous de ce seuil, le décès survient plus rapidement et surtout le risque de décès est deux fois plus élevé chez ces patients (321). De plus, le **rapport**

neutrophile/lymphocyte (NLR) est un paramètre facilement mesurable à partir d'une formule complète. De nombreuses études en oncologie ont mis en avant sa capacité de prédiction de la sévérité ou de survenue d'évènements indésirables (progression, mortalité) (322-326). Dans un contexte infectieux, il a été démontré que ce ratio était capable de prédire une bactériémie plus précisément que les paramètres de routine. Saliccioli et al. ont réalisé une étude rétrospective sur 5 056 patients (admis en réanimation, sévères mais aucune sélection préalable) en caractérisant le NLR selon des quartiles de ratio. Ils ont retrouvé une association entre une augmentation de la mortalité (à 28 jours et à 1 an) et une augmentation des quartiles de NLR sans sélection des patients. En s'intéressant plus particulièrement aux patients septiques de la cohorte, aucune association significative n'est retrouvée entre le NLR et la mortalité (327). Au cours d'une étude prospective observationnelle sur des patients en choc septique, Riché *et al.* ont montré qu'un NLR bas à l'admission était associé avec un risque plus élevé de mort précoce. De plus, la mort tardive était corrélée avec une augmentation du NLR au cours des 5 premiers jours (328). Par conséquent, que la valeur des PNN soit élevée au sein du NLR (327, 328) ou basse (321), elle peut être associée avec un risque de mortalité accru chez les patients septiques.

c) **Augmentation du CD64**

Les polynucléaires neutrophiles expriment à leur surface un récepteur au fragment constant de l'immunoglobuline G (FcγRI), **CD64**, uniquement lorsqu'ils sont activés. Ainsi, c'est en 1995 que la mesure en cytométrie en flux de l'expression de CD64 à la surface des PNN a été proposée comme marqueur diagnostique d'infection et de sepsis. En effet, de nombreuses caractéristiques intrinsèques en font un marqueur intéressant. CD64 reflète fidèlement les événements physiologiques de la réponse inflammatoire et est fonctionnellement corrélé avec la phagocytose. L'augmentation d'expression du CD64 lors de l'activation du PNN peut aller jusqu'à 5-10 fois le niveau basal, ce qui assure une bonne discrimination. Cette up-régulation se fait également rapidement (4-6h après le contact entre le neutrophile et les cytokines pro-inflammatoires). Elle est également spécifique d'une inflammation systémique, infection ou sepsis (d'autres pathologies peuvent être associées avec une augmentation d'expression du CD64 mais les niveaux d'expression n'atteindront jamais ceux du sepsis). Enfin, l'analyse de CD64 reste simple et abordable. Ainsi, grâce à une sensibilité et une spécificité élevées, il a été évalué dans de nombreuses études en tant que biomarqueur, ou composant de combinaisons de biomarqueurs, dans les infections chez l'adulte et l'enfant (329). A titre d'exemple, dans une étude publiée par Muller Kobold *et al.*, une importante augmentation d'expression du CD64 a été rapportée chez des patients adultes en choc septique

comparés à des volontaires sains (330). La médiane du CD64 des patients est multipliée par 10 alors que le facteur est de 1.5-3.5 pour l'expression sur les monocytes. Des résultats similaires ont été retrouvés chez les enfants et nouveaux nés (331). En effet, le CD64 est de plus en plus étudié comme marqueur diagnostique dans le sepsis néonatal (332, 333). De plus, l'association de niveaux d'expression élevés de CD64 à d'autres biomarqueurs pourrait ajouter une valeur diagnostique intéressante comme suggéré par Gibot *et al.* avec la combinaison CD64 – Procalcitonine et sTREM-1 (*soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1*) dans le diagnostic du sepsis (65).

d) Apoptose

L'apoptose est impliquée dans l'élimination des cellules sénescents et est nécessaire à la résolution de l'inflammation. En plus du phénomène de myélémie, l'absence de régulation de ce processus de mort programmée participe à la physiopathologie du sepsis. En effet, la **survie prolongée** des neutrophiles permet une réponse inflammatoire robuste et protège donc l'hôte d'une manière plus efficace. Cependant, elle est également à l'origine de développement de défaillances d'organes et augmente le risque de mortalité suite à la production continue de radicaux libres. L'exposition des PNN à des médiateurs inflammatoires comme le TNF- α , IFN- γ , G-CSF, GM-CSF ou IL-2 à des composants bactériens aboutit à une apoptose retardée (196, 334-337). De plus, non seulement la survie est allongée mais la fonctionnalité des neutrophiles est conservée (337). Une étude de Keel *et al.* s'intéresse à l'effet des cytokines pro-inflammatoires sur les neutrophiles de volontaires sains et de patients septiques. Leur capacité de retarder l'apoptose des PNN est retrouvée dans les 2 groupes avec cependant une inhibition légèrement moins importante pour les patients. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que leurs PNN sont déjà entrés une première fois en contact avec les cytokines pro-inflammatoires circulantes *in vivo*. Ainsi, ils montrent également que le sérum de patients septiques est capable de retarder l'apoptose des PNN de volontaires sains grâce aux cytokines pro-inflammatoires qu'il contient. En revanche, de manière intéressante, l'addition d'IL-10 permet d'annihiler une partie de ces effets (338). Le MDNA (*myeloid nuclear differentiation antigen*) est clivé par les caspases puis s'accumule dans le cytoplasme, il joue un rôle important dans l'exécution de l'apoptose en favorisant la dégradation protéasomale de MCL1 (339). Lors d'un sepsis, les neutrophiles des patients présentent un défaut de clivage/relocalisation de MDNA aboutissant à une accumulation de MCL1 et à une inhibition de l'apoptose (340). L'accumulation de MCL1 chez les patients septiques est d'ailleurs associée à la réduction d'apoptose des neutrophiles (341).

L'importance du délai d'apoptose des PNN peut d'ailleurs être associée à la sévérité de l'inflammation ou de l'infection. Dans une étude portant sur une cohorte de patients avec des degrés

de sepsis différents et comparés à des volontaires sains, Fialkow *et al.* ont démontré que l'apoptose des neutrophiles est inversement proportionnelle à la sévérité du sepsis (132). De plus, d'après Tamayo *et al.*, dans un groupe de patients en choc septique plus important, l'apoptose est toujours diminuée chez les patients. En revanche, cette diminution n'est pas statistiquement différente chez les non-survivants (342).

e) Adhésion et migration

En conditions normales, la L-sélectine est présente à la surface des neutrophiles. Si les PNN entrent en contact avec un produit pro-inflammatoire ou infectieux (LPS, fMLP), ils s'activent et expriment à leur surface des molécules d'adhésion de forte affinité : les intégrines (CD11b/CD18). Ils se fixent alors aux molécules d'adhésion (I-CAM, V-CAM) et traversent la couche de cellules endothéliales guidés par un gradient de chimioattractants (IL-8) qui se fixent sur les récepteurs correspondants (CXCR1 et CXCR2) (202). De nombreux auteurs tels que Chishti *et al.* mettent en évidence (ici dans une cohorte de patients en choc septique), une augmentation de l'expression du CD11b (136). Une autre étude de Muller Kobold *et al.* sur des patients en sepsis soulignent un lien entre l'expression augmentée du CD11b et la mortalité avec une expression plus importante chez les survivants (330). Néanmoins, d'autres auteurs ne retrouvent pas ces modifications d'expressions comme Martins *et al.*, qui dans leur cohorte de patients en sepsis, sepsis sévère et choc septique, ne reportent pas de différence d'expression pour le CD11b et le CD11c par rapport aux volontaires sains (137).

L'oxyde nitrique est un modulateur important de la migration des neutrophiles. Il agit en inhibant directement les interactions leucocyte-cellule endothéliale en diminuant l'expression d'une part, des intégrines et sélectines et d'autre part, des molécules d'adhésion (343).

Concernant l'expression des récepteurs aux chimiokines, Chishti *et al.* ont montré une diminution de l'expression de CXCR2 jusqu'à 5 jours après le début du choc par rapport à une cohorte de volontaires sains, alors que l'expression de CXCR1 reste inchangée (136). De même, dans une étude de Cummings *et al.* chez des patients en sepsis sévère où une diminution d'expression de 50% de CXCR2 et aucune altération d'expression de CXCR1 sont rapportées. De plus, alors que la réponse à CXCR1 était conservée, les ligands de CXCR2 ne répondaient plus (344). Dans un modèle de CLP (*cecal ligation and puncture*), Trevelin *et al.* ont associé la survenue d'évènements indésirables (mortalité) avec l'activation du TLR9 chez les neutrophiles. TLR9 est un récepteur intracellulaire qui reconnaît la CpG (cytosine-phosphate-guanine) et induit une réponse immunitaire innée via la protéine d'adaptation Myd88 (67). Son activation stimule l'expression de GRK-2 (*G-protein-couple*

receptor kinase 2), à l'origine de la downregulation de CXCR2 (345). Dans un modèle de sepsis polymicrobien, l'IL-33 est capable de prévenir cette downregulation en inhibant GRK-2 (346).

Alors que les méthodes traditionnelles d'étude du chimiotactisme comme les transwell ou les chambres de Boyden sont purement quantitatives et ne révèlent en rien le comportement d'une cellule donnée, Lu et al. ont mis au point une puce microfluidique permettant de retracer la dynamique des PNN en réponse à un stimulant. En effet, ils ont étudié la vélocité de la migration de neutrophiles de patients septiques et de volontaires sains après stimulation par du LPS. Dans leur modèle, la vitesse de migration des PNN était d'une part abaissée chez les patients mais surtout cette diminution était associée à la sévérité du sepsis. Ils ont également montré une diminution d'expression de CXCR2 associée à une augmentation de TLR2 (347).

L'élastase, contenue dans les granules des neutrophiles, est capable de cliver CXCR1 à la surface des neutrophiles. Ce mécanisme est à prendre en compte lors de l'inflammation aigue puisqu'on observe également une diminution d'expression de CXCR2 et donc une réponse à l'IL-8 compromise (344, 348).

PPAR- γ (*peroxisome proliferator-activated receptor- γ*) agit comme un régulateur négatif de la migration des neutrophiles. Il est capable d'inhiber l'activité de facteurs de transcription pro-inflammatoire comme NF- κ B ou STAT6 en entrant en compétition avec leurs cibles habituelles. L'expression de PPAR- γ est augmentée dans le modèle murin de CLP ou chez les patients septiques (349).

Les facteurs libérés lors du sepsis provoquent également une augmentation de la rigidité membranaire des neutrophiles, à l'origine d'une altération de leur déformabilité. Ainsi, les PNN vont rester séquestrés dans les capillaires (notamment au niveau du poumon), et limiter le flux sanguin contribuant aux défaillances multiviscérales (350). On peut également noter que la rigidité membranaire augmente avec la sévérité du sepsis (351).

Enfin, dans une étude de Tavares-Murta *et al.* sur des patients septiques, une suppression de la réponse aux stimuli de fMLP est notée et est d'autant plus importante chez les non-survivants (352).

Au total, il semble que la capacité d'activation et de migration des PNN soit altérée dans la phase précoce du choc septique.

f) Phagocytose

Une fois activés par des produits bactériens ou des médiateurs endogènes, les neutrophiles traversent les cellules endothéliales pour phagocyter et détruire les pathogènes. Les études évaluant

la phagocytose des PNN après un choc septique montrent des résultats divergents. Certaines études observent une phagocytose augmentée des PNN chez les patients en sepsis ou en choc septique lors de la phase précoce (138) en accord avec une augmentation de l'activité des PNN au début du choc. Cependant, d'autres auteurs mettent en évidence plutôt une diminution (353) voire aucune altération de la phagocytose (354). Ces résultats contradictoires pourraient être liés au degré de maturité des PNN au moment de la mesure de cette phagocytose. Par exemple, Taneja *et al.* soulignent une phagocytose inchangée chez des patients en sepsis sévère mais décrivent une différence dans l'activité phagocytaire des neutrophiles en fonction de leur maturité ; les PNN immatures des patients auraient une phagocytose diminuée comparée aux PNN matures. Ainsi, la phagocytose plus importante des neutrophiles matures serait contrebalancée par l'activité phagocytaire moindre des PNN immatures (354). De même, Drifte et al. ont montré une capacité phagocytaire diminuée pour les neutrophiles immatures comparés aux PNN matures chez des patients en sepsis et en SRIS (135).

De plus, les sérines protéases contenues dans les granules des neutrophiles sont capables de cliver les récepteurs du complément CR1 et C5aR. Comme décrits précédemment, ces derniers sont importants pour le chimiotactisme, la dégranulation mais surtout la reconnaissance des cibles opsonisées en vue de leur phagocytose. Lors de l'inflammation, on observe une diminution d'expression de C5aR suite à son activation puis internalisation excessives. Ceci résulte en un défaut de la phagocytose des PNN (355).

g) Métabolisme oxydatif

Le métabolisme oxydatif représente l'un des mécanismes de défense les plus importants pour contrôler une infection bactérienne (199). Nous pouvons supposer que l'augmentation du métabolisme oxydatif est bénéfique au début du choc pour contenir le pathogène, mais la persistance de cette activité élevée peut s'avérer délétère pour l'organisme. Plusieurs études montrent une augmentation de la production d'ERO chez des patients en sepsis, sepsis sévère et choc septique sur des prélèvements précoces. Par exemple, dans des cohortes de patients septiques, Martins *et al.* soulignent une augmentation du métabolisme oxydatif en réponse à différents stimuli (LPS, PMA, fMLP, *S.aureus*) (137, 138). Une étude de Bae *et al.* montre une augmentation du métabolisme oxydatif mesuré à J1 chez des patients en choc septique plus importante chez les survivants (356). De manière intéressante, la production d'ERO et de NO à J0 par les neutrophiles est également augmentée dans une autre cohorte de patients septiques mais cependant elle diminue uniquement chez les survivants à J7 (357).

En lien avec la diminution de leur motilité, cet état d'activation augmentée des PNN pourrait participer au développement de dysfonctions d'organes chez les patients en choc septique puisque les PNN piégés dans les veinules post-capillaires des organes tels que le poumon ou le rein libèreraient leurs granules au niveau de ces sites distants de l'infection initiale et induiraient des dommages tissulaires.

h) NETs

Outre la capacité d'élimination des pathogènes grâce à la phagocytose et au métabolisme oxydatif, l'activation des PNN génère la formation de NETs (224). Alors que la constitution de NETs a été détectée lors d'infections et de sepsis, leur rôle *in vivo* n'est pas clairement défini. Il s'agit d'une arme à double tranchant (358). En effet, le confinement des pathogènes au niveau d'un site localisé d'infection est une fonction importante des NETs mais il peut aussi être délétère pour l'hôte. Ils réduisent l'infection au niveau du site de l'infection et limitent la dispersion du pathogène dans l'organisme mais libèrent ainsi une concentration locale importante de composants antimicrobiens comme les protéases, dans les tissus adjacents, qui peut être à l'origine de dommages tissulaires et de dysfonctions d'organes (228). Les NETs sont souvent associés à des dommages de l'endothélium. D'ailleurs, les cellules endothéliales sont capables d'induire la formation de NETs *in vitro*, se mettant ainsi elles-mêmes en danger (359). De plus, l'interaction entre les PNN et les plaquettes activées lors du sepsis est également à l'origine de la formation de NETs et donc responsable des dommages induits à l'endothélium (360). Alors que le mécanisme reste inconnu, il semblerait que les histones et la MPO, composants critiques des NETs, jouent également un rôle (361, 362). Dans une cohorte de 31 patients septiques, Czaikoski et al. ont souligné une corrélation entre la présence de NETs dans la circulation et l'importance des dysfonctions d'organes évaluée par le score SOFA (363). Hashiba *et al.* ont pourtant démontré que la formation de NETs *in vivo* est moins importante dans des neutrophiles isolés de patients présentant un sepsis par rapport aux PNN de volontaires sains alors que les concentrations plasmatiques d'ADN extracellulaire et d'histones sont plus élevées. De plus, leur capacité à éliminer efficacement *E. coli* grâce aux NETs est inhibée chez les patients ce qui pourrait mettre en avant un désordre fonctionnel des NETs (364). Dans le but d'investiguer l'implication des NETs dans la physiopathologie du sepsis, plusieurs équipes utilisent des DNases recombinantes humaines (rhDNase) qui catalysent l'hydrolyse de l'ADN extracellulaire dans des modèles murins. A titre d'exemple, Meng *et al.* reportent que la déplétion des NETs par l'administration de rhDNase aggrave la pathologie qui suit un sepsis polymicrobien *in vivo* et qu'ainsi, induire la formation des

NETs serait préférable à favoriser leur destruction dans une potentielle approche thérapeutique chez l'homme (365).

i) Conclusion

Lors du sepsis, le nombre de neutrophiles circulants est augmenté avec une proportion importante de PNN immatures au niveau du sang circulant et leur survie est allongée. De plus, les réponses fonctionnelles telles que la phagocytose et le métabolisme oxydatif sont renforcées alors que le chimiotactisme est inhibé. En effet, il y a un défaut dans le recrutement des PNN caractérisé par une incapacité des neutrophiles à migrer vers le site de l'infection combiné à une séquestration inappropriée de ces cellules dans les organes tels que les poumons, le cœur, le foie ou les reins. L'hyperactivation de ces PNN, ainsi qu'une augmentation de leur capacité à produire des espèces réactives de l'oxygène et de leur fonction phagocytaire vont créer un environnement nocif pour les organes voisins. Cette accumulation de neutrophiles dans les tissus participe alors aux dysfonctions d'organes observées dans la physiopathologie des états septiques sévères (139).

Certaines de ces altérations sont représentées dans la **Figure 22**.

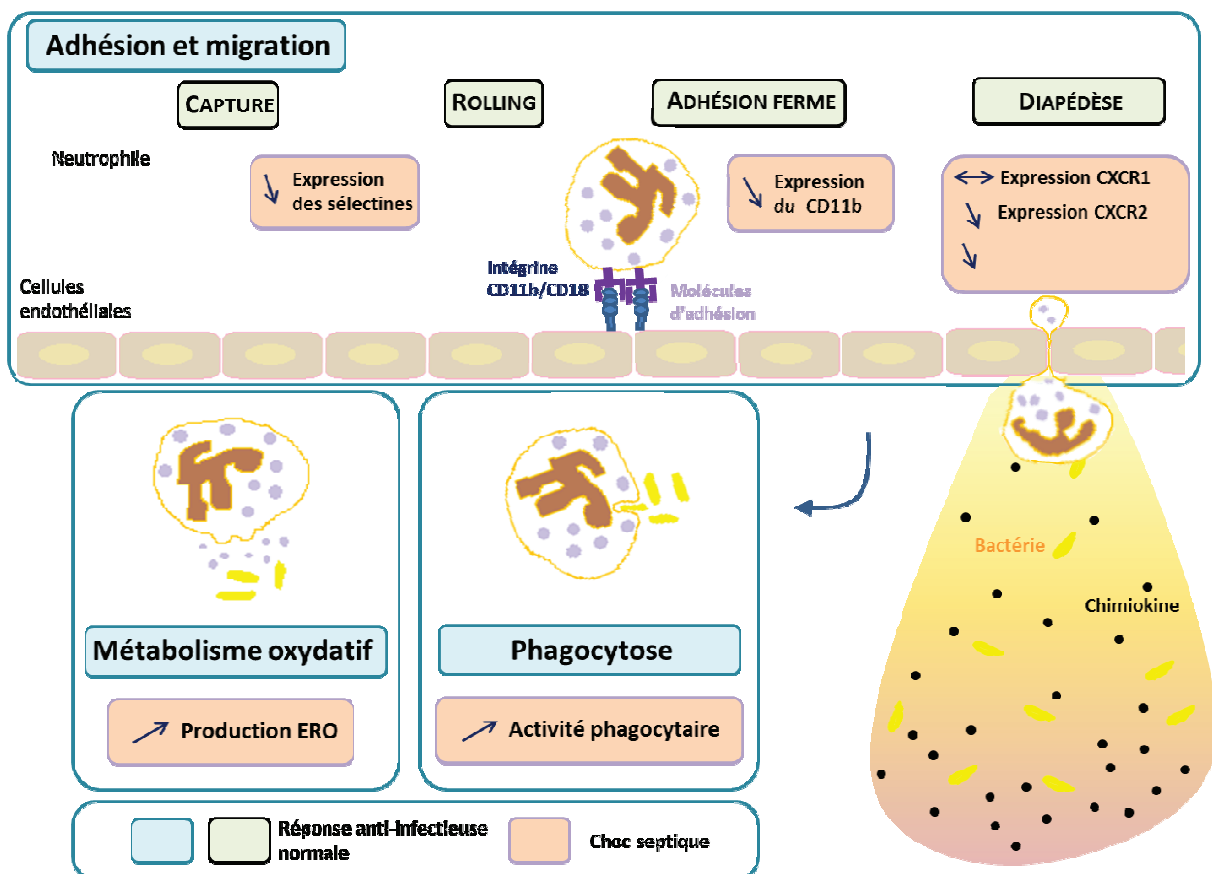


Figure 22 : Rôle physiologique des polynucléaires neutrophiles dans la réponse anti-infectieuse et réponse physiopathologique au cours de la phase pro-inflammatoire du choc septique.
(RFL Mai 2014 n° 462 Demaret *et al.*- Annexe)

II. NEUTROPHILES ET IMMUNOSUPPRESSION POST-SEPSIS

Peu d'études ont été réalisées jusqu'ici sur les altérations phénotypiques et fonctionnelles des neutrophiles au cours de la phase d'immunosuppression post-septique.

Néanmoins, alors que le rôle des PNN semblait limité à leur fonction de sentinelle et de coordinateur de la réponse anti-infectieuse, un nouvel aspect d'immunosuppression a été récemment décrit dans la littérature.

En effet, Gresnigt *et al.* ont souligné la capacité des neutrophiles à dégrader des cytokines par la production d'une élastase et ainsi affaiblir la réponse pro-inflammatoire (6). De plus, Pillay *et al.* ont mis en évidence une sous-population de neutrophiles présentant des propriétés immunosuppressives et un phénotype distinct dans un modèle d'endotoxémie humaine (5). Trois heures après l'injection de LPS par voie intraveineuse à des volontaires sains, plusieurs sous-populations de PNN sont apparues distinctement et notamment des neutrophiles présentant un phénotype CD16^{bright}CD62L^{dim} capables d'inhiber la prolifération des lymphocytes T. Ceci grâce à la formation d'une synapse immunologique entre le neutrophile et le lymphocyte par l'intermédiaire de Mac-1 (CD11b/CD18) et à la libération de faibles quantités de peroxyde d'hydrogène au niveau local. Cette sous-population est confrontée morphologiquement et phénotypiquement à une sous-population de PNN immatures CD16^{dim}CD62L^{dim} qui ne présente pas les mêmes fonctions immunosuppressives. Ces différentes sous-populations sont également retrouvées dans une petite cohorte de patients polytraumatisés graves. De plus, dans une étude ultérieure réalisée par la même équipe, la sous-population CD16^{bright}CD62L^{dim} présentait des propriétés d'adhésion altérées, facilitant la migration de ces cellules aux autres localisations tissulaires plutôt qu'au niveau du site de l'inflammation (140). Cette même équipe a ensuite montré que l'administration de GM-CSF et d'IFN- γ induit un changement dans la composition des neutrophiles en faveur d'un profil anti-inflammatoire en augmentant la proportion de PNN CD16^{bright}CD62L^{dim} avec une diminution du nombre total de neutrophiles (366). En complément, de Kleijn *et al.* ont mis en évidence l'intérêt de stimuler des PNN avec de l'IFN- γ dans le but d'acquérir des fonctions immunosuppressives via le récepteur co-inhibiteur PD-1. En effet, la stimulation des neutrophiles avec l'IFN- γ favorise l'expression de PD-L1 à leur surface et permet ainsi l'inhibition de la prolifération lymphocytaire (367).

A la suite de ces travaux, deux équipes ont étudié l'aspect immunosuppresseur des neutrophiles chez des patients en choc septique. Une étude de Darcy *et al.* met en avant la présence de PNN exprimant l'arginase chez des patients en sepsis et choc septique, corrélée avec la sévérité de la pathologie. Ces neutrophiles-MDSC sont capables d'inhiber les fonctions des lymphocytes T (division, prolifération) et contribuent ainsi à leurs dysfonctions lors du sepsis, grâce au métabolisme de la L-arginine (7). Alors que Guérin *et al.* soulignait la présence de granulocytes CD10^{dim}CD16^{dim} associée à la prédiction d'une détérioration du sepsis, ils ont également identifié au sein de cette population, des MDSC CD14^{neg}CD24^{pos} capables d'inhiber les lymphocytes T en co-culture. De plus, cette population était associée avec une lymphopénie des T CD3+ et T CD4+ (8).

Considérant leur dramatique expansion dans ce contexte et leur action immunosuppressive, les MDSC pourraient être impliquées dans les effets délétères observés lors du sepsis. Une association entre les sous-populations de neutrophiles immatures/immunosuppresseurs et ces cellules mérite amplement d'être investiguée.

6. CONCLUSION

Les polynucléaires neutrophiles sont considérés comme les sentinelles de l'immunité grâce à leur rôle de cellules phagocytaires et leur potentiel antimicrobien. Ils ont également un rôle central dans l'immunité en échangeant constamment avec les cellules dendritiques, macrophages et lymphocytes au moyen des cytokines. Ils occupent donc une place importante dans la physiopathologie des états septiques sévères. Les études évaluant le rôle des PNN chez des patients de réanimation rapportent un recrutement important de PNN immatures et des neutrophiles plutôt « hyperactivés » pendant la phase précoce pro-inflammatoire du choc et un rôle potentiel de ces cellules dans le développement de défaillances d'organes post-choc septique. Néanmoins, l'article de Pillay *et al.* apporte une nouvelle lumière sur la potentielle implication des PNN dans l'immunosuppression du choc septique (5). De plus, cet article est conforté par d'autres études subséquentes chez des patients septiques (7, 8).

Un travail sur les PNN m'a alors été confié. Il s'agissait de l'étude exhaustive de la fonctionnalité des neutrophiles chez des patients en choc septique pendant la phase immunosuppressive, jusqu'ici peu abordée. Nous avons choisi d'en faire l'axe principal de présentation de nos travaux personnels.

A travers l'étude des neutrophiles, ce sont les mécanismes qui régissent l'équilibre inflammation/immunosuppression, pierre angulaire de la physiopathologie du choc septique, qui pourraient être mieux compris et ainsi offrir de nouvelles perspectives thérapeutiques dans un contexte clinique toujours caractérisé par une très lourde mortalité.

TRAVAUX DE RECHERCHE

PRESENTATION DU PROJET DE THESE

Les états septiques, première cause de mortalité en service de réanimation, représentent un véritable problème de santé publique. Leur mortalité reste élevée pouvant atteindre 40 à 50 % pour le choc septique, la forme la plus grave. De plus, leur incidence est en constante augmentation. Il est aujourd'hui établi que les patients septiques présentent rapidement un état d'immunodépression marquée. Cette dernière est associée à un risque accru de développer une infection nosocomiale ou de déclencher une réactivation virale. Ceci pourrait induire une mortalité plus élevée. Il paraît donc nécessaire de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans cette phase d'immunosuppression.

D'importantes caractéristiques de cette immunodépression ont déjà été décrites. A titre d'exemples importants, les monocytes/macrophages et cellules dendritiques présentent des altérations fonctionnelles (diminution de la capacité de présentation de l'antigène et de la production de cytokines inflammatoires) tandis qu'une lymphopénie profonde est associée à l'apparition de phénomènes d'épuisement cellulaire affectant les cellules NK et les populations de cellules T (à l'exception des T suppresseurs).

Dans le cadre d'une activité de recherche translationnelle centrée sur le patient, l'objectif de l'équipe vise à explorer en clinique ces mécanismes immunosuppresseurs. En parallèle, un axe important de travail concerne le développement et la standardisation des outils de monitoring en immunologie clinique. J'ai pu participer à la continuité de ces études. Cet investissement est illustré par quatre articles qui ont constitué le socle de mes travaux dans ces domaines. Ils sont présentés brièvement en introduction de mon travail personnel. Les tirés à part de ces articles sont présentés en **Annexe 1**. En parallèle, un travail sur les polynucléaires neutrophiles m'a été confié suite à la publication de données rapportant un rôle suppresseur d'une sous-population particulière de ces cellules (5). A cette date, l'étude des polynucléaires neutrophiles dans la phase tardive du choc septique n'était pas rapportée. Nous avons fait l'hypothèse de leur implication dans l'immunodépression induite par le choc septique. Du fait de la nouveauté de la thématique (au sein du laboratoire et au sein de la littérature de manière plus générale), nous avons choisi d'en **faire l'axe de présentation principal de nos travaux personnels** dans ce document de thèse d'Université. Ceci a donné matière à deux articles présentés *in extenso* dans les pages à venir. Nous les présentons successivement. Ils avaient pour objectif :

- l'étude globale des altérations phénotypiques et fonctionnelles des polynucléaires neutrophiles lors de la phase immunosuppressive du choc septique.

- l'étude transcriptomique (pangénomique) de neutrophiles purifiés de patients en choc septique et la mise en évidence du CD177 comme paramètre le plus altéré.

Enfin, nous avons participé à la rédaction de deux articles didactiques sur ces différents sujets (*i.e.*, développement en cytométrie en flux intracellulaire et implication des polynucléaires neutrophiles dans le choc septique). Ils sont présentés en **Annexe 2**.

1. INTRODUCTION

I. INTER-LABORATORY ASSESSMENT OF FLOW CYTOMETRIC MONOCYTE HLA-DR EXPRESSION IN CLINICAL SAMPLES

Julie Demaret, Alexandre Walencik, Marie-Christine Jacob, Jean-François Timsit, Fabienne Venet, Alain Lepape, and Guillaume Monneret.

Cytometry Part B (Clinical Cytometry) 84B:59–62 (2013)

a) Contexte

La diminution d'expression du HLA-DR à la surface des monocytes mesurée par cytométrie en flux constitue un biomarqueur fiable de l'immunodépression des patients graves de réanimation dans la prédiction d'événements indésirables (infections nosocomiales, mortalité) et de complications du sepsis. En termes de fonctionnalité, les monocytes présentant une faible expression de HLA-DR sont incapables de supporter une réponse pro-inflammatoire face à toute sorte d'agression bactérienne, ni de présenter les antigènes aux lymphocytes T.

b) Description de l'étude

L'objectif de ce présent travail était de tester, au sein d'une étude clinique inter-laboratoires, un protocole standardisé pour la mesure du HLA-DR monocyttaire sur sang total par cytométrie en flux. Les cellules ont été analysées sur différents cytomètres (FC500, Navios, FACS Canto II) dans différents laboratoires (Lyon et Grenoble).

c) Conclusion

Les corrélations entre les résultats étaient excellentes (coefficients de corrélations de Pearson et de corrélations interclasses > 0.98). De plus, les coefficients de variation pour la précision de l'intra-essai variaient entre 1.9 et 3.2%. Ainsi, ce protocole standardisé pour la mesure de l'expression de HLA-DR à la surface des monocytes par cytométrie en flux semble être robuste et pourrait être utilisé dans de futures études cliniques multicentriques.

II. ASSESSMENT OF A NOVEL FLOW CYTOMETRY TECHNIQUE OF ONE-STEP INTRACELLULAR STAINING: EXAMPLE OF FOXP3 IN CLINICAL SAMPLES

Julie Demaret, Julien Saison, Fabienne Venet, Christophe Malcus, Françoise Poitevin-Later, Alain Lepape, Tristan Ferry and Guillaume Monneret.

Cytometry Part B (Clinical Cytometry) 84B:187–193 (2013)

a) Contexte

La cytométrie en flux est un outil puissant qui permet d'isoler et d'étudier les phénotypes et les fonctions de sous populations cellulaires. Cependant, cette technique peut être chronophage, en particulier pour les marquages intracellulaires, rendant son utilisation parfois difficile en routine ou dans des cohortes importantes de patients en recherche clinique. Une nouvelle technique permettant de réaliser les marquages intracellulaires en une étape a récemment été développée (PerFix nc, BeckmanCoulter).

b) Description de l'étude

Compte tenu de l'importance croissante du monitoring des lymphocytes T régulateurs (Treg) en clinique, nous avons focalisé notre attention sur le marquage intracellulaire de FOXP3 - leur facteur de transcription. L'objectif de ce travail était d'évaluer cette nouvelle méthode (PerFix nc) en la comparant avec la technique de référence (e-Bioscience) dans des échantillons cliniques. Les échantillons de sang ont été marqués en parallèle avec les deux méthodes. Les pourcentages de Treg et les moyennes de fluorescence ont été mesurés par cytométrie en flux (Navios, BeckmanCoulter).

c) Conclusion

La bonne corrélation avec la méthode de référence, une meilleure qualité de marquage (le contrôle isotypique n'est plus utile) et un temps de manipulation largement raccourci nous font conclure que cette nouvelle procédure de marquage intracellulaire présente de multiples avantages. Si elle reste à être validée pour d'autres marquages intracellulaires et dans d'autres circonstances cliniques, ces résultats préliminaires sont néanmoins prometteurs quant à son développement futur dans les laboratoires de cytométrie en flux.

III. STAT5 PHOSPHORYLATION IN T CELL SUBSETS FROM SEPTIC PATIENTS IN RESPONSE TO RECOMBINANT HUMAN INTERLEUKIN-7: A PILOT STUDY

Julie Demaret, Guillaume Dupont, Fabienne Venet, Arnaud Friggeri, Alain Lepape, Thomas Rimmelé, Jérôme Morel and Guillaume Monneret.

J Leukoc Biol. 2015 Apr;97(4):791-6.

a) Contexte

Le choc septique est caractérisé par des altérations lymphocytaires associées à une augmentation du risque d'infections nosocomiales et de mortalité. L'interleukine 7 (IL-7), une cytokine indispensable dans la survie des lymphocytes T, est considérée comme une thérapie intéressante pour les patients septiques présentant une lymphopénie sévère.

b) Description de l'étude

L'objectif de ce travail était d'évaluer la réponse des lymphocytes T CD4⁺ à de l'IL-7 recombinante humaine (rhIL-7) *ex vivo* chez des patients en choc septique. L'intensité moyenne de fluorescence de STAT5 phosphorylé (pSTAT5), une molécule clé dans la signalisation de l'IL-7, a été mesurée en sang total, en cytométrie en flux, dans les lymphocytes T CD4⁺FOXP3⁻ et les T CD4⁺FOXP3⁺ (Tregs) après incubation avec des doses croissantes de rhIL-7.

c) Conclusion

L'expression basale (dans les lymphocytes non stimulés) de pSTAT5 était plus importante chez les patients comparés aux contrôles sains. Pourtant, le niveau maximum d'activation en réponse à la plus forte dose de rhIL-7 était similaire dans les deux groupes. De manière intéressante, de faibles doses de rhIL-7 étaient capables d'activer préférentiellement les lymphocytes T CD4⁺FOXP3⁻ par rapport aux Tregs dans la cohorte des patients. De plus, les non-survivants présentaient une diminution de l'expression de pSTAT5. Ainsi, cette étude pilote est la première, à mettre en avant, chez des patients en choc septique, l'intérêt de la mesure de l'expression de pSTAT5 en sang total, en réponse à rhIL-7. Une telle méthode pourrait représenter un outil biologique innovant en pratique clinique quotidienne pour monitorer la réponse pharmacologique des cytokines à la suite de l'administration de biothérapies dans différents contextes.

IV. ELEVATED PLASMATIC LEVEL OF SOLUBLE IL-7 RECEPTOR IS ASSOCIATED WITH INCREASED MORTALITY IN SEPTIC SHOCK PATIENTS

Julie Demaret, Astrid Villars-Méchin, Alain Lepape, Jonathan Plassais, Hélène Vallin, Christophe Malcus, Françoise Poitevin-Later, Guillaume Monneret and Fabienne Venet.

Intensive Care Med (2014) 40:1089–1096

a) Contexte

Les thérapies immuno-adjuvantes sont désormais proposées afin de traiter des patients en choc septique développant une immunodépression. Néanmoins, il est nécessaire d'identifier les patients à haut risque pour qui ce traitement serait le plus bénéfique. Un biomarqueur de la réponse immunitaire à une infection devrait permettre au clinicien 1/ d'identifier les patients les plus sévères (risque important de développement d'infections nosocomiales secondaires ou de mortalité), 2/ de stratifier les patients avant l'initiation d'une thérapie ciblée, 3/ de suivre la réponse au traitement.

b) Description de l'étude

Sachant que l'interleukine 7 (IL-7) est considérée comme un candidat intéressant dans le traitement du choc septique, nous avons évalué l'association entre l'augmentation de la concentration plasmatique du CD127 soluble (CD127s, chaîne alpha du récepteur de l'IL-7) mesurée par ELISA et la mortalité après un choc septique.

c) Conclusion

Une augmentation de la concentration plasmatique de CD127s a permis d'identifier un groupe de patients en choc septique à risque plus important de décès. Après la confirmation de ces résultats dans une cohorte plus importante, ce biomarqueur pourrait présenter un intérêt dans la stratification des patients pour de prochains essais cliniques.

2. ETUDE DES NEUTROPHILES

I. MARKED ALTERATIONS OF NEUTROPHIL FUNCTIONS DURING SEPSIS-INDUCED IMMUNOSUPPRESSION

Julie Demaret, Fabienne Venet, Arnaud Friggeri, Marie-Angélique Cazalis, Jonathan Plassais, Laurent Jallades, Christophe Malcus, Françoise Poitevin-Later, Julien Textoris, Alain Lepape, and Guillaume Monneret.

J Leukoc Biol. 2015 Dec;98(6):1081-90

a) Contexte

Les polynucléaires neutrophiles (PNN) sont indispensables à la défense contre les micro-organismes, grâce à leur rôle de sentinelle, ils constituent la première ligne de défense du système immunitaire inné. Néanmoins, peu d'études ont été réalisées jusqu'ici sur les altérations phénotypiques et fonctionnelles des neutrophiles lors de la phase immunosuppressive du choc septique.

b) Description de l'étude

L'objectif de ce travail était de réaliser, pour la première fois, une étude globale des altérations des neutrophiles pendant la phase immunosuppressive du choc grâce à des approches phénotypiques et fonctionnelles sur une cohorte de patients prélevés à J3-4 et J6-8 après le début du choc versus des volontaires sains. De plus, une potentielle association entre ces dysfonctions et la survenue d'évènements indésirables a été vérifiée.

c) Conclusion

Cette étude a permis de mettre en évidence une diminution de la capacité des PNN à être recrutés au niveau du site de l'infection, une diminution de la production de composés bactéricides ainsi qu'une activation et une phagocytose inchangées chez les patients en choc septique lors de la phase immunosuppressive par rapport à des volontaires sains. Nous avons également pu souligner la présence, chez les patients septiques, de sous-populations de PNN présentant des différences morphologiques. Ces altérations semblent ainsi contribuer à l'état général d'immunosuppression décrit chez les patients en choc septique. Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives dans les

mécanismes favorisant le développement d'infections nosocomiales après un choc. Ils nécessitent néanmoins d'être corroborés dans une cohorte plus importante ou dans des modèles animaux.

Marked alterations of neutrophil functions during sepsis-induced immunosuppression

Julie Demaret,^{*,†} Fabienne Venet,^{*,†} Arnaud Friggeri,[‡] Marie-Angélique Cazalis,[§]
Jonathan Plassais,[§] Laurent Jallades,[¶] Christophe Malcus,^{*} Françoise Poitevin-Later,^{*}
Julien Textoris,^{§,||} Alain Lepape,[‡] and Guillaume Monneret^{*,†,1}

^{*}Immunology Laboratory, [†]bioMérieux Joint Research Unit, [‡]Hematology Laboratory, and [§]Intensive Care Units, E. Herriot Hospital, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France; [¶]University Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France; and ^{||}Intensive Care Units, Lyon-Sud Hospital, Hospices Civils de Lyon, Pierre-Bénite, France

RECEIVED APRIL 22, 2015; REVISED JULY 6, 2015; ACCEPTED JULY 11, 2015. DOI: 10.1189/jlb.4A0415-168RR

ABSTRACT

Severe septic syndromes deeply impair innate and adaptive immunity and are responsible for sepsis-induced immunosuppression. Although neutrophils represent the first line of defense against infection, little is known about their phenotype and functions a few days after sepsis, when the immunosuppressive phase is maximal (i.e., between d 3 and 8). The objective of the present study was to perform, for the first time, a global evaluation of neutrophil alterations in immunosuppressed septic patients (at d 3–4 and d 6–8) using phenotypic and functional studies. In addition, the potential association of these parameters and deleterious outcomes was assessed. Peripheral blood was collected from 43 septic shock patients and compared with that of 23 healthy controls. In the septic patients, our results highlight a markedly altered neutrophil chemotaxis (functional and chemokine receptor expressions), oxidative burst, and lactoferrin content and an increased number of circulating immature granulocytes (i.e., CD10^{dim}CD16^{dim}). These aspects were associated with an increased risk of death after septic shock. In contrast, phagocytosis and activation capacities were conserved. To conclude, circulating neutrophils present with phenotypic, functional, and morphologic alterations a few days after sepsis onset. These dysfunctions might participate in the deleterious role of sepsis-induced immunosuppression. The present results open new perspectives in the mechanisms favoring nosocomial infections after septic shock. They deserve to be further investigated in a larger clinical study and in animal models recapitulating these alterations. *J. Leukoc. Biol.* 98: 000–000; 2015.

Abbreviations: AA750 = allophycocyanin-Alexa Fluor 750, CI = confidence interval, ECD = PE-Texas Red, GRO- α = growth-related oncogene- α , ICU = intensive care unit, IQR = interquartile range, MFI = mean fluorescence intensity, MDSCs = myeloid-derived suppressor cells, mHLA-DR = monocyte HLA-DR expression, PB = Pacific Blue, ROS = reactive oxygen species, SAPS II = simplified acute physiologic score II, SSC = side scatter, SOFA = sequential organ failure assessment, T_{reg} = regulatory T cells

The online version of this paper, found at www.jleukbio.org, includes supplemental information.

Introduction

Septic syndrome represents the major cause of death among critically ill patients worldwide, constituting an important public health problem. Despite an overall modest decline in the proportional mortality, the total number of patients dying of sepsis is greater than in the past [1]. The incidence of sepsis is still increasing, reaching 10–30% of ICU admissions. A recent epidemiologic study also highlighted that mortality remains >30% for septic shock patients in Europe and the United States [2].

Septic syndromes deeply perturb immune homeostasis and impair innate and adaptive immunity. Both pro- and anti-inflammatory responses are initially induced in septic shock patients, with the secondary occurrence of sepsis-induced immunosuppression. The intensity and duration of this immunosuppressive phase are associated with increased mortality and nosocomial infections [3].

Among leukocytes, neutrophils are crucial components of the innate immune response and the first line of defense against infection. They also play a central role in the initiation of adaptive immune responses by secreting cytokines [4]. Thus, for the past decades, the role of neutrophils in the early phase after the onset of injury has been widely studied. An overwhelming activation of granulocytes and a reduced motility is thought to participate in the development of organ damage after sepsis, notably because of the massive production by neutrophils of ROS and proinflammatory cytokines at sites distant from the initial infection [5, 6]. Little is known about their phenotype and functions during the phase of sepsis-induced immunosuppression. However, an immunosuppressive neutrophil subset has recently been reported in the blood of volunteers challenged with LPS [7]. Pillay et al. [7] highlighted that suppression of T-cell function can be accomplished by a subset of human neutrophils that can be systemically induced in response to acute inflammation. In addition, they showed that these cells can

1. Correspondence: Immunology Laboratory, E. Herriot Hospital, Hospices Civils de Lyon, Pavillon E, 5 Place d'Arsonval, 69437 Lyon Cedex 03, France. E-mail: guillaume.monneret@chu-lyon.fr

be detected in the peripheral blood of few patients after trauma [7].

Considering the lack of information available on neutrophil status during sepsis-induced immunosuppression and given these new elements on neutrophil suppressive functions, our aim was to investigate neutrophil alterations during the sepsis-induced immunosuppressive phase. The objective of the present study was to perform, for the first time, a global evaluation of the neutrophil alterations in immunosuppressed septic patients using phenotypic and functional studies. In addition, we assessed the potential association between these parameters and deleterious outcomes.

MATERIALS AND METHODS

Study population

Septic shock was defined according to the diagnostic criteria of the American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine [8] by an identifiable site of infection, persisting hypotension despite fluid resuscitation requiring vasopressor therapy, and evidence of a systemic inflammatory response manifested by ≥ 2 of the following criteria: (a) temperature $>38^{\circ}\text{C}$ or $<36^{\circ}\text{C}$; (b) heart rate >90 beats/min; (c) respiratory rate >20 breaths/min; and (d) white blood cell count $>12,000/\text{mm}^3$ or $<4000/\text{mm}^3$. The exclusion criteria were age <18 yr and the presence of aplasia or immunosuppressive disease (e.g., HIV infection). During the follow-up period, clinical and biologic data were collected. The data collection included demographic characteristics (age, gender); admission category (elective or emergency surgery, medicine); referral pattern (community-, hospital-, or ICU-acquired septic shock); microbiological findings (infection characteristics [e.g., source and identified microorganisms]), and comorbidities (e.g., chronic obstructive pulmonary disease, chronic heart failure, malignant diseases, diabetes). Two clinical scores were recorded: the initial severity assessed by the SAPS II (range 0–194) and the SOFA score (range 0–24) at admission. Mortality was defined as death occurring within 28 d after the onset of shock. Secondary ICU-acquired infections were defined according to European definitions of the European Centre for Disease Prevention and Control.

This work was a part of a global study on ICU-induced immune dysfunctions. Our institutional review board for ethics (Comité de Protection des Personnes) approved the study and waived the need for patient informed consent, because the study was observational and biomarker expression was measured using residual blood after completion of the routine follow-up period. The present study is also registered at the French Ministry of Research and Teaching (DC-2008-509) and recorded at the Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés.

Forty-three septic shock patients admitted to the ICUs of the Lyon-Sud University Hospitals (France) were prospectively enrolled in our study. Peripheral blood was collected in sampling tubes containing EDTA or heparin at d 3 or 4 (d3–4) and d 6–8 (d6–8) after the onset of shock. Only patients alive at d 3 or 4 after the onset of shock were considered. The onset of septic shock was defined as the beginning of vasopressor therapy. Considering the complexity of the functional, morphologic, and transcriptomic studies and the limited available amount of blood, it was not possible to perform all experiments on every patient; thus, the sample size for each experiment has been provided in the text or figures. Reference values and control samples were obtained from a cohort of 23 healthy volunteers who had provided informed consent (median age 36 yr; 15 women, 8 men).

To confirm that the patients had presented with immunosuppression, mHLA-DR was assessed by flow cytometry (FC500; Beckman-Coulter, Miami, FL, USA) at d3–4, as previously described [9]. An mHLA-DR nadir is known to occur at this time point [10]. The results are expressed as the number of antibodies bound per cell. The absolute lymphocyte counts and percentages of regulatory T_{reg} at d3–4 are also reported [11].

Phenotypic study

The PerFix-No Centrifuge Assay Kit (Beckman-Coulter, Hialeah, FL, USA) was used with 7-color flow cytometry immunophenotyping. Staining of fresh EDTA whole blood was performed using FITC-labeled anti-myeloperoxidase, PE-labeled anti-lactoferrin, ECD-labeled anti-CD62L, PE-cyanine7-labeled anti-CD10, AA750-labeled anti-CD11b, PB-labeled anti-CD16, and Krome Orange-labeled anti-CD14. All reagents were purchased from Beckman-Coulter. According to the manufacturer's instructions, the samples were first fixed with the fixative reagent and incubated for 15 min. Next, the aliquots were simultaneously permeabilized using the permeabilizing reagent and stained with fluorochrome-conjugated antibodies. After 35 min of incubation, the samples were fixed using a solution containing formaldehyde. Cytometry analyses were performed on a Navios flow cytometer using the Navios software (Beckman-Coulter). Neutrophils were identified on a forward light scatter/SSC histogram and a CD14/SSC plot was used to exclude monocytes. Neutrophil subsets were eventually sorted using a FACSARIA II (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), and cytopins were made based on CD10, CD16, and CD62L staining. At the end of the cell sorting, microscope slides were observed using the May-Grünwald-Giemsa staining protocol. Fluorescence thresholds to assess percentages and sorting of granulocyte subsets were set up by comparison with healthy controls such that $>99\%$ of the control samples exhibited CD10^{bright}, CD16^{bright}, or CD62L^{bright} neutrophils.

The following antibodies were also used to study chemokine receptors: PE-labeled anti-CXCR2, allophycocyanin-labeled anti-CXCR1, and PB-labeled anti-CD16 (Beckman-Coulter). After 30 min of incubation with the antibodies, RBCs were lysed using FACS Lysing Solution (BD Biosciences). Samples were run on a Navios flow cytometer (Beckman-Coulter). The results are expressed as the MFI for each of the parameters studied.

Activation capacity

Fresh EDTA whole blood was stimulated with increasing IL-8 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) or fMLP (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) doses at 37°C in a water bath for 15 min. Staining with ECD-labeled anti-CD62L and AA750-labeled anti-CD11b (Beckman-Coulter) was performed during 30 min after RBC lysis (FACS Lysing Solution, BD Biosciences). The samples were analyzed on a Navios (Beckman-Coulter). The MFI of CD62L and CD11b was examined for each condition.

The PerFix EXPOSE reagents from Beckman-Coulter were used to study STAT5 phosphorylation. Staining of fresh EDTA whole blood was performed using PE-labeled antiphosphorylated STAT5 and allophycocyanin-labeled anti-CD14 (Beckman-Coulter) antibodies. The blood samples were first stimulated with increasing recombinant human GM-CSF (ImmunoTools, Friesoythe, Germany) concentrations at 37°C in a water bath for 15 min. The samples were fixed for 10 min using a fixative reagent. Aliquots were then permeabilized using the permeabilizing reagent (which also lyses RBCs) and incubated for 5 min at 37°C in a water bath. The samples were centrifuged, and intracellular staining was performed with a mixture of staining reagent, including fluorochrome-conjugated antibodies for 30 min. After a last washing step, the samples were fixed using a solution containing formaldehyde. Samples were run on a Navios flow cytometer (Beckman-Coulter). The MFI of phosphorylated STAT5 is reported in neutrophils.

Chemotaxis

The Migratest Kit (Glycotope Biotechnology, Berlin, Germany) allows the determination of the number of neutrophils that have migrated through cell culture inserts toward a concentration gradient of the chemoattractant, similar to the Boyden chamber technique. The chemoattractants used are fMLP (10^{-8} M; Sigma-Aldrich), IL-8 (10 ng/ml, R&D Systems), and GRO- α (10 ng/ml; R&D Systems), all diluted in incubation buffer. The neutrophils were isolated from heparinized whole blood by spontaneous sedimentation over leukocyte separation medium containing dextran and placed into cell culture inserts. Chemotaxis was conducted at 37°C (heat chamber) toward a gradient of chemoattractant compared with a control of incubation buffer. The cells were then stained with FITC-labeled anti-CD62L and counting beads. Just before flow cytometry analysis on a Navios flow cytometer

(Beckman-Coulter), a special vital DNA dye was added. The main readout in this experiment was the ratio of emigrated neutrophils in a stimulated well to the emigrated neutrophils in a control well (incubation buffer).

Phagocytosis

Quantitative determination of neutrophil phagocytosis (ingestion of bacteria) was assessed using the Phagotest Kit (Glycotope Biotechnology). It measures the percentage of phagocytes that have ingested bacteria and their activity (number of bacteria per cell). Heparinized whole blood was incubated with the FITC-labeled *Escherichia coli* at 37°C (water bath); a negative control sample remained on ice. Phagocytosis was stopped by placing the samples on ice and adding a quenching solution. This solution allows the discrimination between attachment and internalization of bacteria by quenching the FITC fluorescence of surface bound bacteria, leaving the fluorescence of internalized particles unaltered. After 2 washing steps, the erythrocytes were lysed. The DNA staining solution, which was added just before flow cytometry analysis, excludes aggregation artifacts of bacteria or cells. The MFI (number of ingested bacteria) in neutrophils was then analyzed on a Navios flow cytometer (Beckman-Coulter).

Oxidative burst

The FagoFlowEx Kit (Exbio Antibodies, Vestec, Czech Republic) was used to measure the oxidative burst of the neutrophils after their stimulation with *E. coli* in heparinized whole blood. After the ingestion of bacteria, phagocytes activate NADPH oxidase, producing reactive oxidative intermediates that can oxidize dihydrorhodamine 123 into fluorescent rhodamine 123, which is detected by flow cytometry. PMA was used as a positive control. Heparinized whole blood was stimulated with either *E. coli* or PMA, or was nonstimulated (negative control), before adding the substrate. After an incubation of 20 min at 37°C (water bath), RBCs were lysed, and samples were analyzed on a Navios flow cytometer (Beckman-Coulter) quickly after the last washing step. The stimulation index was measured; it is the MFI ratio of positive neutrophils of a stimulated sample (*E. coli*) to negative neutrophils of a negative control. According to the manufacturer's instructions, it can be used to compare the respiratory burst intensity between blood samples.

Statistical analysis

The nonparametric Mann-Whitney *U* test was used to compare results between the septic patients and healthy volunteers. The nonparametric Wilcoxon paired test was performed to evaluate the evolution over time within a group. The receiver operating characteristic curves were established, and the best cutoff values were determined using the Youden index. Kaplan-Meier survival curves were obtained after patient stratification according to these values. Differences in survival between groups were evaluated using the log-rank test. To determine the variables associated with death, uni- and multivariate logistic regression analyses were performed, and odds ratios were estimated, with the associated *P* values. The parameters were not stratified for logistic regression analyses. We performed statistical analyses using SPSS, version 19.0 (SPSS, Chicago, IL, USA), and GraphPad Prism, version 5.03 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

RESULTS

Clinical and biologic characteristics of the cohort

A total of 43 septic shock patients were included in the present study. The clinical and biologic characteristics for this cohort are listed in **Table 1**. Among the patients with septic shock, the median value for the SAPS II and SOFA scores at the onset of shock were 67 (IQR 51–79) and 11 (IQR 9–12), respectively. Of the 43 patients with septic shock, 8 died within 28 d (mortality 19%), and secondary nosocomial infections were diagnosed in 13 (30%). At d3–4, the septic shock patients presented with the

previously described characteristics of injury-induced immunosuppression, with reduced mHLA-DR, low CD4⁺ lymphocyte count, and an increased percentage of circulating T_{reg} cells compared with normal values.

Number of circulating neutrophils

As presented in **Table 1**, the number of circulating neutrophils was increased in the septic shock patients compared with the normal values ($2.5\text{--}7.5 \times 10^9/\text{L}$). A significant increase in the neutrophil count ($P < 0.05$) was noted in the nonsurvivors compared with the survivors at d6–8. However, this significance was lost on univariate analysis (detailed in the following sections).

Neutrophil immaturity—subset analysis

At d3–4 and d6–8, significantly decreased CD10 expression was measured on the neutrophils from septic patients compared with those from healthy volunteers. Furthermore, in paired samples, a slight increase over time was observed between d3–4 and d6–8 (**Fig. 1A**). The same trend was noted regarding CD16 expression, with decreased expression in septic patients compared with controls (**Fig. 1B**). Therefore, patients with septic shock exhibited increased proportions of immature CD10^{dim}CD16^{dim} granulocytes. For several patients, immature CD10^{dim}CD16^{dim} neutrophils were FACS sorted and stained with May-Grünwald-Giemsa. The morphology of this subset was compared with CD10^{bright}CD16^{bright}, considered mature neutrophils (**Fig. 1D**). Immature CD10^{dim}CD16^{dim} granulocytes appeared as band cells (**Fig. 1E**).

In addition, as described by Pillay et al. [7], a potentially immunosuppressive CD16^{bright}CD62L^{dim} neutrophil subset was studied. At d3–4 and d6–8, CD62L expression was lower in neutrophils from patients with sepsis than in those from healthy subjects (**Fig. 1C**). In addition, and as observed by Pillay et al. [7] and illustrated in **Fig. 1F**, CD16^{bright}CD62L^{dim} neutrophils displayed a hypersegmented nuclear morphology. However, even if this subset was detected in some patients' samples, it was not systematically present, and its frequency was low.

Activation capacity

Activation capacity in response to stimuli was measured by studying the differences in CD62L and CD11b expression after stimulation. In response to increasing doses of fMLP or IL-8, we observed a similar decrease in CD62L expression for septic patients at d3–4 and healthy volunteers (**Fig. 2A and B**). We also observed increased CD11b expression in patients with septic shock (d3–4) and healthy controls when stimulated with increasing doses of fMLP or IL-8 (**Fig. 2C and D**). The same results were obtained when studying CD11b and CD62L expression in septic patients at d6–8 (data not shown).

STAT5 is a transcription factor for which phosphorylation is a key marker of cellular activation. We measured STAT5 phosphorylation to assess neutrophil activation in response to increasing concentrations of GM-CSF. We observed increased STAT5 phosphorylation in response to increasing doses of GM-CSF in both patients at d3–4 and healthy donors (**Fig. 2E**). The same results were obtained in septic patients at d6–8 (data not shown).

Most importantly, no difference was noted between patients and healthy volunteers in both experiments (**Fig. 2**).

TABLE 1. Demographic, clinical, and immunologic data for patients with septic shock

Parameter	Septic shock patients			P value
	Overall (n = 43)	Survivors (n = 35; 81%)	Nonsurvivors (n = 8; 19%)	
Age at admission (yr)	70 (65–80)	67 (62–79)	80 (73–84)	0.008
Male	29 (67)	22 (63)	7 (88)	0.240
Main admission category				
Medical	21 (49)	18 (51)	3 (38)	0.698
Surgery	22 (51)	17 (49)	5 (62)	
Comorbidities (n)				
0	13 (30)	13 (37)	0	0.082
≥1	30 (70)	22 (63)	8	
SAPS II	67 (51–79)	66 (45–79)	71 (66–80)	0.190
SOFA score	11 (9–12)	12 (9–15)	11 (9–12)	0.413
McCabe score				
1	28 (65)	25 (71)	3 (38)	0.104
2	15 (35)	10 (29)	5 (62)	
3	0	0	0	
28-d Nonsurvivors	8 (19)			
Infection diagnosis				
Microbiology	29 (67)	24 (69)	5 (63)	1
Radiology	9 (21)	7 (20)	2 (25)	
Surgery	1 (2)	1 (3)	0	
Microbiologically documented				
Bacilli gram negative	31 (59)	27 (63)	4 (44)	0.457
Cocci gram positive	15 (28)	11 (26)	3 (33)	0.688
Fungi	6 (11)	4 (9)	2 (22)	0.275
Other	1 (2)	1 (2)	0	1
Type of infection				
Community acquired	25 (58)	21 (60)	4 (50)	0.701
Nosocomial	18 (42)	14 (40)	4 (50)	
Site of infection				
Pulmonary	14 (33)	12 (34)	2 (25)	1
Abdominal	15 (34)	12 (34)	3 (38)	
Other	14 (33)	11 (32)	3 (38)	
Secondary nosocomial infection	13 (30)	10 (29)	3 (38)	
Immunologic parameter				
mHLA-DR d3–4 (AB/C)	2528 (1381–5361)	2949 (1464–5361)	1671 (1368–6750)	0.642
mHLA-DR d6–8 (AB/C)	4386 (2712–6333)	4487 (2653–7247)	3300 (2647–4714)	0.269
Absolute CD4+ T cell count (d3–4)	278 (164–402)	285 (165–398)	229 (153–535)	0.913
Percentage of T _{reg} (d3–4)	8.5 (6.1–12.8)	7.8 (5.8–12.5)	9.2 (8.4–16.3)	0.092
Neutrophil count				
d3–4 (10 ⁹ /L)	13.4 (10–21.5)	13 (9–19.7)	16.7 (13.2–32.2)	0.155
d6–8 (10 ⁹ /L)	13.6 (8.6–18.9)	11.8 (7.5–15.5)	29.8 (18.3–38.3)	0.004

Blood samples were obtained from 43 septic shock patients after the onset of shock. Continuous data and biologic parameters are presented as median and IQR (quartile 1 to quartile 3). For clinical parameters, categorical data are presented as number of cases and percentages among the total population. SAPS II and McCabe scores were calculated after admission. SOFA score was measured after 24 h of ICU stay. mHLA-DR expressed as numbers of anti-HLA-DR antibodies bound per monocyte (AB/C; normal value from age-matched healthy volunteers, >15,000 AB/C). Count of CD4+ lymphocytes (cells/ μ l), percentage of T_{reg} and monocyte HLA-DR were measured 3 or 4 d after onset of shock. Neutrophil counts were available for 38 septic patients at d3–4 and 34 at d6–8. Statistical analysis: Mann-Whitney *U* test used for continuous variables and Fisher's exact test for categorical data. AB/C, number of antibodies bound per cell.

Chemotaxis

We also investigated whether the chemotactic response was impaired in patients with septic shock. At d3–4 and d6–8, CD11b expression was decreased in septic patients compared with healthy volunteers (**Fig. 3A**). Regarding the chemokine receptors, CXCR1 and CXCR2, a significant decrease in their expression was noted in patients at d6–8, although a decrease over time was observed between d3–4 and d6–8 (**Fig. 3B and C**). We measured neutrophil migration in response to fMLP, GRO- α , and IL-8. In agreement with the decreased chemokine receptor

expression, septic patients presented with a significantly decreased number of emigrated neutrophils in the stimulated wells at d3–4. The same trend was noted regardless of the chemoattractant used (**Table 2**). Overall, these results showed that the chemotactic response is altered a few days after septic shock.

Phagocytosis

Phagocytosis was evaluated by measuring using flow cytometry the ingestion of fluorescent *E. coli* by neutrophils. No significant

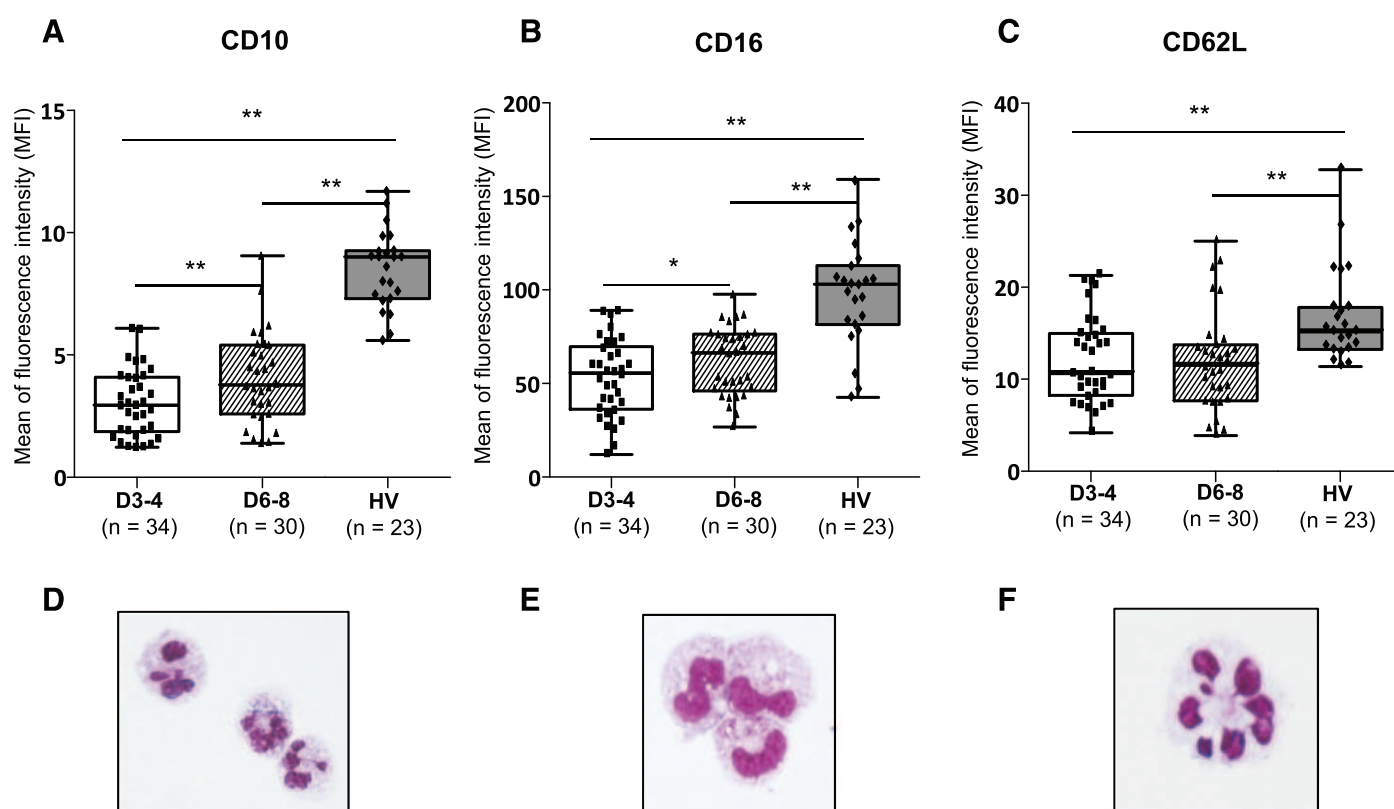


Figure 1. CD10, CD16, and CD62L differential expression in septic shock patients and healthy volunteers. Cell surface expression was measured as the MFI on neutrophils from septic shock patients at d3–4 (white, $n = 34$) and d6–8 (striped, $n = 30$; serial samples) after the onset of shock compared with healthy volunteers (HVs; gray, $n = 23$) for CD10 (A), CD16 (B), and CD62L (C). Subsets were FACS sorted, and cytopins were stained with May-Grünwald-Giemsa. Original magnification $\times 100$. Distinct neutrophil subsets were identified, including mature CD10^{bright}CD16^{bright} neutrophils (D), immature CD10^{dim}CD16^{dim} neutrophils (E), and CD16^{bright}CD62L^{dim} neutrophils (F). The nonparametric Mann-Whitney U test was used to compare the results between groups. The nonparametric Wilcoxon paired test was used to evaluate evolution over time within a group. ** $P < 0.01$. * $P < 0.05$.

differences were observed between patients and controls at either d3–4 or d6–8 (Supplemental Fig. 1).

Bactericidal parameters

The intracellular myeloperoxidase content was significantly decreased in neutrophils from patients with septic shock at d3–4 and d6–8 relative to those from healthy volunteers (Fig. 3D). Similarly, the expression of intracellular lactoferrin was significantly decreased in the septic patients compared with that in the healthy volunteers (Fig. 3E). Finally, we assessed oxidative burst by measuring, using flow cytometry, oxidation of a substrate by NADPH oxidase after ingestion of bacteria. We observed that the stimulation index, as a measure of oxidative burst capacity, was significantly reduced in patients versus controls (Fig. 3F). In paired samples, a significant increase over time was observed between the d3–4 and d6–8 samples. Overall, these results suggest that the production of bactericidal agents is impaired after septic shock.

Logistic regression analysis

Despite the limited number of nonsurvivors ($n = 8$), multivariate analyses were finally performed to test the predictive value on 28-d mortality of nonstratified variables selected on the basis of the univariate analysis results (variables presenting with $P \leq 0.15$; data not shown). Only myeloperoxidase, lactoferrin, CD62L, CD11b, CD10,

and CD16 expression, the percentage of CD10^{dim}CD16^{dim} neutrophils measured at d6–8, and the SAPS II score were included in 2 parameter models for 34 patients (Table 3). Therefore, each multivariate model always included the SAPS II score (calculated from 12 routine physiologic measurements, including age, WBCs, and others) and a biologic parameter measured on neutrophils at d6–8. In these models, lower intracellular expression of myeloperoxidase, lactoferrin, or extracellular CD62L expression measured at d6–8 remained significantly associated with a higher risk of death after septic shock (myeloperoxidase: odds ratio 8.39, 95% CI 1.185–59.441, $P = 0.033$; lactoferrin: odds ratio 1.25, 95% CI 1.019–1.530, $P = 0.032$; CD62L: odds ratio 1.52, 95% CI 1.003–2.307, $P = 0.048$; Table 3). Among these parameters, and even if the results could be considered underpowered, diminished myeloperoxidase expression seemed to appear as the best predictor to identify a group of septic shock patients at high risk of death. Kaplan-Meier survival curves were established after stratification using the calculated thresholds (Youden index – myeloperoxidase d6–8 expression = 3). The survival rates of patients were significantly different when stratified according to myeloperoxidase expression. Patients with higher expression had significantly better survival ($P = 0.040$, log-rank test; Fig. 4).

It is noteworthy that although not found on multivariate analysis, but in accordance with a recent study performed by Guerin et al. [12], the percentage of immature CD10^{dim}CD16^{dim}

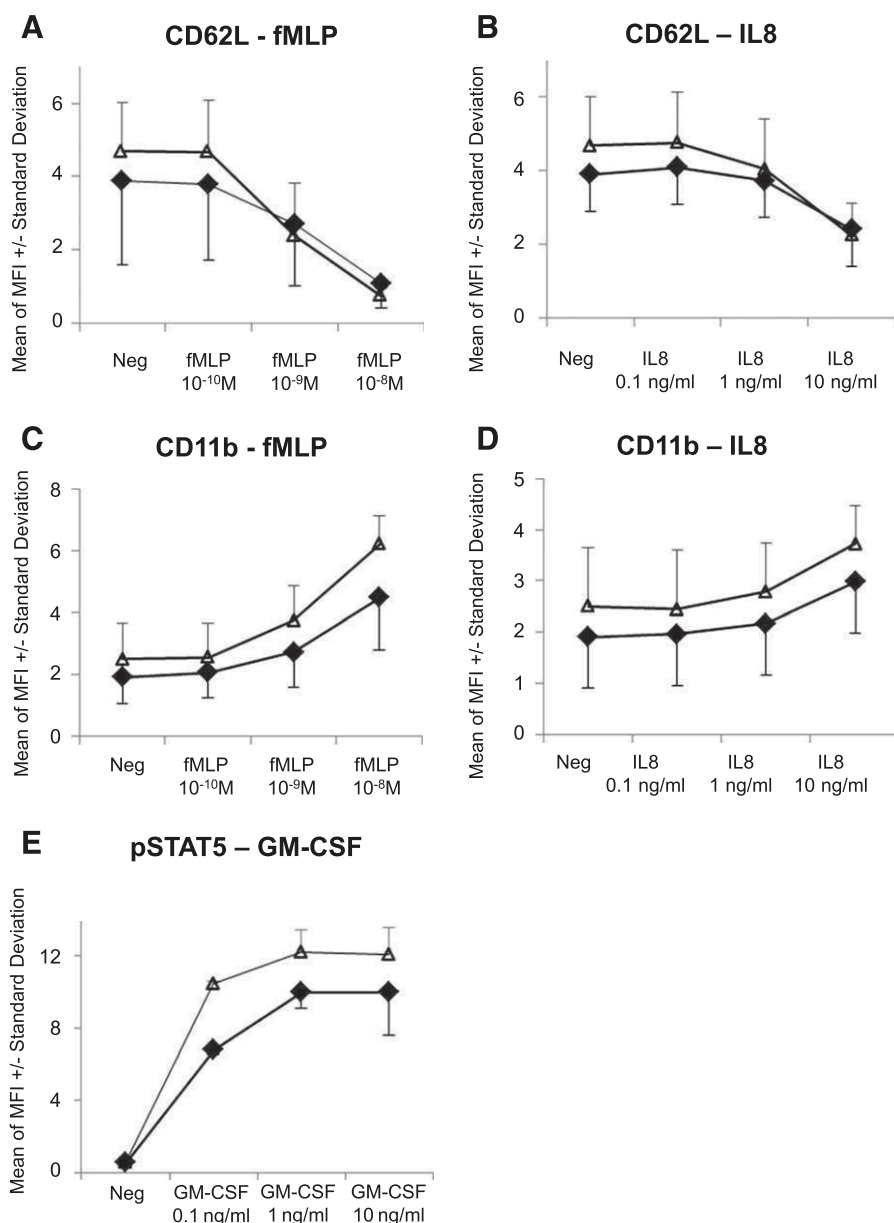


Figure 2. Activation capacity of neutrophils from septic patients and healthy controls. MFI and standard deviations in neutrophils from septic shock patients at d3–4 (black diamonds, $n = 9$) and healthy volunteers (white triangles, $n = 9$) in response to increasing fMLP concentrations for CD62L (A) and CD11b (C) expression and increasing doses of IL-8 for CD62L (B) and CD11b (D) expression. MFI and sd of phosphorylated STAT5 (pSTAT5) expression in neutrophils from septic shock patients at d3–4 (black diamonds, $n = 15$) and healthy volunteers (white triangles, $n = 13$) in response to increasing concentrations of GM-CSF (E).

neutrophils appeared more important in nonsurvivors compared with survivors at d6–8 (survivors: 2.05%, IQR 0.92–6.03; non-survivors: 5.89%, IQR 4.95–25.1; $P = 0.023$; data not shown). We therefore established Kaplan-Meier survival curves after stratification by the Youden index for the percentage of immature granulocytes measured at d6–8 (i.e. 4%). Patients with a lower proportion of CD10^{dim}CD16^{dim} neutrophils had significantly better survival than did patients presenting with a higher percentage ($P = 0.040$, log-rank test; Supplemental Fig. 2).

DISCUSSION

It is now well established that, in parallel with a massive proinflammatory response leading to shock and organ failure, septic patients rapidly develop an immunosuppressive state associated with severe immune dysfunction [13]. In addition, the

intensity and duration of these alterations have been linked to an increased risk of death and the development of ICU-acquired infections [14].

Neutrophils are the most abundant leukocytes providing the first line of host defense against a wide range of infectious pathogens [4]. Therefore, it is no surprise that these cells have a pivotal role in the defense against bacterial infections, including sepsis. In line with this, the role of these cells has been studied at the onset of sepsis pathophysiology. In brief, the recruitment of neutrophils from bone marrow is augmented and their apoptosis is reduced. Moreover, neutrophil oxidative burst and phagocytosis were increased in patients with septic shock but chemotaxis was strongly inhibited. This reduced motility associated with acute activation of neutrophils is believed to play a role in the development of organ damage after sepsis. The extensive production of ROS and proinflammatory cytokines by

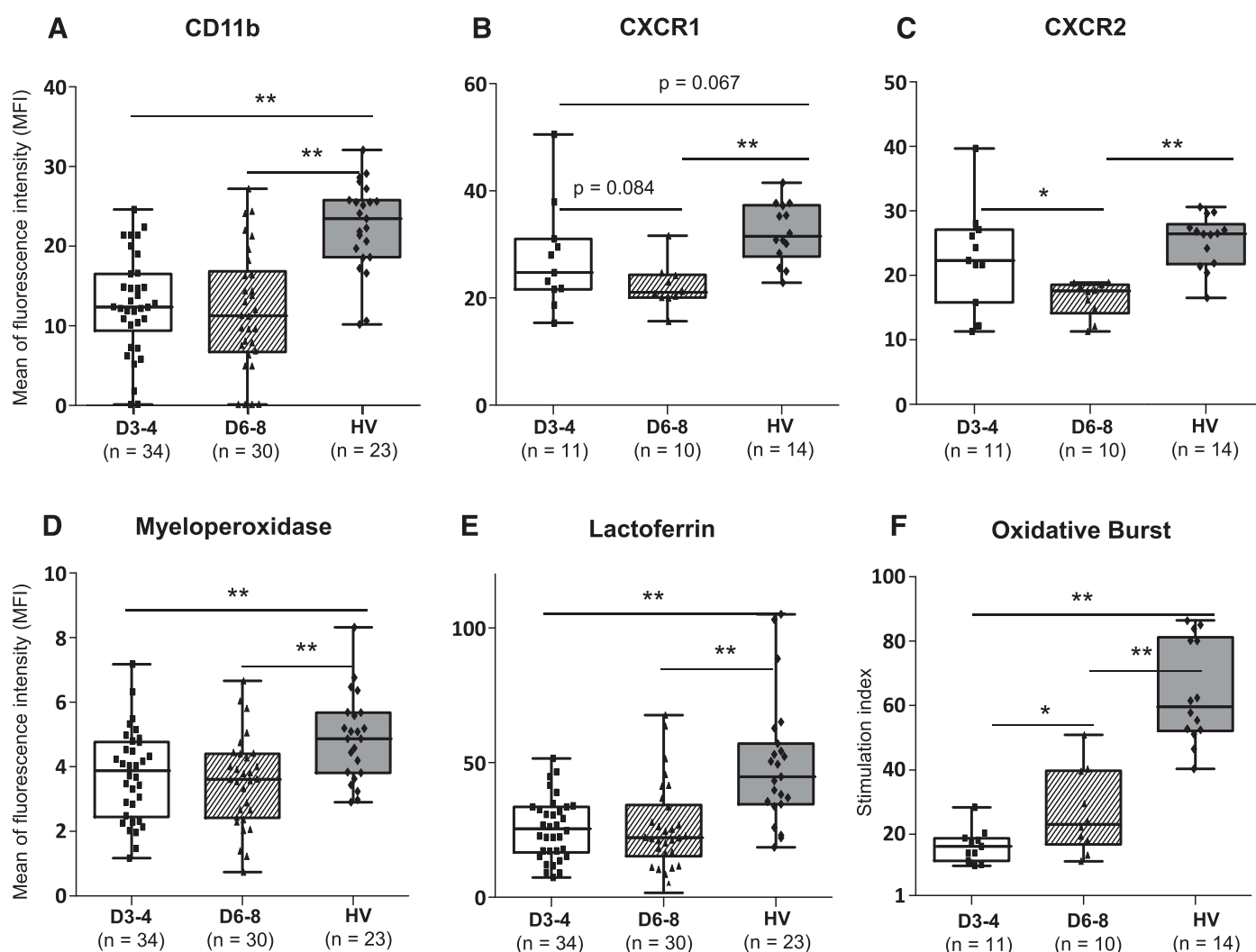


Figure 3. Chemotaxis and bactericidal parameters. Cell surface expression was measured as the MFI on neutrophils from septic shock patients at d3–4, white, $n = 34$ and d6–8 (striped, $n = 30$) serial samples after the onset of shock compared with healthy volunteers (HVs; gray, $n = 23$) for CD11b (A). Similarly, MFI on neutrophils from septic shock patients at d3–4 ($n = 11$), d6–8 ($n = 10$; serial samples), and HVs ($n = 14$) are reported for CXCR1 (B) and CXCR2 (C). MFI of intracellular myeloperoxidase (D) and intracellular lactoferrin (E) were also measured for patients at d3–4 ($n = 34$), d6–8 ($n = 30$; serial samples), and HVs ($n = 23$). The stimulation index (MFI ratio of positive neutrophils of stimulated sample [*E. coli*] to negative neutrophils of negative control) after *E. coli* stimulation in neutrophils are presented for patients at d3–4 ($n = 11$), d6–8 ($n = 10$; serial samples), and HVs ($n = 14$) (F). The nonparametric Mann-Whitney *U* test was used to compare the results between groups. The nonparametric Wilcoxon paired test was used to evaluate evolution over time within a group. ** $P < 0.01$. * $P < 0.05$.

neutrophils at sites distant to the initial infection might be a part of the physiopathology of sepsis [5, 6]. However, these studies were conducted during the proinflammatory phase of sepsis, and no data are yet available during the delayed immunosuppressive phase. However, recent works, notably that by Pillay et al. [7], have suggested putative immunosuppressive properties for neutrophils, highlighting a possible involvement of these cells during sepsis-induced immunosuppression.

The aim of the present study was thus to perform an extensive investigation of neutrophil alterations during sepsis-induced immunosuppression through phenotypic and functional studies. Although most studies have reported overwhelming activation of neutrophils during the sepsis early proinflammatory phase [5, 6], our results showed, for the first time in patients, that circulating neutrophils present with phenotypic and functional alterations

during sepsis-induced immunosuppression. Our main results included that septic patients present with (a) a persisting increased proportion of immature cells in circulating neutrophils, (b) major neutrophil functional alterations, and (c) both aspects are associated with an increased risk of death after septic shock.

We found an increased frequency of immature CD10^{dim}CD16^{dim} neutrophils in septic shock patients sampled at d3–4 and d6–8 and decreased expression of CD10 and CD16 on granulocytes, characteristic of immature myeloid cells [15]. This is important, because Drifte et al. [16] recently showed that circulating immature neutrophils from patients with severe sepsis and septic shock are less potent in supporting innate immune defenses compared with mature neutrophils. Therefore, this increased proportion of immature cells might participate in the

TABLE 2. Ratio of emigrated neutrophils in stimulated wells versus control wells

Variable	fMLP	GRO- α	IL-8
Healthy volunteers ($n = 7$)	4.9 (0.55–10.49)	2.97 (1.69–15.10)	6.01 (2.21–37.63)
Septic shock patients d3–4 ($n = 9$)	0.16 ^a (0.03–0.49)	0.92 ^a (0.29–1.65)	1.96 ^a (0.88–3.94)
Septic shock patients d3–4 ($n = 6$)	0.62 (0.15–1.05)	3 (1.11–9.04)	4.21 (2.51–6.61)

The ratio of emigrated neutrophils in stimulated wells to emigrated neutrophils in control wells (incubation buffer) are presented for neutrophils from healthy volunteers ($n = 7$) compared with that for septic shock patients at d3–4 ($n = 9$) and d6–8 ($n = 6$; different patients) in response to fMLP, GRO- α , and IL-8. Data presented as median and IQR (quartile 1 to quartile 3; nonparametric Mann-Whitney U test used to compare results between groups. ^a $P < 0.05$.

alterations of neutrophil functions we observed in our patients. This is supported by our observation of a lower oxidative burst capacity (decreased stimulation index) in CD10^{dim}CD16^{dim} neutrophils compared with CD10^{bright}CD16^{bright} cells (data not shown).

In addition, we observed markedly decreased function of circulating neutrophils in the septic shock patients. In particular, neutrophil chemotaxis was decreased (reduced integrin, selectin, and chemokine receptor expression with altered ex vivo migration in response to different chemoattractants). Similar results have been found by Tavares-Murta et al. [17] in response to fMLP and leukotriene B₄ within the first 4 d after sepsis. In the present study, impairment of neutrophil chemotaxis occurred mainly in neutrophils obtained from nonsurvivor patients. Similarly, we found a clear reduction in oxidative burst for late samples measured using the ex vivo functional test. This is in line with a decrease in myeloperoxidase and lactoferrin intracellular expression. Many studies have noted an upregulation in ROS generation 48 h after sepsis onset that could participate in organ

dysfunctions after sepsis [18, 19]. We found contrasting results that might illustrate the shift from an initial overwhelming proinflammatory response with exacerbated neutrophil function to an immunosuppressive phase with functional alterations after septic shock.

Although our study was purely observational and thus did not allow to draw conclusions regarding the effective role of neutrophil alterations in the development of immunosuppression in patients with septic shock, diminished myeloperoxidase expression appeared to be the best predictor to identify a group of septic shock patients at high risk of death (odds ratio 8.39, 95% CI 1.185–59.441, $P = 0.033$). However, this result must be taken with caution, given the limited number of nonsurvivors in our cohort. Similarly, patients with a lower proportion of CD10^{dim}CD16^{dim} granulocytes had significantly better survival compared with patients presenting with a higher percentage ($P = 0.040$, log-rank test). This last aspect is in accordance with data from Guérin et al. [12]. They associated the prediction of the early deterioration of patients with sepsis with the presence of the

TABLE 3. Multivariate analysis results

Multivariate analysis parameter	Odds ratio	95% CI	P value
Myeloperoxidase	8.39	1.185–59.441	0.033 ^a
SAPS II	0.96	0.874–1.043	0.303
Lactoferrin	1.25	1.019–1.530	0.032 ^a
SAPS II	0.96	0.885–1.036	0.283
CD62L	1.52	1.003–2.307	0.048 ^a
SAPS II	0.96	0.898–1.035	0.311
CD11b	8.40	0.903–88.495	0.061
SAPS II	0.91	0.812–1.028	0.132
CD10	1.23	0.988–1.525	0.064
SAPS II	0.95	0.884–1.027	0.207
CD16	1.31	0.961–1.797	0.087
SAPS II	0.86	0.705–1.051	0.140
Neutrophil count	0.86	0.736–1.007	0.061
SAPS II	0.96	0.884–1.044	0.342
% CD10 ^{dim} CD16 ^{dim}	0.86	0.730–1.007	0.061
SAPS II	0.95	0.882–1.021	0.160

Multivariate logistic regression analysis used to identify variables associated with death ($n = 35$ survivors and 8 nonsurvivors). SAPS II score included in models with myeloperoxidase, lactoferrin, CD62L, CD11b, CD10, and CD16 expression (MFI), neutrophil count, and percentage of CD10^{dim}CD16^{dim} neutrophils measured at d6–8. SAPS II score was calculated after admission. ^aStatistically significant ($P < 0.05$).

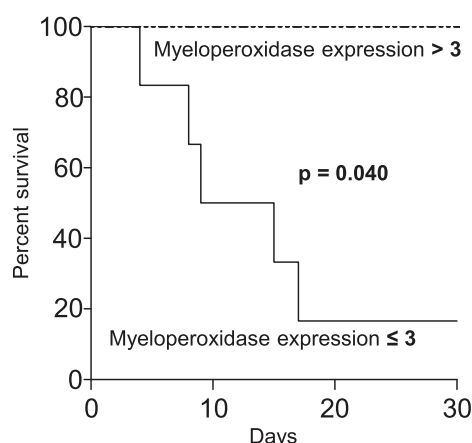


Figure 4. Survival curve. Kaplan-Meier survival curves were established after stratification by myeloperoxidase expression at d6–8 (MFI = 3; Youden index). A significant difference was measured between the 2 curves ($P = 0.040$, log-rank test).

CD10^{dim}CD16^{dim} subset [12]. This suggests that these neutrophils might participate in the deleterious role of immunosuppression after septic shock. In particular, it is well known that primary innate immunodeficiencies affecting neutrophil function such as oxidative burst and chemotaxis lead to severe pathologic entities characterized by an increased susceptibility to infections. Thus, it is tempting to speculate that neutrophil alterations could participate in the increased risk of nosocomial infection observed in septic patients. This aspect needs to be further evaluated in experimental studies, recapitulating in mice the results we observed in patients and including additional microbiological experiments such as bacterial killing or clearance.

Finally, not all neutrophil functions were altered in our study. In particular, the phagocytosis capacity was preserved. Likewise, the activation capacity was also conserved in patients during sepsis-induced immunosuppression compared with controls. We observed a similar increased CD11b and decreased CD62L expression on neutrophils after either IL-8 or fMLP stimulation. Likewise, when measuring STAT5 phosphorylation in response to increasing concentrations of GM-CSF, no differences were noted between patients and controls. This suggests that neutrophils from septic shock patients remain responsive to stimulation. This could be interesting in the perspective of immunoadjuvant therapies that are now emphasized in the treatment of septic patients.

Our study had some limitations. First, because of the difficulty in conducting such functional tests in the clinic, the sample size of our cohort was relatively modest. Considering the limited amount of blood, it was difficult to perform each experiment on every patient. Therefore, the observed dysfunctions and their link to deleterious outcomes need to be confirmed in larger clinical studies. In addition, healthy volunteers were not strictly age-matched to the septic shock patients; thus, we could not definitely rule out an effect of age on our results. Because the effects of age on neutrophil function seem to be multifaceted (i.e., some functions have been reported to be decreased and others might be augmented, which remains a matter of debate

[20–22]), this aspect needs to be specifically explored further in a dedicated study of age-matched patients and controls. Finally, despite the increasing data on the subject, we did not investigate the link between myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) and our results. Therefore, this aspect deserves further investigation, in particular, regarding the definition of a consensual phenotyping procedure for MDSCs in humans.

CONCLUSIONS

Taken together, in this extensive study of neutrophil phenotype and function during sepsis-induced immunosuppression, our results have highlighted a markedly altered neutrophil chemotaxis and oxidative burst and an increased number of immature circulating granulocytes in patients with septic shock. Both aspects were associated with an increased risk of death after septic shock. The association of selected parameters with subsequent mortality requires confirmation in a larger clinical study. In addition, the importance of neutrophil alterations during sepsis-induced immunosuppression could be evaluated in animal models.

AUTHORSHIP

J.D. performed the experiments. J.D., F.V., and G.M. wrote the report and designed the experiments. A.F. and A.L. included the patients. F.V., A.F., M.-A.C., J.P., L.J., C.M., F.P.-L., J.T., A.L., and G.M. analyzed and discussed the results and read and discussed the report. J.D. and J.P. performed the statistical analyses. J.D., F.V., A.F., M.-A.C., J.P., L.J., C.M., F.P.-L., J.T., A.L., G.M. read and approved the final report.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was mainly supported by funds from Hospices Civils de Lyon. The study was also supported by Beckman-Coulter and bioMérieux by donations of laboratory equipment and supplies. These private companies had no role in the study design or data collection or interpretation. Beckman-Coulter and bioMérieux had no role in manuscript preparation or the decision to submit it for publication. The authors thank Anne Portier, Immunology Laboratory, Hôpital E. Herriot, Lyon, and Elisabeth Cerrato, Hospices Civils de Lyon, bioMérieux Joint Research Unit, for their help in performing preanalytical handling of the samples; and Hélène Vallin, Nathalie Panel, and Marion Provent (Clinical Research Center, Lyon-Sud) for their work on patient inclusion and clinical data acquisition.

DISCLOSURES

The authors declare no competing financial interests.

REFERENCES

1. Pavon, A., Binquet, C., Kara, F., Martinet, O., Ganster, F., Navellou, J. C., Castelain, V., Barraud, D., Cousson, J., Louis, G., Perez, P., Kuteifan, K., Noirot, A., Badie, J., Mezher, C., Lessire, H., Quantin, C., Abrahamowicz,

- M., Quenot, J. P.; EPIdeiology of Septic Shock (EPISS) Study Group. (2013) Profile of the risk of death after septic shock in the present era: an epidemiologic study. *Crit. Care Med.* **41**, 2600–2609.
2. Levy, M. M., Artigas, A., Phillips, G. S., Rhodes, A., Beale, R., Osborn, T., Vincent, J. L., Townsend, S., Lemeshow, S., Dellinger, R. P. (2012) 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.
 3. Hotchkiss, R. S., Monneret, G., Payen, D. (2013) Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect. Dis.* **13**, 260–268.
 4. Amulic, B., Cazalet, C., Hayes, G. L., Metzler, K. D., Zychlinsky, A. (2012) Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu. Rev. Immunol.* **30**, 459–489.
 5. Brown, K. A., Brain, S. D., Pearson, J. D., Edgeworth, J. D., Lewis, S. M., Treacher, D. F. (2006) Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *Lancet* **368**, 157–169.
 6. Kovach, M. A., Standiford, T. J. (2012) The function of neutrophils in sepsis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **25**, 321–327.
 7. Pillay, J., Kamp, V. M., van Hoffen, E., Visser, T., Tak, T., Lammers, J. W., Ulfman, L. H., Leenen, L. P., Pickkers, P., Koenderman, L. (2012) A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *J. Clin. Invest.* **122**, 327–336.
 8. Bone, R. C., Balk, R. A., Cerra, F. B., Dellinger, R. P., Fein, A. M., Knaus, W. A., Schein, R. M., Sibbald, W. J.; The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. (1992) Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest* **101**, 1644–1655.
 9. Demaret, J., Walencik, A., Jacob, M. C., Timsit, J. F., Venet, F., Lepape, A., Monneret, G. (2013) Inter-laboratory assessment of flow cytometric monocyte HLA-DR expression in clinical samples. *Cytometry B Clin. Cytom.* **84**, 59–62.
 10. Venet, F., Lukaszewicz, A. C., Payen, D., Hotchkiss, R., Monneret, G. (2013) Monitoring the immune response in sepsis: a rational approach to administration of immunoadjuvant therapies. *Curr. Opin. Immunol.* **25**, 477–483.
 11. Venet, F., Chung, C. S., Kherouf, H., Geeraert, A., Malcus, C., Poitevin, F., Bohé, J., Lepape, A., Ayala, A., Monneret, G. (2009) Increased circulating regulatory T cells (CD4(+)CD25(+)CD127(-)) contribute to lymphocyte anergy in septic shock patients. *Intensive Care Med.* **35**, 678–686.
 12. Guérin, E., Orabona, M., Raquil, M. A., Giraudeau, B., Bellier, R., Gibot, S., Béné, M. C., Lacombe, F., Droin, N., Solary, E., Vignon, P., Feuillard, J., François, B. (2014) Circulating immature granulocytes with T-cell killing functions predict sepsis deterioration*. *Crit. Care Med.* **42**, 2007–2018.
 13. Hotchkiss, R. S., Coopersmith, C. M., McDunn, J. E., Ferguson, T. A. (2009) The sepsis seesaw: tilting toward immunosuppression. *Nat. Med.* **15**, 496–497.
 14. Hotchkiss, R. S., Monneret, G., Payen, D. (2013) Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 862–874.
 15. Orr, Y., Taylor, J. M., Bannon, P. G., Geczy, C., Kritharides, L. (2005) Circulating CD10-/CD16low neutrophils provide a quantitative index of active bone marrow neutrophil release. *Br. J. Haematol.* **131**, 508–519.
 16. Drifte, G., Dunn-Siegrist, I., Tissières, P., Pugin, J. (2013) Innate immune functions of immature neutrophils in patients with sepsis and severe systemic inflammatory response syndrome. *Crit. Care Med.* **41**, 820–832.
 17. Tavares-Murta, B. M., Zapparoli, M., Ferreira, R. B., Silva-Vergara, M. L., Oliveira, C. H., Murta, E. F., Ferreira, S. H., Cunha, F. Q. (2002) Failure of neutrophil chemotactic function in septic patients. *Crit. Care Med.* **30**, 1056–1061.
 18. Martins, P. S., Brunialti, M. K., Martos, L. S., Machado, F. R., Assunção, M. S., Blecher, S., Salomao, R. (2008) Expression of cell surface receptors and oxidative metabolism modulation in the clinical continuum of sepsis. *Crit. Care* **12**, R25.
 19. Martins, P. S., Kallas, E. G., Neto, M. C., Dalboni, M. A., Blecher, S., Salomão, R. (2003) Upregulation of reactive oxygen species generation and phagocytosis, and increased apoptosis in human neutrophils during severe sepsis and septic shock. *Shock* **20**, 208–212.
 20. Schröder, A. K., Rink, L. (2003) Neutrophil immunity of the elderly. *Mech. Ageing Dev.* **124**, 419–425.
 21. Tseng, C. W., Liu, G. Y. (2014) Expanding roles of neutrophils in aging hosts. *Curr. Opin. Immunol.* **29**, 43–48.
 22. Wessels, I., Jansen, J., Rink, L., Uciechowski, P. (2010) Immunosenescence of polymorphonuclear neutrophils. *ScientificWorldJournal* **10**, 145–160.

KEY WORDS:

septic shock · CD10 · CD16 · myeloperoxidase

II. IDENTIFICATION OF CD177 AS THE MOST DYSREGULATED PARAMETER IN A MICROARRAY STUDY OF PURIFIED NEUTROPHILS FROM SEPTIC SHOCK PATIENTS

Julie Demaret, Fabienne Venet, Jonathan Plassais, Marie-Angélique Cazalis, Hélène Vallin, Arnaud Friggeri, Alain Lepape, Thomas Rimmelé, Julien Textoris and Guillaume Monneret.
Intensive Care Med Exp – *submitted*

a) Contexte

Suite à notre précédent travail, nous avons voulu compléter l'étude des neutrophiles lors du choc septique avec une approche transcriptomique.

b) Description de l'étude

L'objectif principal de ce travail était de réaliser une étude transcriptomique de neutrophiles purifiés provenant de patients en choc septique et de volontaires sains afin d'identifier les gènes différentiellement exprimés. Une étude complémentaire en cytométrie en flux a également été réalisée.

c) Conclusion

En comparant le transcriptome de neutrophiles purifiés de patients en choc septique et de volontaires sains, nous avons identifié 364 gènes up-régulés et 328 gènes down-régulés chez les patients. Ces gènes sont impliqués dans la maturation cellulaire, l'apoptose, le recrutement, le chimiotactisme et les propriétés bactéricides des PNN. De manière intéressante, le CD177 est apparu comme le paramètre le plus dérégulé. Ces résultats ont ensuite été confirmés en cytométrie en flux et corrélés avec une diminution d'expression du CD10. Le rôle du CD177 dans la pathophysiologie du choc septique et le potentiel intérêt de l'utiliser comme biomarqueur de maturation ou d'activation des neutrophiles reste à être vérifié.

Identification of CD177 as the most dysregulated parameter in a microarray study of purified neutrophils from septic shock patients

Julie Demaret^{1,2}, Fabienne Venet^{1,2}, Jonathan Plassais^{3, 1}, Marie-Angélique Cazalis³, Hélène Vallin⁴, Arnaud Friggeri⁴, Alain Lepape⁴, Thomas Rimmelé⁵, Julien Textoris^{3,5}, Guillaume Monneret^{1,2,*}.

(1)Hospices Civils de Lyon, Immunology Laboratory, E. Herriot Hospital, Lyon, 69003, France

(2)EAM 7426 « Pathophysiology of injury-induced immunosuppression » University Claude Bernard Lyon 1 – BioMérieux – Hospices Civils de Lyon, Lyon, 69003, France

(3)Hospices Civils de Lyon-bioMérieux Joint Research Unit, E. Herriot Hospital, Lyon, 69003, France

(4)Hospices Civils de Lyon, Intensive Care Units, Lyon-Sud Hospital, Pierre-Bénite, 69310, France

(5)Hospices Civils de Lyon, Intensive Care Units, E. Herriot Hospital, Lyon, 69003, France

* Corresponding author

Authors' emails

Julie Demaret: julie.demaret@chu-lyon.fr / Fabienne Venet: fabienne.venet@chu-lyon.fr / Jonathan Plassais: jonathan.plassais@gmail.com / Marie-Angélique Cazalis: marie-angelique.cazalis@biomerieux.com / Hélène Vallin : helene.vallin@chu-lyon.fr / Arnaud Friggeri : arnaud.friggeri@chu-lyon.fr / Alain Lepape : alain.lepape@chu-lyon.fr / Thomas Rimmelé : thomas.rimmele@chu-lyon.fr / Julien Textoris : julien.textoris@biomerieux.com

Corresponding author contact information:

Prof. Guillaume Monneret,

Immunology Laboratory, E. Herriot Hospital, Hospices Civils de Lyon,

Pavillon E, 5 Place d'Arsonval, 69437 Lyon Cedex 03, France)

e-mail: guillaume.monneret@chu-lyon.fr

Tel.: +33-4-72119758, Fax: +33-4-72119753

¹ Present address : Enterome Bioscience, 94/96 avenue Ledru Rollin, Paris, 75011, France

ABSTRACT

Sepsis represents the host's systemic inflammatory response to an infection. In this condition, immune response associates a marked inflammatory response and the delayed development of severe dysfunctions affecting both innate and adaptive responses. As neutrophils are the first line of defense against infection, they are central to the pathophysiology of sepsis in first hours. Nevertheless, their role during immunosuppression phase remains elusive.

The main objective of the current work was to perform a transcriptomic study on purified neutrophils from septic shock patients ($n = 9$) so as to identify genes that are differentially expressed during the first week after disease onset both (3-4 and 6-8 days) versus healthy donors. Then, 45 septic shock patients were prospectively enrolled to confirm results at the protein level using flow cytometry. Twenty healthy volunteers (HV) were also included for the whole study. By comparing the transcriptome of purified neutrophils, we identified 364 up-regulated and 328 down-regulated genes differentially expressed. Of them, CD177 mRNA, coding for an activation molecule in chemotaxis, had the highest fold change modulation between patients and HV. This increase was then confirmed at the protein level. There was a constant subset of neutrophils that did not express CD177. However, when positive, septic neutrophils presented with significantly increased CD177 expression. Of note, no association between CD177 overexpression and features of immunosuppression has been highlighted. In addition, this up-regulation was negatively correlated with a decreased expression of CD10, a characteristic of immature myeloid cells.

In conclusion, in this exploratory work, we shed light on the increased CD177 mRNA and protein expressions in circulating neutrophils after septic shock. Considering the potential dual roles of CD177 neutrophil (i.e., maturation / chemotaxis), negatively correlated in this study, its participation in septic shock pathophysiology deserves further investigation. Furthermore, its potential as a biomarker for sepsis would deserve to be investigated in large cohorts of patients.

HIGHLIGHTS: 3 to 5 bullet points (max 85 characters including spaces per bullet point)

- There is a differential gene expression of purified neutrophils from septic shock patients when compared to healthy controls.
- CD177 appears as the most dysregulated parameter between both groups.
- Increased expression of CD177 in septic shock patients' neutrophils is confirmed at protein level by flow cytometry.
- A negative correlation exists between expressions of CD10 and CD177.

KEYWORDS: CD177, neutrophil, sepsis, transcriptomic, immunosuppression, maturation

LIST OF ABBREVIATIONS

A647: Alexa Fluor-647

APC: Allophycocyanin

DNA: Deoxyribonucleic acid

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

G-CSF: Granulocyte-Colony Stimulating Factor

HIV: Human immunodeficiency virus

ICU: Intensive Care Units

IQR: interquartile range

MDSC: Myeloid-Derived Suppressor Cells

MFI: Mean of fluorescence intensity

mHLA-DR: Human Leucocyte Antigen-DR expressed on monocytes

PC7: PE-Cyanin 7

PE: Phycoerythrin

RNA: Ribonucleic acid

ROS: Reactive Oxygen Species

SAPS II: Simplified Acute Physiologic Score II

SD: Standard Deviation

SOFA: Sequential Organ Failure Assessment score

Treg: regulatory T cells

1. Introduction

Sepsis is a life-threatening clinical emergency that occurs in 27 million people each year around the world. The incidence of sepsis is still increasing, reaching 10 to 30% of Intensive Care Units (ICU) admissions [1-3]. Septic shock (the most severe stage of sepsis) is associated with a high mortality approaching 40% [4]. Immune response after sepsis associates a major inflammatory response leading to organ dysfunctions and shock and the development of immune alterations affecting both innate and adaptive immune responses. Sepsis directly or indirectly impairs the function of almost all types of immune cells [5]. The intensity and duration of this immunosuppressive phase are associated with increased mortality and nosocomial infections [6-8].

Neutrophils (PNN) are rapidly recruited to sites of infection, where they fulfill their life-saving antimicrobial functions. Neutropenia-associated diseases show that they are indispensable for controlling bacterial and fungal infections [9, 10]. It is not surprising that neutrophils participate in the pathophysiology of severe septic syndromes [11, 12]. During sepsis pro-inflammatory phase, recruitment of neutrophils from bone marrow is augmented. Moreover, neutrophil oxidative burst and phagocytosis were found to be increased in patients whereas chemotaxis is strongly inhibited. Notably, altered functions such as chemotaxis have been recently reported using microfluidic chip in septic patients [13]. This overwhelming activation of neutrophils and reduced motility is thought to participate in collateral tissue damage and ultimately multiple-organ failure, notably because of the massive production by neutrophils of reactive oxygen species and pro-inflammatory cytokines at sites distant of the initial infection.

On the other hand, an immunosuppressive neutrophil subset has recently been reported in the blood of volunteers challenged with LPS [14-16]. In line, markedly altered neutrophil chemotaxis and oxidative burst have been reported during the occurrence of sepsis-induced immunosuppression (3-7 days after sepsis onset) [17].

Given these recent and novel results on neutrophils in sepsis, the main objective of the current work was to gain further insights on neutrophils during the delayed phase of immunosuppression. To this goal, we performed a transcriptomics study on purified neutrophils comparing mRNA expression levels of septic shock patients. We identified CD177 as the most dysregulated parameter and confirmed this overexpression by flow cytometry. In addition, we investigated putative links between CD177 and the existence of different subsets of neutrophils regarding CD10 expression or usual features of immunosuppression.

2. Material and methods

2.1. *Study population*

Septic shock was defined according to the diagnostic criteria of the American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine [18] by an identifiable site of infection, persisting hypotension despite fluid resuscitation requiring vasopressor therapy, and evidence of a systemic inflammatory response manifested by at least two of the following criteria: a) temperature $>38^{\circ}\text{C}$ or $<36^{\circ}\text{C}$; b) heart rate >90 beats/min; c) respiratory rate >20 breaths/min; d) white blood cell count $>12\,000/\text{mm}^3$ or $<4000/\text{mm}^3$. Of note, this study started before the last revision of sepsis definitions [19]. The exclusion criteria were patients under the age of 18 years old and subjects with aplasia or immunosuppressive disease (e.g. HIV infection). During the follow-up, clinical and biological variables were collected. The data collection included demographic characteristics (age, gender); admission category (elective or emergency surgery, medicine); referral pattern (community-, hospital- or ICU-acquired septic shock); microbiological findings (infection characteristics such as source and identified microorganisms) and co-morbidities (such as chronic obstructive pulmonary disease, chronic heart failure, malignant diseases, diabetes...). Two clinical scores were recorded: the initial severity assessed by the Simplified Acute Physiology Score II (SAPS II, range: 0-194) and the Sepsis-related Organ Failure Assessment (SOFA, range 0-24) score at admission. Mortality was defined as death occurring within 28 days after the onset of shock. Secondary ICU-acquired infections were defined according to European definitions of European Centre for Disease Prevention and Control.

This work belongs to a global study on ICU-induced immune dysfunctions. It has been approved by our Institutional Review Board for ethics (“Comité de Protection des Personnes”) which waived the need for informed consent because this study was observational and biomarkers expressions were measured on residual blood after completion of routine follow-up. This study is also registered at

French Ministry of Research and Teaching (#DC-2008-509) and recorded at the Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés.

The study group for the transcriptomic part (cohort A) consisted in nine septic shock patients admitted to the intensive care units of the Lyon-Sud and Edouard Herriot University Hospitals (France) sampled 3-4 days (D3-4) and 6-8 days (D6-8) after sepsis onset. Reference values and control samples were obtained from 8 healthy volunteers (median age: 43 years, 5 women, 3 men) after informed consent was obtained. Forty-five septic shock patients and 12 healthy controls (median age: 37 years, 7 women, 5 men) were then prospectively enrolled in the phenotypic study (cohort B). Peripheral blood was collected in sampling tubes containing ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) or heparin at three time points after diagnosis: day 1-2 (D1-2), D3-4 and D6-8. The onset of septic shock was defined as the beginning of vasopressor therapy.

As to confirm that patients presented with immunosuppression, monocyte HLA-DR expression (mHLA-DR) was assessed by flow cytometry (FC500; Beckman-Coulter, Miami, FL) at D3-4, as previously described [20]. mHLA-DR nadir is known to occur at this time point [21]. Results are expressed as number of antibodies bound per cells (AB/C) [21]. Absolute lymphocyte counts and percentages of regulatory T lymphocytes (Treg) at D3-4 were also reported [22].

2.2. *Neutrophil isolation from patients and healthy volunteers*

Heparinized blood sampled at D3-4 were first diluted (1:2) with phosphate-buffered saline, layered over Ficoll-Paque (Biochrom, Germany) and centrifuged. Neutrophils were then aspirated and collected; after a washing step and red blood cell lysis (Versalyse, Beckman Coulter), purity was determined by flow cytometry using LDS 751 (Life Technologies, Carlsbad, CA). Human neutrophil Enrichment Kit (Stem Cell, Canada) was used to purify neutrophils following the manufacturer's recommendations. $5 \cdot 10^7$ cells/well (dilution in recommended buffer: PBS + 2% Fetal Bovine Serum or 0.5% BSA+ 1mM EDTA) were plated into a 96-untreated U-bottom plate (Corning, NY) and 50µl/ml of

EasySep™ Human Enrichment Cocktail were added for 10 min. Incubation with 100µl/ml of EasySep™ D Magnetic Particles for 5 min preceded the action held by the EasyPlate™ magnet when placing the plate onto the magnet for 10 min. The supernatant contained the enriched neutrophils (purity: <1% of CCR2 positive cells among enriched purified neutrophils). Granulocytes were suspended in Qiagen RLT Buffer (Qiagen, the Netherlands) containing 1% B-mercaptoethanol and stored at -80°C until RNA isolation.

2.3. *RNA isolation and Microarray analysis*

RNA was isolated from neutrophils using Qiagen RNeasy Plus Mini RNA isolation kit according to the manufacturer's protocol. The integrity and quality of the total RNA was assessed on an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Germany). cDNA (complementaryDNA) was synthesized from 50 ng total RNA using the WT-Ovation™ System (NuGEN, San Carlos, CA). Fragmented cDNA was end-labeled with a biotin-conjugated nucleotide analog (DLR-1a; Affymetrix, Santa Clara, CA) by using terminal transferase (Roche Diagnostics, Germany). Fragmented and labeled cDNA was hybridized for 18 h at 50°C. Hybridization was performed using GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 arrays (Affymetrix). The microarrays were read with the GeneChip Scanner 3000 (Affymetrix). Normalization processing and quality controls were performed using R/Bioconductor (R version 3.0.0 (2013-04-03)) (R Development Core Team – 2009 [23]). We performed quality controls at both probe and probeset levels [24]. Raw expression profiles were normalized using the GC-RMA algorithm (R/Bioconductor). To reduce the number of probesets, we applied a filtering process based on the MAS5.0 p-values. The raw data have been deposited in the NCBI's repository GEO (#GSE64457). Functional enrichment analyses were performed with ClueGO [25] and Cytoscape [26], using Gene Ontology Biological Process ontology. Benjamini-Hochberg correction was used to take into account multiple testing.

2.4. *Flow cytometry*

CD177 staining was performed on EDTA blood samples using Phycoerythrin (PE)-labeled anti-CD177 (clone MEM-166 – purchased from BioLegend, San Diego, CA), Alexa fluor 647 (A647)-labeled anti-CRTH2 (clone BM16 – BioLegend) and PE-Cyanine7 (PC7)-labeled anti-CD10 antibodies (clone ALB1 – purchased from Beckman Coulter, Brea, CA). After 15min of incubation with the antibodies, red blood cells were lysed using Versalyse Solution (Beckman Coulter). The gating strategy is explained in **Fig. 1**. In parallel, we performed another staining with Allophycocyanin (APC)-labeled anti-CD10 (clone ALB1 – Beckman Coulter). Samples were run on a NAVIOS flow cytometer (Beckman Coulter). Results are expressed as mean of fluorescence intensities (MFI) or percentages of subsets of cells among total neutrophils.

2.5. *Statistical analysis*

Results are expressed as medians and interquartile range (IQR) of percentages of cells, MFI and for clinical parameters. Non-parametric Mann-Whitney U test was used to compare results between septic patients and healthy volunteers. Non-parametric Wilcoxon paired test was performed to evaluate overtime evolution within a group. Correlations were studied using the Spearman's correlation coefficient test. We performed statistical analyses using SPSS (version 19.0, SPSS, Chicago, IL) and GraphPad Prism (version 5.03, GraphPad Software, La Jolla, CA) software. For microarray analysis, we performed two moderated t-tests using the Limma R package [27, 28] to compare healthy volunteers to septic shock patients for the two time points. P-values were adjusted for multi-testing with Benjamini-Hochberg correction. P-values were considered significant when lower than 0.05. Functional transcriptomic analyses were performed using IPA software (Ingenuity Systems, Redwood City, CA). We performed a core analysis with differentially expressed genes using Affymetrix probeset ID. Probeset ID were mapped to their corresponding gene and molecular objects in the Knowledge Base.

3. Results

3.1. *Clinical and biological characteristics of the patients*

Blood samples were obtained from two cohorts: the transcriptomic cohort including 9 septic shock patients (cohort A) and the phenotypic cohort including 45 patients (cohort B). Clinical and biological characteristics for both cohorts are listed in **Table 1**. Among the patients, median values for SAPS II and SOFA scores at onset of shock were 78 [IQR 60–84] and 12 [IQR 8–15], respectively in the cohort A and 62 [IQR 52–77] and 10 [IQR 7–12] respectively in the cohort B. Three patients died within 28 days (mortality = 33%) and secondary nosocomial infections were diagnosed in 4 (44%) patients with septic shock in the cohort A. Seventeen (38 %) died after 28-day follow-up and 9 (20%) patients developed secondary nosocomial infections in the cohort B. At D3-4, septic shock patients presented with previously described characteristics of injury-induced immunosuppression with a reduced mHLA-DR expression, low CD4+ lymphocyte count and an increased percentage of circulating Treg cells in comparison with normal values, in both cohorts (**Table 1**). Overall, patients present with common immunologic features of septic shock.

3.2. *Transcriptional study*

In order to get an overview of neutrophil transcriptional response after sepsis, we performed microarray analyses on purified neutrophils from 9 septic shock patients and 8 healthy volunteers (cohort A). Neutrophils' gene expression was compared between septic shock patients at D3-4 and D6-8 and healthy donors. We found that 364 up-regulated genes and 328 down-regulated genes were differentially expressed at both time points (**Fig. 2A - Supplementary Tables 1 and 2**). This signature was enriched (**Fig. 2B**) in several key functions of neutrophils (response to oxygen peroxide, regulation of reactive oxygen species) or linked to the host response (response to cytokine, pattern recognition receptor signaling pathway, positive regulation of cell death). Interestingly, most of the differentially expressed genes are evolving in an expected way according to sepsis literature [11, 12].

We observed a decreased expression in genes involved in neutrophil apoptosis (STK4, Caspase 8), in cell recruitment and chemotaxis (CREB1, RICTOR, SH3BP2, TPST, MMP9), and an increased expression in genes linked to neutrophils' antimicrobial properties (ARG1, STOM, ADAM9). CD177 appeared as the most striking parameter with an increased expression in septic shock patients compared to healthy volunteers both at D3-4 and D6-8 (D3-4: fold change = 36.24 – $p < 0.0001$ – **Fig. 3A** / D6-8: fold change = 38.29 – $p < 0.0001$ – **Fig. 3B**).

3.3. *CD177 cell surface expression*

As observed in literature [29], two subsets of circulating neutrophils appeared : one positive and one negative for CD177 expression (**Fig. 4A**). This was observed both in healthy controls and septic shock patients. However, we observed a trend of slight increase in percentage of CD177 positive cells in septic shock patients, especially at D6-8, compared to healthy volunteers with a raise over time (**Fig. 4A**).

Interestingly, and as observed by microarrays, CD177 expression (MFI) measured in CD177 positive cells was significantly increased in neutrophils from patients with septic shock at D1-2 ($p < 0.0001$), D3-4 ($p < 0.0001$) and at D6-8 ($p = 0.0004$) relative to those from healthy volunteers. A significant decrease over time was observed between D1-2 and D6-8 samples ($p = 0.0007$ - **Fig. 4B**).

As CD177 expression on neutrophils has been shown to be associated with their maturation state [30, 31], we studied its link with maturation markers on these cells. CD10 expression on neutrophils was thus measured in the same samples. As observed previously in sepsis [17, 32], we highlighted a lower CD10 expression on circulating neutrophils from septic patients (D1-2 $p < 0.0001$ – D3-4 $p < 0.0001$ – D6-8 $p = 0.0135$), with increasing expression over time in paired samples (**Fig. 4C**). While no differential CD10 expression on CD177 negative versus CD177 positive neutrophils in patients was observed; we noted a negative correlation between CD177 expression and CD10 expression (**Fig. 4D** – $r = -0.4978$, $p < 0.0001$).

In order to explore the potential association of modulation of CD177 with immunosuppression, we correlated CD177 expression (MFI) measured in CD177 positive cells with common hallmarks of sepsis-induced immunosuppression such as decreased expression of HLA-DR, low CD4+ lymphocyte count and an increased percentage of circulating Treg cells, in cohort B. However, we did not reach any significant correlation. We obtained the same results when correlations were performed with outcomes such as mortality, secondary nosocomial infections or clinical scores (SOFA, SAPSII).

4. Discussion

Sepsis is usually characterized as the association of both pro and anti-inflammatory responses to an infection with the occurrence of sepsis-induced immunosuppression [6].

Neutrophils are essential for innate immunity and resistance to pathogens [9]. The morbidity and mortality from infections rise dramatically in patients with quantitative or qualitative neutrophil defects, providing clinical confirmation of the important role of normal neutrophils for human health [33]. These cells are classically characterized by their ability to act as phagocytic cells, to release lytic enzymes from their granules and to produce reactive oxygen intermediates with antimicrobial potential [9, 10, 34]. Although they actively remove invading pathogens during infection, they also contribute to the development during septic shock of multiple organ failure through their excessive inflammatory activation, aberrant recruitment, and dysregulated interactions with the vascular endothelium [11, 12].

Limited data is available about their phenotype and functions during the immunosuppressive phase of sepsis. Interestingly, an immunosuppressive neutrophil subset has been recently reported in the blood of volunteers challenged with LPS [14, 16]. Pillay *et al.* showed that this neutrophil subset exhibited suppressive effects on T-cell proliferation, a response that was mediated by neutrophil expression of Mac-1 and locally released reactive oxygen species into the immunological synapse between neutrophils and T cells [14]. In addition, it has been recently reported that circulating neutrophils present with phenotypic, functional, and morphologic alterations a few days after sepsis onset (during immunosuppressive phase). In particular, septic shock patients presented with significantly decreased chemotaxis and oxidative burst [17]. Altered chemotaxis has been also recently highlighted using a microfluidic chip in septic patients [13]

The main goal of the current study was to perform a transcriptomic study on purified neutrophils by comparing mRNA expression levels between septic shock patients sampled during delayed sepsis-

induced immunosuppression and healthy volunteers. Given the complexity of the signaling network in sepsis, a whole-genome expression profile could provide new insights [35].

This current work revealed differentially expressed genes between purified neutrophils from patients and controls. Of them, we showed alterations in pathways involved in cell maturation, decreased apoptosis (STK4, Caspase 8), cell recruitment and chemotaxis (CREB1, RICTOR, SH3BP2, TPST, MMP9), and increased antimicrobial properties (ARG1, STOM, ADAM9) of neutrophils. Of note, arginase 1 (ARG1) inhibits T-cell proliferation by degrading extracellular arginine, which results in decreased responsiveness of T cells to CD3/TCR stimulation. In humans, ARG1 is stored in inactive form within granules of neutrophils and gets activated on release and can be also produced by myeloid-derived suppressor cells [36]. ARG1 gene expression was up-regulated in patients' samples (D3-4: fold change = 7.17 – $p < 0.0001$ / D6-8: fold change = 6.15 – $p < 0.0001$), highlighting the involvement of a potential mechanism of immunosuppression.

Interestingly, we identified CD177 mRNA as the most dysregulated parameter between purified neutrophils from patients and healthy controls (D3-4: fold change = 36.24 – $p < 0.0001$ / D6-8: fold change = 38.29 – $p < 0.0001$). It agrees with results obtained in healthy donors injected with LPS [37]. CD177 is a 58- to 64-kDa glycosylphosphatidylinositol-anchored glycoprotein expressed exclusively by neutrophils [38, 39]. Some teams discovered its primary structure by sequencing the NB1 and PRV-1 genes, which later turned out to be two alleles of a single CD177 gene [40-42]. In line with the literature highlighting a role of CD177 in the acute neutrophil response to an infection through neutrophil adhesion and transendothelial migration and that neutrophil CD177 mRNA levels are elevated in several conditions associated with increased neutrophil counts such as severe sepsis [43, 44], we investigated the CD177 expression on neutrophils on septic shock patients at protein level. The surface expression of CD177 is unique in that only a subset of neutrophils expresses this protein on the cell surface, with the mean size of the CD177 positive subpopulation ranging from 45% to 65% [29]. In line, we only observed a slight rise regarding the percentage of CD177 positive cells.

Nevertheless, the mean fluorescence intensity was much higher in the CD177 positive cells of septic patients. Of note, to our knowledge, it is the first time that an overexpression of CD177 is shown in septic shock patients by flow cytometry.

There was no correlation with usual features of immunosuppression (mHLA-DR, percentage of Treg, CD4 count). Moreover, highest values of CD177 were found at day 1 and then declined during the usually described immunosuppressive phase. Thus, there was no argument to hypothesize a link between CD177 and sepsis-induced immunosuppression.

Interestingly, mean fluorescence intensities of CD10 and CD177 positive cells are negatively correlated. A decreased expression of CD10 on granulocytes, as observed here, is characteristic of immature myeloid cells [45].

Passamonti *et al.* observed that neutrophils isolated from the bone marrow of normal donors or from their peripheral blood after G-CSF administration have elevated CD177 mRNA levels suggesting that gene expression is higher at initial stages of neutrophil maturation [31]. These results were confirmed by flow cytometry after the administration of 10 days of G-CSF to healthy volunteers. CD177 (NB1) expression increased after two days of treatment [44]. In another context, de Kleijn *et al.* found, in a human experimental endotoxaemia model, that gene transcription profile during early systemic inflammation suggests a combination of early activation of circulating neutrophils and a mobilization of young neutrophils from the bone marrow, particularly shown by an up-regulation of CD177 expression [37]. Hu *et al.* revealed that CD177 protein measured by flow cytometry was the most expressed by band cells [30]. Interestingly, immaturity of neutrophils is associated with mortality in sepsis. Therefore, we could consider CD177 overexpression as a marker of neutrophil maturation. An increased number of immature circulating granulocytes (CD10^{dim}CD16^{dim} neutrophils) has been previously reported and associated with an increased risk of death after septic shock [17]. Likewise, Guérin *et al.* associated the existence of the CD10^{dim}CD16^{dim} subset with prediction of the early deterioration of patients with sepsis [32].

On the other hand, while there was a constant subset of neutrophils that did not express CD177, when positive, septic neutrophils presented with increased values in their CD177 expression. This could be due to the presence of neutrophil subsets with different properties. Of both, one could be dedicated to rapid response to infections. Indeed, CD177 should be involved in the adhesion of neutrophils to endothelial cells and their transendothelial migration by interacting with PECAM-1 [46]. It has been reported that CD177 is up-regulated on the neutrophil surface upon stimulation and in several conditions associated with increased neutrophil counts, including during severe bacterial infections [47], and following granulocyte-colony-stimulating factor treatment [43, 44]. CD177 could be hypothesized as a marker of activation such as CD64, which has been shown to be a highly sensitive and specific marker for systemic infection and sepsis in adults, children, and neonates [48]. However, to our knowledge, no study has been performed so far to evaluate the putative differential functional properties of both CD177 subsets (negative and positive populations). Our study presented some limitations. First, the sample size of our cohorts was quite modest. Therefore, the observed dysfunctions and their link to deleterious outcomes that we could not highlight here need to be investigated in larger clinical studies. In addition, healthy controls were not strictly age-matched to the septic shock patients. However, Pellegrina *et al.* conducted a genome-wide expression analysis of circulating neutrophils from old and young septic patients and CD177 did not appear as dysregulated between both populations [49].

In conclusion, whereas no association has been reported with immunosuppression, our results have highlighted for the first time an up-regulated transcriptomics and phenotypic expression of neutrophil CD177 in septic shock patients compared to healthy volunteers. It was associated with a decreased expression of CD10. On one hand, CD177 could be considered as a marker of activation. On the other hand, up-regulation of CD177 could translate the immaturity of the cells. As this work was exploratory, some functional studies are needed to delineate the exact role of this CD177

overexpression in sepsis between activation/maturation. Further studies are also required to investigate its potential as a sepsis biomarker. In addition, as persistence of immature cells is associated with mortality, the quantification of this CD10^{dim}/CD177^{bright} neutrophil subset deserves to be further evaluated in larger cohorts of patients.

CONFLICT OF INTEREST

This study was mainly supported by funds from Hospices Civils de Lyon. In addition, this study was also supported by bioMérieux through donations of laboratory equipment and supplies. This private company had no role in the study design, the collection or interpretation of the data. Similarly, bioMérieux had no role in the preparation of the manuscript or the decision to submit it for publication. None of the authors has any conflict of interest regarding this manuscript.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Anne Portier from the Immunology laboratory of Hôpital E. Herriot — Lyon and Elisabeth Cerrato from Hospices Civils de Lyon-bioMérieux Joint Research Unit for their help in performing preanalytical handling of samples; Nathalie Panel, Marion Provent (Clinical Research Center, Lyon-Sud), Fayrouz Mehennaoui and Valérie Cerro (Clinical Research Center, Edouard Herriot Hospital) for their work on patients' inclusion and clinical data acquisition.

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1: Gating strategy and representative histograms

Neutrophils (PNN) were first gated based on SSC/FSC histogram (A). Expression of CCR2 was assessed in order to identify and exclude eosinophils (eosino) (B). Mean fluorescence intensity (MFI) and percentage of CD177 positive cells was measured on [PNN AND NOT (eosino)] (C).

FIGURE 2: Transcriptomics study

Venn diagrams represent gene expression (up-regulated and down-regulated) compared between purified neutrophils (purity: <1% of CCR2 positive cells among enriched purified neutrophils) from septic shock patients (n=9) and healthy donors (n=8) at D3-4 and D6-8 (A). B: Graphical representation of functional enrichment analysis. ClueGO plugin for Cytoscape was used to select significantly (corrected p-value < 0.01) enriched keywords from GO biological Process ontology. These keywords were grouped together according to the number of shared genes. Colours indicate clusters of biological functions, and node size is proportional to the number of genes associated with each keyword.

FIGURE 3: Representation of the most up- and down-regulated genes between patients and controls

Meta-plots show the twenty first up-regulated and down-regulated genes when studying controls (n=8) versus septic patients (n=9) at D3-4 (A) and at D6-8 (B).

FIGURE 4: CD177 and CD10 expressions

The percentage (A), the mean fluorescence intensity (B) of CD177 positive cells and the mean fluorescence intensity of CD10 are reported for septic shock patients sampled at D1-2 (n=39), D3-4 (n=32), D6-8 (n=18) and healthy volunteers (n=10) as median + interquartile range. The nonparametric Mann-Whitney U test was used to compare results between groups. **p < 0.01. Correlation between mean fluorescence intensity of CD177 positive cells and mean fluorescence intensity of CD10 (D) is represented for 99 values (39 D1-2 septic patients – 32 D3-4 septic patients –

18 D6-8 septic patients – 10 healthy volunteers – $r = -0.4978$ – $p < 0.0001$ – Spearman's correlation coefficient test).

TABLE 1: Demographic, clinical and immunological data for septic shock patients.

PARAMETERS	Cohort A n=9	Cohort B n=45
Age at admission (years)	71 [66-78]	72 [63-80]
Gender - Male, n (%)	6 (67)	34 (76)
Main admission category		
Medical, n (%)	9 (100)	25 (56)
Surgery, n (%)	0 (0)	20 (44)
Number of comorbidities		
0, n (%)	3 (33)	5 (11)
≥ 1, n (%)	6 (67)	40 (89)
SAPS II	78 [60-84]	62 [52-77]
SOFA score	12 [8-15]	10 [7-12]
McCabe score		
1, n (%)	4 (44)	28 (62)
2, n (%)	5 (56)	11 (24)
3, n (%)	0	6 (13)
28-day non survivors, n (%)	3 (33)	17 (38)
Infection diagnosis, n (%)		
Microbiology	5 (56)	24 (53)
Radiology	2 (22)	6 (13)
Surgery	0 (0)	11 (24)
Microbiologically documented, n (%)		
Bacilli gram -	4 (40)	21 (50)
Cocci gram +	4 (40)	14 (33)
Fungi	2 (20)	0 (0)
Other	0 (0)	7 (17)
Type of infection, n (%)		
Community acquired	5 (56)	29 (64)
Nosocomial	4 (44)	16 (36)
Site of infection, n (%)		
Pulmonary	2 (22)	15 (33)
Abdominal	0 (0)	13 (29)
Others	7 (78)	17 (38)
Secondary nosocomial infections, n (%)	4 (44)	9 (20)
Immunologic parameters		
mHLA-DR Day 3-4 (AB/C)	7415 [1276-8781]	4935 [3369-7264]

Absolute CD4+ T cell count (Day 3-4)	521 [227-715]	422 [189-594]
Percentage of Treg (Day 3-4)	6.5 [4.8-13.4]	8.2 [2.1-10.8]

Blood samples were obtained from two cohorts: the transcriptomic cohort (cohort A) with 9 septic shock patients and the phenotypic cohort (cohort B) with 45 patients. Continuous data and biological parameters are presented as medians and interquartile ranges [Q1-Q3]. For clinical parameters, categorical data are presented as number of cases and percentages among the total population in brackets. SAPS II (Simplified Acute Physiology Score II) and McCabe scores were calculated after admission. SOFA (Sequential Organ Failure Assessment) score was measured after 24h of ICU stay. mHLA-DR was expressed as numbers of anti-HLA-DR antibodies bound per monocyte (AB/C) (Normal value from age-matched healthy volunteers is >15 000 AB/C). Count of CD4+ lymphocytes (cells/ μ l), percentage of T regulatory lymphocytes (Treg) and monocyte HLA-DR were measured 3 or 4 days after the onset of shock.

REFERENCES

- [1] M.M. Levy, A. Artigas, G.S. Phillips, A. Rhodes, R. Beale, T. Osborn, J.L. Vincent, S. Townsend, S. Lemeshow, R.P. Dellinger, Outcomes of the Surviving Sepsis Campaign in intensive care units in the USA and Europe: a prospective cohort study, *Lancet Infect Dis* 12(12) (2012) 919-24.
- [2] F.B. Mayr, S. Yende, D.C. Angus, Epidemiology of severe sepsis, *Virulence* 5(1) (2014) 4-11.
- [3] J.P. Quenot, C. Biquet, F. Kara, O. Martinet, F. Ganster, J.C. Navellou, V. Castelain, D. Barraud, J. Cousson, G. Louis, P. Perez, K. Kuteifan, A. Noiro, J. Badie, C. Mezher, H. Lessire, A. Pavon, E. Study Group, The epidemiology of septic shock in French intensive care units: the prospective multicenter cohort EPISS study, *Crit Care* 17(2) (2013) R65.
- [4] A. Pavon, C. Biquet, F. Kara, O. Martinet, F. Ganster, J.C. Navellou, V. Castelain, D. Barraud, J. Cousson, G. Louis, P. Perez, K. Kuteifan, A. Noiro, J. Badie, C. Mezher, H. Lessire, C. Quantin, M. Abrahamowicz, J.P. Quenot, Profile of the risk of death after septic shock in the present era: an epidemiologic study, *Crit Care Med* 41(11) (2013) 2600-9.
- [5] R.S. Hotchkiss, G. Monneret, D. Payen, Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy, *Nat Rev Immunol* 13(12) (2013) 862-74.
- [6] D.C. Angus, T. van der Poll, Severe sepsis and septic shock, *N Engl J Med* 369(9) (2013) 840-51.
- [7] R.S. Hotchkiss, G. Monneret, D. Payen, Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach, *Lancet Infect Dis* 13(3) (2013) 260-8.
- [8] G. Monneret, M.E. Finck, F. Venet, A.L. Debar, J. Bohe, J. Bienvenu, A. Lepape, The anti-inflammatory response dominates after septic shock: association of low monocyte HLA-DR expression and high interleukin-10 concentration, *Immunol Lett* 95(2) (2004) 193-8.
- [9] B. Amulic, C. Cazalet, G.L. Hayes, K.D. Metzler, A. Zychlinsky, Neutrophil function: from mechanisms to disease, *Annu Rev Immunol* 30 (2012) 459-89.
- [10] A. Mantovani, M.A. Cassatella, C. Costantini, S. Jaillon, Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity, *Nat Rev Immunol* 11(8) (2011) 519-31.
- [11] K.A. Brown, S.D. Brain, J.D. Pearson, J.D. Edgeworth, S.M. Lewis, D.F. Treacher, Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis, *Lancet* 368(9530) (2006) 157-69.
- [12] M.A. Kovach, T.J. Standiford, The function of neutrophils in sepsis, *Curr Opin Infect Dis* 25(3) (2012) 321-7.
- [13] X. Lu, C. Lv, Y. Qu, Y. Luo, B. Lin, L. Zhan, Y. Song, Z. Fan, Sepsis-induced impairment of neutrophil chemotaxis on a microfluidic chip, *Immunol Lett* 173 (2016) 55-60.
- [14] J. Pillay, V.M. Kamp, E. van Hoffen, T. Visser, T. Tak, J.W. Lammers, L.H. Ulfman, L.P. Leenen, P. Pickkers, L. Koenderman, A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1, *J Clin Invest* 122(1) (2012) 327-36.

- [15] S. de Kleijn, J.D. Langereis, J. Leentjens, M. Kox, M.G. Netea, L. Koenderman, G. Ferwerda, P. Pickkers, P.W. Hermans, IFN-gamma-stimulated neutrophils suppress lymphocyte proliferation through expression of PD-L1, *PLoS One* 8(8) (2013) e72249.
- [16] V.M. Kamp, J. Pillay, J.W. Lammers, P. Pickkers, L.H. Ulfman, L. Koenderman, Human suppressive neutrophils CD16bright/CD62Ldim exhibit decreased adhesion, *J Leukoc Biol* 92(5) (2012) 1011-20.
- [17] J. Demaret, F. Venet, A. Friggeri, M.A. Cazalis, J. Plassais, L. Jallades, C. Malcus, F. Poitevin-Later, J. Textoris, A. Lepape, G. Monneret, Marked alterations of neutrophil functions during sepsis-induced immunosuppression, *J Leukoc Biol* (2015).
- [18] R.C. Bone, R.A. Balk, F.B. Cerra, R.P. Dellinger, A.M. Fein, W.A. Knaus, R.M. Schein, W.J. Sibbald, Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine, *Chest* 101(6) (1992) 1644-55.
- [19] M. Singer, C.S. Deutschman, C.W. Seymour, M. Shankar-Hari, D. Annane, M. Bauer, R. Bellomo, G.R. Bernard, J.D. Chiche, C.M. Coopersmith, R.S. Hotchkiss, M.M. Levy, J.C. Marshall, G.S. Martin, S.M. Opal, G.D. Rubenfeld, T. van der Poll, J.L. Vincent, D.C. Angus, The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3), *JAMA* 315(8) (2016) 801-10.
- [20] J. Demaret, A. Walencik, M.C. Jacob, J.F. Timsit, F. Venet, A. Lepape, G. Monneret, Inter-laboratory assessment of flow cytometric monocyte HLA-DR expression in clinical samples, *Cytometry B Clin Cytom* 84(1) (2013) 59-62.
- [21] F. Venet, A.C. Lukaszewicz, D. Payen, R. Hotchkiss, G. Monneret, Monitoring the immune response in sepsis: a rational approach to administration of immunoadjuvant therapies, *Curr Opin Immunol* 25(4) (2013) 477-83.
- [22] F. Venet, C.S. Chung, H. Kherouf, A. Geeraert, C. Malcus, F. Poitevin, J. Bohe, A. Lepape, A. Ayala, G. Monneret, Increased circulating regulatory T cells (CD4(+)CD25 (+)CD127 (-)) contribute to lymphocyte anergy in septic shock patients, *Intensive Care Med* 35(4) (2009) 678-86.
- [23] R.C. Gentleman, V.J. Carey, D.M. Bates, B. Bolstad, M. Dettling, S. Dudoit, B. Ellis, L. Gautier, Y. Ge, J. Gentry, K. Hornik, T. Hothorn, W. Huber, S. Iacus, R. Irizarry, F. Leisch, C. Li, M. Maechler, A.J. Rossini, G. Sawitzki, C. Smith, G. Smyth, L. Tierney, J.Y. Yang, J. Zhang, Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics, *Genome Biol* 5(10) (2004) R80.
- [24] M.N. McCall, P.N. Murakami, M. Lueck, W. Huber, R.A. Irizarry, Assessing affymetrix GeneChip microarray quality, *BMC Bioinformatics* 12 (2011) 137.
- [25] G. Bindea, B. Mlecnik, H. Hackl, P. Charoentong, M. Tosolini, A. Kirilovsky, W.H. Fridman, F. Pages, Z. Trajanoski, J. Galon, ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks, *Bioinformatics* 25(8) (2009) 1091-3.

- [26] M.E. Smoot, K. Ono, J. Ruscheinski, P.L. Wang, T. Ideker, Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization, *Bioinformatics* 27(3) 431-2.
- [27] G.K. Smyth, Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments, *Stat Appl Genet Mol Biol* 3 (2004) Article3.
- [28] M. Jeanmougin, A. de Reynies, L. Marisa, C. Paccard, G. Nuel, M. Guedj, Should we abandon the t-test in the analysis of gene expression microarray data: a comparison of variance modeling strategies, *PLoS One* 5(9) (2010) e12336.
- [29] K. Matsuo, A. Lin, J.L. Procter, L. Clement, D. Stroncek, Variations in the expression of granulocyte antigen NB1, *Transfusion* 40(6) (2000) 654-62.
- [30] N. Hu, H. Mora-Jensen, K. Theilgaard-Monch, B. Doornbos-van der Meer, M.G. Huitema, C.A. Stegeman, P. Heeringa, C.G. Kallenberg, J. Westra, Differential expression of granulopoiesis related genes in neutrophil subsets distinguished by membrane expression of CD177, *PLoS One* 9(6) (2014) e99671.
- [31] F. Passamonti, D. Pietra, L. Malabarba, E. Rumi, M.G. Della Porta, L. Malcovati, M. Bonfichi, C. Pascutto, M. Lazzarino, M. Cazzola, Clinical significance of neutrophil CD177 mRNA expression in Ph-negative chronic myeloproliferative disorders, *Br J Haematol* 126(5) (2004) 650-6.
- [32] E. Guerin, M. Orabona, M.A. Raquil, B. Giraudeau, R. Bellier, S. Gibot, M.C. Bene, F. Lacombe, N. Droin, E. Solary, P. Vignon, J. Feuillard, B. Francois, Circulating immature granulocytes with T-cell killing functions predict sepsis deterioration*, *Crit Care Med* 42(9) (2014) 2007-18.
- [33] B.H. Segal, T.L. Leto, J.I. Gallin, H.L. Malech, S.M. Holland, Genetic, biochemical, and clinical features of chronic granulomatous disease, *Medicine (Baltimore)* 79(3) (2000) 170-200.
- [34] A.W. Segal, How neutrophils kill microbes, *Annu Rev Immunol* 23 (2005) 197-223.
- [35] D.M. Maslove, H.R. Wong, Gene expression profiling in sepsis: timing, tissue, and translational considerations, *Trends Mol Med* 20(4) (2014) 204-13.
- [36] P.C. Rodriguez, A.C. Ochoa, Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives, *Immunol Rev* 222 (2008) 180-91.
- [37] S. de Kleijn, M. Kox, I.E. Sama, J. Pillay, A. van Diepen, M.A. Huijnen, J.G. van der Hoeven, G. Ferwerda, P.W. Hermans, P. Pickkers, Transcriptome kinetics of circulating neutrophils during human experimental endotoxemia, *PLoS One* 7(6) (2012) e38255.
- [38] S. Klippel, E. Strunck, C.E. Busse, D. Behringer, H.L. Pahl, Biochemical characterization of PRV-1, a novel hematopoietic cell surface receptor, which is overexpressed in polycythemia rubra vera, *Blood* 100(7) (2002) 2441-8.
- [39] D.F. Stroncek, K.M. Skubitz, J.J. McCullough, Biochemical characterization of the neutrophil-specific antigen NB1, *Blood* 75(3) (1990) 744-55.

- [40] K. Kissel, S. Santoso, C. Hofmann, D. Stroncek, J. Bux, Molecular basis of the neutrophil glycoprotein NB1 (CD177) involved in the pathogenesis of immune neutropenias and transfusion reactions, *Eur J Immunol* 31(5) (2001) 1301-9.
- [41] S. Temerinac, S. Klippel, E. Strunck, S. Roder, M. Lubbert, W. Lange, M. Azemar, G. Meinhardt, H.E. Schaefer, H.L. Pahl, Cloning of PRV-1, a novel member of the uPAR receptor superfamily, which is overexpressed in polycythemia rubra vera, *Blood* 95(8) (2000) 2569-76.
- [42] L. Caruccio, M. Bettinotti, A.E. Director-Myska, D.C. Arthur, D. Stroncek, The gene overexpressed in polycythemia rubra vera, PRV-1, and the gene encoding a neutrophil alloantigen, NB1, are alleles of a single gene, CD177, in chromosome band 19q13.31, *Transfusion* 46(3) (2006) 441-7.
- [43] K. Gohring, J. Wolff, W. Doppl, K.L. Schmidt, K. Fenchel, H. Pralle, U. Sibelius, J. Bux, Neutrophil CD177 (NB1 gp, HNA-2a) expression is increased in severe bacterial infections and polycythaemia vera, *Br J Haematol* 126(2) (2004) 252-4.
- [44] D.F. Stroncek, W. Jaszcz, G.P. Herr, M.E. Clay, J. McCullough, Expression of neutrophil antigens after 10 days of granulocyte-colony-stimulating factor, *Transfusion* 38(7) (1998) 663-8.
- [45] Y. Orr, J.M. Taylor, P.G. Bannon, C. Geczy, L. Kritharides, Circulating CD10-/CD16low neutrophils provide a quantitative index of active bone marrow neutrophil release, *Br J Haematol* 131(4) (2005) 508-19.
- [46] U.J. Sachs, C.L. Andrei-Selmer, A. Maniar, T. Weiss, C. Paddock, V.V. Orlova, E.Y. Choi, P.J. Newman, K.T. Preissner, T. Chavakis, S. Santoso, The neutrophil-specific antigen CD177 is a counter-receptor for platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31), *J Biol Chem* 282(32) (2007) 23603-12.
- [47] M. Lill, S. Koks, U. Soomets, L.C. Schalkwyk, C. Fernandes, I. Lutsar, P. Taba, Peripheral blood RNA gene expression profiling in patients with bacterial meningitis, *Front Neurosci* 7 (2013) 33.
- [48] J.J. Hoffmann, Neutrophil CD64: a diagnostic marker for infection and sepsis, *Clin Chem Lab Med* 47(8) (2009) 903-16.
- [49] D. Vieira da Silva Pellegrina, P. Severino, H. Vieira Barbeiro, F. Maziero Andreghetto, I. Tadeu Velasco, H. Possolo de Souza, M.C. Machado, E.M. Reis, F. Pinheiro da Silva, Septic Shock in Advanced Age: Transcriptome Analysis Reveals Altered Molecular Signatures in Neutrophil Granulocytes, *PLoS One* 10(6) (2015) e0128341.

Figure 1

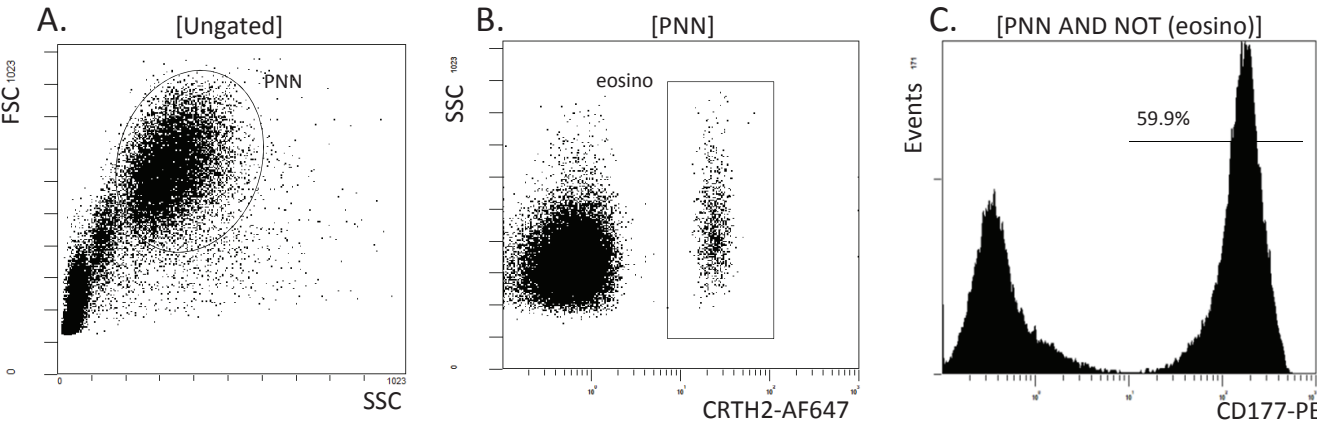
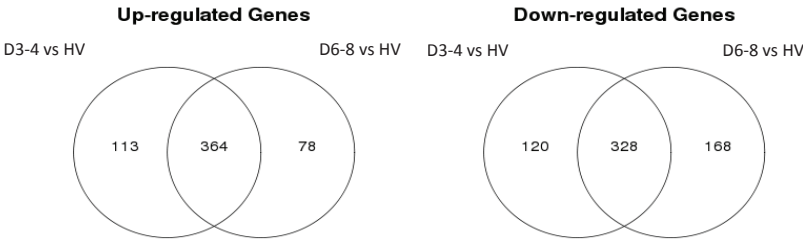


Figure 2

A.



B.

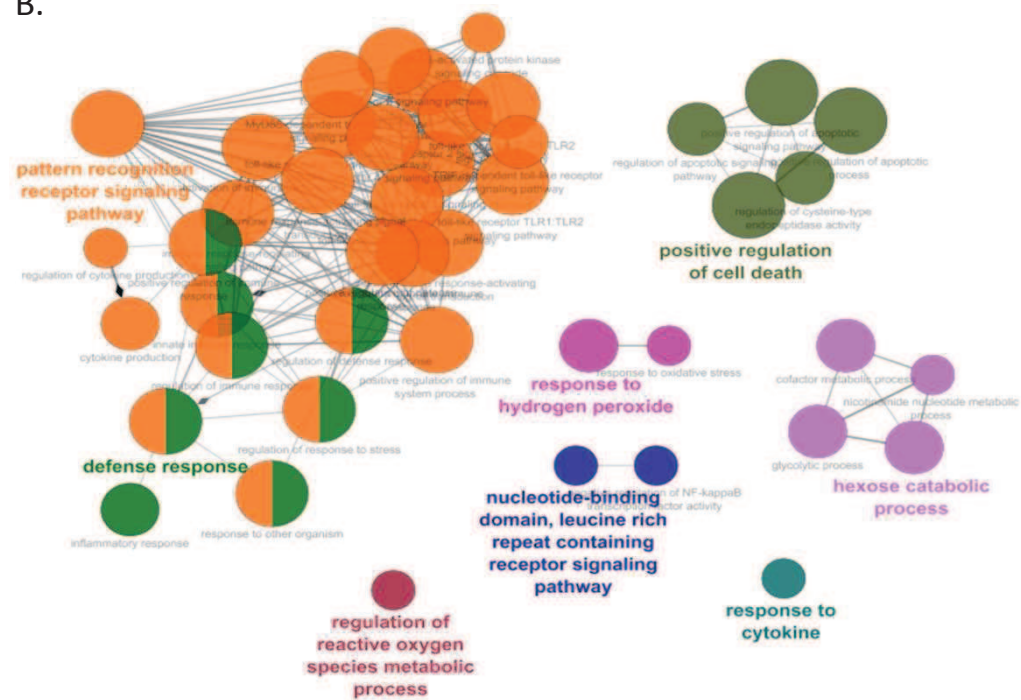
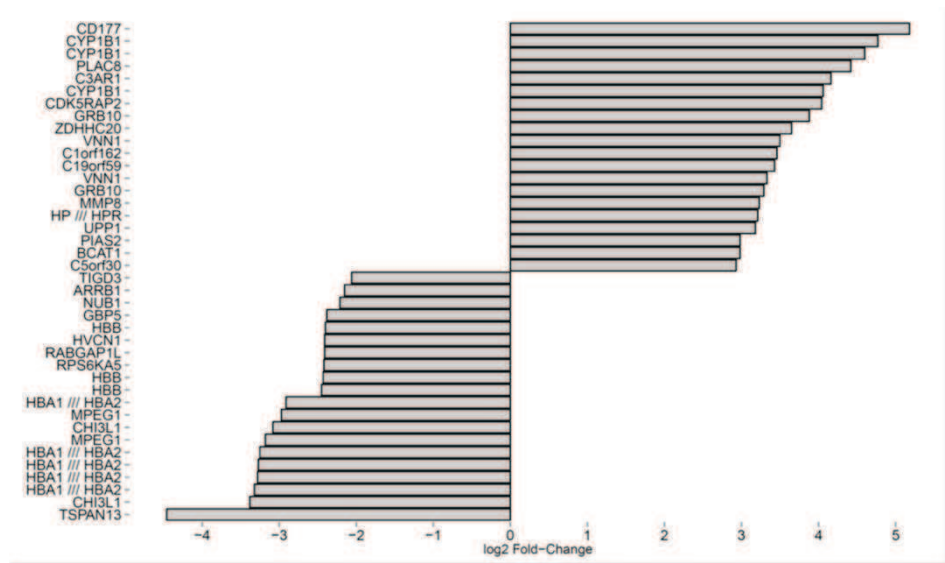


Figure 3

A. Comparison between septic shock patients at D3-4 and healthy volunteers



B. Comparison between septic shock patients at D6-8 and healthy volunteers

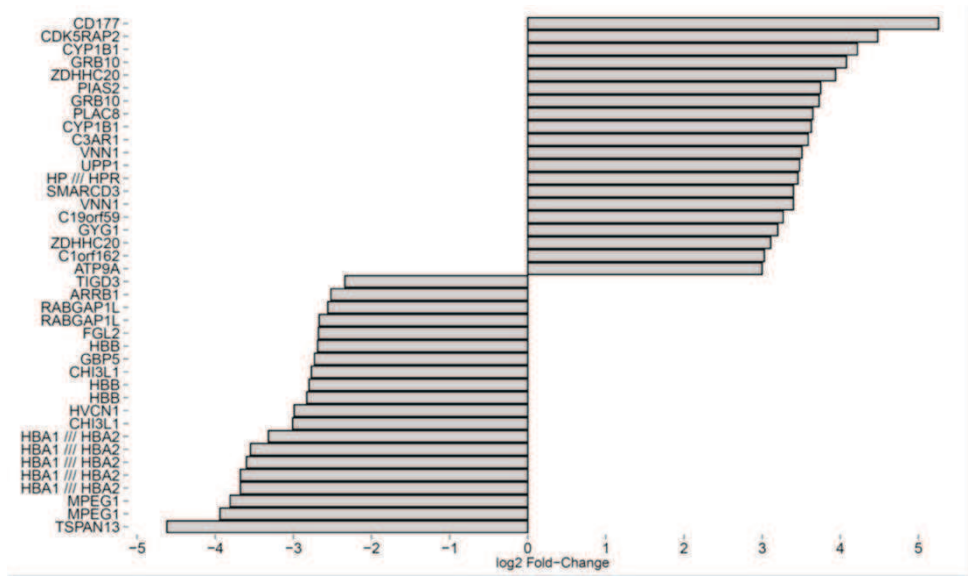
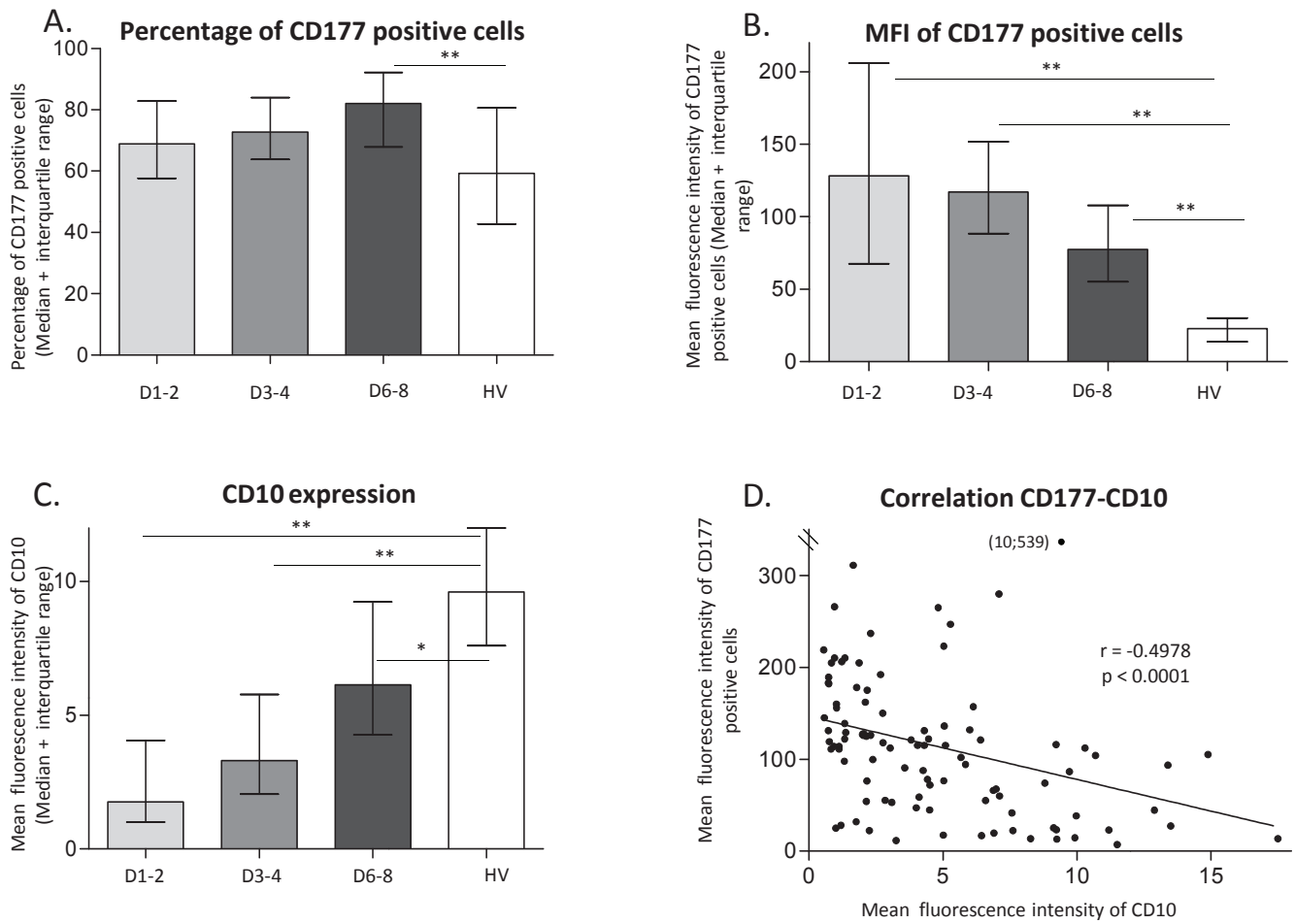


Figure 4



3. DISCUSSION

Malgré des progrès dans sa prise en charge, le sepsis représente toujours la première cause de décès dans les services de réanimation (1). La réponse immunitaire au cours du choc septique associe une réponse inflammatoire initiale importante responsable de l'état de choc et le développement secondaire d'altérations du système immunitaire (3). De plus, un lien existe entre l'intensité et la durée de l'état d'immunosuppression d'une part et le risque de développement d'infection nosocomiale secondaire et de décès chez les patients d'autre part. Il est donc nécessaire de mieux comprendre la réponse immunitaire des patients septiques afin de proposer des thérapeutiques individualisées et adaptées (15). Il faut pour cela améliorer les outils de monitoring et étudier de manière exhaustive les différents acteurs de l'immunité innée et adaptative. De nombreuses études portent d'ailleurs sur leurs altérations, associées parfois à des issues cliniques défavorables (15).

Néanmoins, à ce jour, peu d'éléments sont connus sur le rôle des polynucléaires neutrophiles dans la phase immunosuppressive du choc septique dans la mesure où les études publiées ces dernières années se sont surtout focalisées sur les altérations des PNN lors de la phase précoce pro-inflammatoire du choc. Cependant, des travaux récents leur conférant des propriétés immunosuppressives ont mis en relief une potentielle implication des neutrophiles dans la phase anti-inflammatoire du choc (5-8).

L'objectif principal de ce travail de thèse était donc d'étudier les altérations phénotypiques et fonctionnelles des polynucléaires neutrophiles chez des patients en choc septique sur des prélèvements tardifs, pendant la phase d'immunosuppression (J3-4 et J6-8 après le début du choc), en comparaison à des volontaires sains.

En parallèle, nous avons évalué différents protocoles de cytométrie en flux afin d'améliorer le monitoring des patients et de manière plus générale, la recherche translationnelle. Cet aspect, plus technologique, représente le premier point de discussion.

I. AMELIORATIONS DES OUTILS EN RECHERCHE TRANSLATIONNELLE

Les méthodes d'analyse des cellules individuelles sont essentielles pour la compréhension des fonctions des cellules normales et la possibilité de modulation des cellules pathologiques. La cytométrie en flux (CMF) est née du besoin d'automatisation du comptage des constituants cellulaires du sang. Elle est ainsi devenue une technique standard afin de détecter à haut débit, des marqueurs protéiques sur des cellules individualisées. Elle est désormais adoptée aussi bien en

recherche qu'en routine clinique. Néanmoins, elle peut également être chronophage, en particulier pour les marquages intracellulaires ou les phosphoantigènes. De plus, une étape importante dans la validation de la CMF comme outil d'étude est de s'assurer de sa robustesse et de sa standardisation.

a) Améliorations techniques

En collaboration avec Immunotech, nous avons eu la possibilité de développer et tester pour la première fois de nouveaux protocoles de marquages intracellulaires, adaptés à la cytométrie en flux.

Nous avons d'abord évalué le **marquage FOXP3**.

Les lymphocytes T régulateurs constituent une sous-population cellulaire importante dans la régulation immunitaire. Ils sont capables de supprimer les réponses immunitaires pathologiques dirigées contre des antigènes extérieurs ou du soi. De manière plus spécifique, les Treg pourraient jouer un rôle dans la réponse immunitaire et seraient affectés par un traumatisme ou un sepsis (158). Ceci grâce à leur implication directe avec des composants de l'immunité innée et adaptative. De plus, l'analyse des Treg est de plus en plus considérée dans le développement de nouvelles stratégies d'immunothérapies. Par conséquent, une quantification précise pendant le protocole de traitement est cruciale. Il existe des marqueurs de surface de substitution plus ou moins représentatifs comme l'expression de la chaîne α du récepteur à l'IL-2, le CD25 ou la faible expression du récepteur à l'IL-7, CD127 (368). Néanmoins, le marqueur de référence des Treg reste leur facteur de transcription FOXP3 (*forkhead box protein 3*) (369). La nécessité de perméabiliser les cellules afin d'atteindre FOXP3 rend leur étude plus hasardeuse. En effet, non seulement cette technique prend du temps, mais elle est responsable de perte cellulaire, d'une réduction de la fluorescence conjuguée aux anticorps aboutissant à une quantification imprécise.

A partir de cette problématique, nous avons montré la robustesse d'un nouveau protocole de perméabilisation en cytométrie en flux, en sang total (370). Il présentait de nombreux avantages : une technique en une étape réalisée en seulement 90 minutes, pas besoin de contrôle isotypique grâce à son meilleur pouvoir discriminant. Cette méthode apparaît adéquate pour une utilisation en routine et dans des études cliniques prospectives en sang total.

Le développement d'anticorps phospho-spécifiques dirigés contre des épitopes uniques a constitué une étape importante dans l'analyse des phosphoantigènes par cytométrie en flux et ouvre la voie sur des perspectives d'études fonctionnelles. De plus, des marquages multiparamétriques, incluant à la fois des marqueurs de surface et intracellulaire, permettent l'étude ciblée d'évènements

dans des sous-populations cellulaires données (371). Pourtant, encore ici, le besoin de perméabilisation cellulaire et de purification est chronophage et les résultats demeurent difficilement reproductibles et donc standardisables. Nous avons réussi à détecter la phosphorylation de STAT5 en une étape, sur sang total, dans des échantillons cliniques (372). De plus, nous avons utilisé le marquage intracellulaire de FOXP3 précédemment développé afin de mesurer spécifiquement la phosphorylation de STAT5 dans les lymphocytes T régulateurs et dans les cellules CD4+FOXP3- en réponse à des cytokines. Ce nouveau test fonctionnel sur sang total est réalisable en 70 minutes (372). Ce travail illustre l'intérêt d'une approche de cytométrie en flux dans le monitoring des réponses pharmacologiques en pratique clinique quotidienne. A partir de cette étude préliminaire, nous avons par la suite investigué la réponse *ex vivo* de sous-populations lymphocytaires de patients en choc septique après stimulation par des doses croissantes de rhIL-7 grâce à la mesure de la phosphorylation de STAT5 par cytométrie en flux. De manière intéressante, elle était significativement plus faible chez les patients non-survivants (373). Même si ce protocole ne peut pas tout à fait être considéré comme un test fonctionnel à proprement parler (comme la mesure de la prolifération lymphocytaire ou la production de cytokines), il permet d'examiner la réponse cellulaire immédiate à une cytokine donnée. Ainsi, une telle méthode pourrait représenter un outil biologique innovant en pratique clinique quotidienne pour monitorer la réponse pharmacologique des cytokines à la suite de l'administration de biothérapies dans différents contextes et notamment pour l'IL-7 impliquée dans plusieurs essais cliniques.

b) Standardisation du monitoring clinique

Les molécules du complexe HLA-DR font partie du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II. Elles participent à la présentation de l'antigène aux lymphocytes, étape clé du déclenchement de la réponse immunitaire spécifique. La diminution de leur expression est proposée comme étant le reflet d'une perte de fonctionnalité. De plus, il a été montré que la perte de HLA-DR à la surface des monocytes (mHLA-DR) est également associée à leur incapacité à produire des cytokines inflammatoires (374). Ainsi, étudier l'expression de mHLA-DR constitue un test facile à réaliser et est le reflet de la fonctionnalité des monocytes. En conditions normales, tous les monocytes d'un sujet sain expriment les molécules d'HLA-DR alors que lors de l'immunodépression acquise en réanimation, on observe une baisse de cette expression dans les premiers jours suivant l'agression primaire. A l'heure actuelle, la perte d'expression du HLA-DR à la surface des monocytes est largement étudiée et est proposée comme marqueur de défaillance immune post-agression (128, 375). Dans de nombreuses études, la survenue d'infections nosocomiales et/ou la mortalité sont

associées à une diminution persistante de mHLA-DR (sepsis, polytraumatismes, brûlures, arrêt cardiaque...) (129). Au cours du choc septique, la perte d'expression de mHLA-DR est corrélée à la sévérité et à une évolution défavorable (141). La mesure de mHLA-DR aurait donc une valeur pronostique (129).

Afin de pouvoir l'utiliser comme biomarqueur pronostique, il est nécessaire de standardiser ces éléments, surtout en vue d'études multicentriques. Nous avons pour cela, réalisé une étude clinique inter-laboratoires entre Lyon et Grenoble. Les prélèvements ont été techniqués simultanément entre les deux sites, avec le même protocole de marquage. Les résultats ont ensuite été analysés sur deux cytomètres différents (Navios et FACS CANTO II). Même si ce travail aurait mérité d'être réalisé sur une cohorte plus importante, il souligne la robustesse de cette méthode et son intérêt dans des études multicentriques (376). Le mHLA-DR peut ainsi être considéré comme un biomarqueur capable d'identifier les patients candidats pour une thérapie immunostimulante. Sur la base de cette technique, un PHRC est actuellement en cours, étudiant l'administration de GM-CSF chez des patients en choc septique avec une expression de mHLA-DR inférieure à 8 000 (AB/C, nombre d'anticorps fixé par cellule) en France (NCT02361528).

L'IL-7 semble être un bon candidat dans le traitement du choc septique. Dans les essais cliniques (175, 377), cette cytokine a été utilisée dans le traitement des patients présentant des lymphopénies idiopathiques ou des pathologies induites par une lymphopénie sévère (patients infectés par le VIH avec lymphopénie persistante en dépit d'une thérapie antirétrovirale efficace). À l'heure actuelle, les premiers résultats sont prometteurs. L'IL-7 induit une augmentation rapide de cellules T circulantes (l'effet est stable plusieurs mois), une augmentation de la diversité du répertoire et une diminution du pourcentage de Treg circulants. Plus de 500 patients ont reçu de l'IL-7 dans différentes situations cliniques et aucun effet indésirable notoire n'a été signalé. Ainsi, en considérant les altérations lymphocytaires observées chez les patients septiques, l'IL-7 est récemment apparue comme une molécule possible dans le traitement des états septiques sévères. L'IL-7 fait d'ailleurs actuellement l'objet d'un essai clinique multicentrique (Lyon constitue l'un des 2 centres français) incluant des patients lymphopéniques (Valeur absolue lymphocytes < 0.9 G/l) (NCT02640807). Les effets biologiques de l'IL-7 sont médiés via le récepteur hétérodimérique IL-7R, composé d'une chaîne α (CD127) et d'une chaîne commune à d'autres récepteurs de cytokines (γ c ou CD132). Des formes de CD127 soluble (CD127s) ont été rapportées chez des sujets sains et leucémiques : il s'agirait de variants tronqués d'épissage ayant perdu le domaine transmembranaire et une partie du domaine intracellulaire (378). La forme soluble de CD127 garde cependant la

capacité à lier l'IL-7. En vue de l'utilisation de l'IL-7 pour traiter les patients septiques, nous avons ainsi étudié s'il existait une association entre le CD127s et l'occurrence d'évènements indésirables et donc si celui-ci pouvait constituer un biomarqueur d'intérêt pour la stratification des malades (379). Nous avons réalisé une étude mesurant le CD127s par une méthode ELISA sur une cohorte de 70 patients en choc septique et 41 volontaires sains (379). Nos résultats mettent en avant l'intérêt de la mesure du CD127s plasmatique dans l'identification d'un groupe de patients à risque plus important de décès. Grâce à une étude complémentaire plus poussée sur les corrélations et aspects fonctionnels, nous pourrions imaginer d'utiliser ce biomarqueur dans la stratification des patients dans des essais cliniques utilisant des thérapies immunoadjuvantes comme l'IL-7. Une étape importante pour l'utilisation future du CD127s comme biomarqueur est d'optimiser le test ELISA utilisé et ainsi permettre sa standardisation. Ce travail d'optimisation a été réalisé au sein du laboratoire commun de recherche HCL-BioMérieux et a été validé sur une cohorte de confirmation plus importante (cohorte MIP-réa, n=750 patients, article en préparation)

Ainsi, la première partie de ce travail a porté sur des aspects plus techniques de standardisation et de mise au point de protocoles, notamment en cytométrie en flux. La nécessité de travailler avec des outils performants et optimisés est une étape importante dans la recherche translationnelle. Même si nos travaux manquaient parfois d'effectifs (études de type preuve de concept) et donc certainement de puissance statistique, nous avons pu montrer l'intérêt de nouvelles approches. Ces outils méritent maintenant d'être évalués dans des cohortes plus importantes.

II. ETUDE DES PNN AU COURS DE LA PHASE IMMUNOSUPPRESSIVE DU CHOC SEPTIQUE

Les polynucléaires neutrophiles sont indispensables à la défense contre les micro-organismes. Grâce à leur rôle de sentinelle, ils constituent la première ligne de défense du système immunitaire inné. Néanmoins, peu d'études ont été réalisées jusqu'ici sur l'exploration de potentielles altérations phénotypiques et fonctionnelles des PNN dans le choc septique. La plupart d'entre elles portent sur des prélèvements précoces après le début du choc et les données restent parcellaires et controversées (139, 313). Des données récentes de la littérature (5-8) proposent un nouveau rôle immunosuppresseur des PNN, suggérant l'implication potentielle de ces cellules dans la physiopathologie du choc septique. C'est dans ce contexte que nous avons réalisé une étude observationnelle prospective des altérations phénotypiques, fonctionnelles et transcriptomiques des neutrophiles lors de la phase immunosuppressive du choc septique. Cette étude s'est effectuée sur une cohorte de patients prélevés quelques jours après le début du choc comparés à des volontaires

sains. L'objectif était d'explorer les principales fonctions des PNN : activation, chimiotactisme, phagocytose et métabolisme oxydatif.

Alors que la plupart des études existantes mettent en avant une « hyper » activation des PNN au début du choc (139), nos résultats lors de la phase immunosuppressive montrent plutôt une diminution de la capacité de migration des PNN ainsi qu'une diminution de la production de composés bactéricides (espèces réactives de l'oxygène, myéloperoxydase, lactoferrine) alors que la réponse aux cytokines (IL-8 et GM-CSF) et la phagocytose (après stimulation par *E. coli*) n'apparaissent pas altérées.

a) Chimiotactisme

En conditions normales, la L-sélectine, présente à la surface des neutrophiles interagit avec des molécules de faible affinité à la surface des cellules endothéliales. Cette interaction permet aux neutrophiles de s'attacher faiblement et ainsi de « rouler » sur la paroi du vaisseau, emportés par le flux sanguin. Si les PNN entrent en contact avec un produit proinflammatoire ou infectieux (LPS, fMLP), ils s'activent et expriment à leur surface des molécules d'adhésion de forte affinité : les intégrines. Simultanément, les cellules endothéliales vont alors exprimer des molécules d'adhésion de la superfamille des immunoglobulines (I-CAM, V-CAM). Cette nouvelle interaction permet aux neutrophiles de se fixer fermement à la paroi du vaisseau sanguin et de traverser ensuite la couche de cellules endothéliales, guidés par un gradient de chimioattractants (IL-8, C5a)(202). Dans notre cohorte, nous observons une diminution de l'expression de la L-sélectine CD62L et de l'intégrine CD11b. Peu de littérature existe sur la mesure de l'expression du CD62L et du CD11b sur des prélèvements plus tardifs (*i.e.*, pendant l'immunosuppression). Néanmoins, les résultats des travaux réalisés pendant la phase pro-inflammatoire du sepsis montrent plutôt une augmentation du CD11b. Elle est d'ailleurs associée à un risque de défaillance d'organes (380) ou à la sévérité (136). Muller Kobold *et al.* soulignent également, sur des patients en sepsis, un lien entre l'expression augmentée du CD11b et la mortalité avec une expression plus importante chez les survivants (330). Le CD11b et le CD62L sont également considérés comme des marqueurs d'activation. En effet, l'augmentation d'expression du CD11b associée à une perte d'expression du CD62L caractérise des PNN activés (381). Nous avons ainsi mesuré ces variations d'expressions après une stimulation avec du fMLP ou de l'IL-8 et le même schéma d'expression était retrouvé chez les patients dans la phase immunosuppressive post-choc septique et les volontaires sains. Les neutrophiles des patients semblaient toujours « activables ». Ainsi, la diminution d'expression observée dans notre cohorte est

plus souvent retrouvée. Par exemple, Rogowski et al. mettent en avant cette down-régulation chez des patients présentant des contextes inflammatoires variés (382).

Les chimiokines tiennent un rôle important dans le recrutement et l'activation des PNN. L'interleukine-8 est un acteur essentiel pour la migration des neutrophiles dans de nombreux contextes inflammatoires chez l'homme et l'animal (4). La réponse à l'IL-8 est médiée par l'interaction avec deux récepteurs de haute affinité : CXCR1 et CXCR2. Ces récepteurs ont différents ligands présentant des affinités variables : alors qu'ils interagissent avec l'IL-8 avec une affinité équivalente, CXCR2 fixe également d'autres chimiokines telles que GRO- α (CXCL1), GRO- β (CXCL2) et GRO- γ (CXCL3). Chishti *et al.* ont montré une diminution de l'expression de CXCR2 jusqu'à 5 jours après le début du choc par rapport à une cohorte de volontaires sains, alors que l'expression de CXCR1 reste inchangée (136). Nous avons choisi d'étudier en parallèle l'expression des deux récepteurs et la migration des PNN en réponse au fMLP, à l'IL-8 et GRO- α . Nous observons une diminution de l'expression des récepteurs chez les patients ainsi qu'entre les 2 prélèvements pour un même patient. A J3-4, nous pouvons également noter une réduction du nombre de neutrophiles ayant migré après stimulation avec un chimioattractant. Cette altération du chimiotactisme en réponse à l'IL-8 et GRO- α peut être en partie expliquée par la diminution des récepteurs CXCR1 et CXCR2 à la surface des PNN. Pourtant, alors que l'expression des récepteurs aux chimiokines est diminuée entre les prélèvements à J3-4 et J6-8, on ne retrouve pas d'altération significative du nombre de neutrophiles ayant migré en réponse à l'IL-8 et GRO- α , à J6-8. Il est à noter qu'une étude de l'évolution dans le temps du chimiotactisme entre les 2 prélèvements, comme réalisée pour les récepteurs aux chimiokines, n'est pas possible dans notre étude car il s'agit de patients différents à J3-4 et J6-8. Il serait également intéressant de doser les chimiokines chez ces patients afin d'évaluer si un rétrocontrôle existe. Des cytokines comme le TNF- α , présentes au début du choc, sont capables de diminuer l'expression des CXCRs *in vitro* (383). Néanmoins, d'autres mécanismes sont certainement en jeu puisque les neutrophiles des patients répondent également moins bien au fMLP (même à J6-8 – $p = 0.051$).

Dans l'ensemble, les paramètres de chimiotactisme étudiés dans notre cohorte sont diminués.

b) Phagocytose

Une fois activés par des produits bactériens ou des médiateurs endogènes, les neutrophiles traversent les cellules endothéliales pour phagocyter et détruire les pathogènes. Dans de nombreuses études, une augmentation de la phagocytose a été démontrée chez les patients en

sepsis ou en choc septique lors de la phase précoce (138), mettant en avant une augmentation de l'activité des PNN au début du choc. Cependant, d'autres auteurs mettent en évidence une diminution (353) voire aucune altération de la phagocytose (384). Dans notre cohorte de patients quelques jours après le choc, la phagocytose n'est pas significativement différente par rapport aux volontaires sains et entre les 2 prélèvements. Taneja *et al.* obtiennent ce même résultat chez des patients en sepsis sévère mais décrivent une différence dans l'activité phagocytaire des neutrophiles en fonction de leur maturité ; en effet, dans cette étude, les PNN immatures des patients auraient une phagocytose diminuée comparée aux PNN matures. Ainsi, l'activité phagocytaire moindre des PNN immatures contrebalancerait la phagocytose plus importante des neutrophiles matures (354). Drifte *et al.* ont aussi montré une capacité phagocytaire diminuée pour les neutrophiles immatures comparés aux PNN matures chez des patients en sepsis et en SRIS (135). Etant donné que nous mettons également en évidence dans notre cohorte de patients en choc septique, une population de PNN immatures avec un phénotype CD10⁺CD16⁻, nous pourrions expliquer la phagocytose non altérée dans notre cohorte de la même façon. Les capacités de phagocytose des différentes sous-populations pourraient s'équilibrer. Il aurait fallu réaliser des expériences supplémentaires en ajoutant des anticorps anti-CD10 et anti-CD16 dans l'étude de la phagocytose ou réaliser un tri de sous-populations au préalable. Néanmoins, cette solution paraît plus complexe étant donné la fragilité des neutrophiles. Nous aurions pu aussi corroborer nos résultats avec d'autres techniques d'étude de la phagocytose ou en utilisant différents stimulants. Cependant, les neutrophiles de nos patients restant activables par fMLP, l'IL-8 ou le GM-CSF, leur capacité phagocytaire est peut-être tout simplement également conservée.

c) Métabolisme oxydatif/lactoferrine

Le métabolisme oxydatif représente l'un des plus importants mécanismes de défense impliqués dans le contrôle des infections bactériennes (199). La mise en place du métabolisme oxydatif est nécessaire au début d'une infection pour essayer de contenir le pathogène mais la persistance de cette activité peut aussi être délétère pour l'organisme comme le montrent les pathologies décrites dans la première partie. Plusieurs études portant sur des prélèvements précoces, montrent une augmentation de la production d'ERO chez des patients en sepsis, sepsis sévère et choc septique (137). Santos *et al.* comparent la production d'ERO en réponse à *P. aeruginosa* et *S. aureus* chez des patients à J0 et J7 et observent une diminution du métabolisme oxydatif à J7 uniquement avec *S. aureus* (357). Dans notre cohorte, après une stimulation par *E. coli*, nous observons également une diminution de l'index de stimulation (rapport des intensités

moyennes de fluorescence des PNN positifs dans le tube stimulé avec *Escherichia coli* et des PNN négatifs du tube contrôle non stimulé) et donc du métabolisme oxydatif à J3-4 et J6-8.

La myéloperoxydase est une enzyme présente en quantité importante dans les granules primaires des PNN. Grâce à son activité de peroxydase, elle exerce une forte activité antimicrobienne. Une étude réalisée sur 100 patients déficients en myéloperoxydase a montré que ces derniers étaient plus sensibles aux infections sévères et aux pathologies inflammatoires chroniques (385), soulignant l'importance de cette enzyme. Ainsi, la diminution de la myéloperoxydase intracellulaire observée chez nos patients à J3-4 et J6-8 peut en partie expliquer l'affaiblissement du métabolisme oxydatif que nous avons pu apprécier. Sugitharini *et al.* montrent également une diminution d'expression de la MPO dans un contexte de sepsis néonatal (386) et l'associent à un défaut de clairance bactérienne. De plus, la MPO est impliquée dans la formation des NETs (226, 387) et une diminution de son expression pourrait être délétère à un autre mécanisme de destruction des pathogènes.

En parallèle, une diminution de l'expression intracellulaire de la lactoferrine, contenue dans les granules secondaires, est observée à J3-4 et J6-8. Cette glycoprotéine se lie au fer et possède des propriétés bactériostatiques et bactéricides. Cette diminution reste donc en accord avec les altérations fonctionnelles observées dans notre cohorte. L'activité antimicrobienne directe et la capacité d'atténuer les réponses inflammatoires sévères de la lactoferrine ont d'ailleurs été étudiées dans des modèles animaux de sepsis (388, 389). Les résultats prometteurs ont ouvert la voie sur l'intérêt d'utiliser cette molécule chez l'homme. Des études chez les enfants prématurés dans des services de réanimation spécialisés dans la néonatalité ont également donné des résultats intéressants. En effet, dans une étude clinique randomisée, l'administration de lactoferrine bovine par voie entérale chez des enfants de très faible poids de naissance a démontré une réduction dans l'incidence de sepsis tardif ou d'infection fongique invasive (390, 391). Elle a donc été ensuite testée dans le traitement des enfants plus âgés et chez les adultes. Ainsi, une forme recombinante de la lactoferrine, la talactoferrine (TLF) a été testée dans une étude de phase II impliquant 194 patients en sepsis avec au moins une dysfonction d'organe, versus placebo (392). Les patients recevant la TLF par voie orale ont présenté une réduction de la mortalité à 28 jours (mais pas à 6 mois). De plus, cette diminution était plus marquée chez les patients présentant une sévérité plus prononcée avec un score APACHE-II supérieur à 25. A partir de ces résultats, une phase II/III a été entamée (efficacité et inocuité de la TLF chez les patients en sepsis). Néanmoins, l'étude a été stoppée prématurément étant donné le taux de mortalité plus élevé dans le groupe recevant de la talactoferrine.

En conclusion, on observe une nette diminution des composés antibactériens lors de la phase immunosuppressive du choc septique.

d) Réponse aux cytokines

Il est également intéressant d'étudier la réponse des PNN à une éventuelle stimulation par des chimiokines ou cytokines. En effet, lors de la réponse inflammatoire, les neutrophiles se situent au cœur d'échanges avec les autres cellules du système immunitaire. Les PNN constituent à la fois une source et une cible pour une variété de molécules pro-inflammatoires (cytokines : IL-1, TNF- α , chimiokines : IL-8, facteurs de croissance : GM-CSF, G-CSF) et exercent par conséquent une partie de leur activité pro-inflammatoire par une voie d'autorégulation. Nous avons étudié la réponse des PNN des patients après une stimulation à des gradients d'IL-8 et de fMLP en mesurant l'expression du CD11b. En effet, lors de l'activation des PNN, on observe une augmentation du CD11b à la surface des neutrophiles. Ainsi, les neutrophiles des patients à J3-4 présentent une augmentation de l'expression du CD11b en réponse aux gradients d'IL-8, parallèle à celles des volontaires sains.

Nous avons également évalué la phosphorylation de STAT5, un facteur de transcription, en réponse à des doses croissantes de GM-CSF recombinant humain (GM-CSFrh). De même, on ne retrouve aucune altération de la réponse des neutrophiles des patients à J3-4 et J6-8 par rapport aux volontaires sains. Ainsi, les PNN des patients semblent rester activables par différents types de stimuli. Il serait intéressant d'étudier l'expression du récepteur au GM-CSF (CD116) à la surface des PNN chez les patients. Dans une étude de Pangault *et al.*, une diminution de l'expression de ce récepteur à la surface des monocytes chez des patients en choc septique ou en sepsis simple était associée aux marqueurs de sévérité (SAPS II, intensité et nombre de défaillances d'organes). Cette diminution était plus importante chez les patients en choc septique et ceux présentant un évènement défavorable (décès, infection nosocomiale secondaire)(393). Nous pourrions par exemple, comparer l'expression de ce récepteur à la surface des PNN et des monocytes chez les patients et les volontaires sains et la confronter à la réponse au GM-CSFrh via la phosphorylation de STAT5.

e) Marqueurs d'immaturité et phénotype immunosuppresseur

L'étude phénotypique a mis en évidence des différences d'expression de plusieurs marqueurs cellulaires montrant l'apparition de sous-populations de PNN. Nous observons notamment une diminution de l'expression de la L-sélectine CD62L, du récepteur aux IgG FC γ RIII (CD16) et de la néprilysine (CD10) à la surface des PNN.

En particulier, pour un grand nombre de patients, une sous-population distincte

CD10^{dim}CD16^{dim} a été mise en évidence. Le CD16 et le CD10 sont des marqueurs de maturité des neutrophiles et il est à noter que lors de la phase pro-inflammatoire du choc septique (394), il existe un recrutement important de neutrophiles au niveau du pool marginé et de la moelle osseuse, expliquant la présence de PNN immatures. C'est pourquoi nous avons voulu évaluer le stade de maturité de cette sous-population grâce à une étude morphologique. Le tri cellulaire a permis d'isoler différentes sous-populations phénotypiques puis la lecture des lames au microscope optique a mis en évidence des différences de segmentation du noyau et des granulations. Les PNN immatures CD16^{dim}CD10^{dim} semblent être hyposegmentés par rapport aux PNN matures CD16^{bright}CD10^{bright}. Nous observons donc la présence d'une population de PNN immatures en accord avec la littérature. Néanmoins, son faible pourcentage (< 10 %) ne permet pas à lui seul, d'expliquer les altérations fonctionnelles observées chez les patients. Il serait intéressant d'étudier la fonctionnalité des différentes sous-populations, et notamment les PNN immatures CD16^{dim}CD10^{dim}, en cytométrie en flux grâce à un marquage multi-couleurs avec nos marqueurs d'intérêt (le CD16 et le CD10). Nous pourrions comparer leur fonctionnalité avec celle des PNN matures CD16^{bright}CD10^{bright} comme décrit par Drifte *et al.* (135). En effet, Drifte *et al.* ont étudié les fonctions immunitaires des neutrophiles matures et immatures en se basant sur le phénotypage de CD16 (expression du récepteur FcγRIII) chez des patients en sepsis ou présentant une réponse systémique inflammatoire et des volontaires sains. Ils ont montré que les PNN circulants des patients étaient dans l'ensemble moins matures que ceux des contrôles et que ces PNN immatures étaient globalement moins efficaces (chimiotactisme, bactéricidie, phagocytose diminués) comparés aux PNN matures. Il reste encore à déterminer si l'immaturité des neutrophiles lors du sepsis a une incidence clinique importante sur les défenses immunitaires des patients.

Pillay *et al.* ont récemment mis en évidence une sous-population de neutrophiles présentant des propriétés immunosuppressives et un phénotype distinct (Pillay JCI 2012). En effet, trois heures après l'injection de LPS en intraveineux chez des volontaires sains, plusieurs sous-populations de PNN apparaissaient dont des neutrophiles CD16^{bright}CD62L^{dim} capables d'inhiber la prolifération des lymphocytes T. Dans la cohorte de patients septiques, nous avons également noté une diminution du CD62L et l'apparition de cette sous-population chez certains patients. Après tri et lecture sur lame, cette sous-population immunosuppressive apparaît hypersegmentée et dégranulée. Néanmoins, la faible fréquence et le pourcentage limité de cette sous-population chez les patients septiques ne nous a malheureusement pas permis de faire des analyses spécifiques plus poussées. De plus, alors que la moelle osseuse libère des neutrophiles immatures, la problématique de la demi-vie de ces sous-populations mériterait d'être abordée. En effet, les PNN semblent être des cellules à courte

durée de vie. Même si, on observe une diminution de l'apoptose et une recrudescence du recrutement, leur implication dans la régulation immunitaire est difficile à concilier avec leur longévité. Tak *et al.* ont réévalué la production des PNN dans la moelle osseuse, leur circulation, le pool marginé, ainsi que l'après-circulation à partir de la littérature et de nouvelles expériences. Cependant, l'utilisation de traceurs toxiques ou la fragilisation des PNN par manipulation *ex vivo* affectent les cinétiques et il est ainsi difficile de conclure sur une différence de demi-vie entre des sous-populations (198).

Pillay *et al.* assimilent le rôle de la sous-population immunosuppressive CD16⁺CD62L⁻ aux cellules myéloïdes suppressives (MDSC). Les MDSC ont été caractérisées pour la première fois dans des modèles murins tumoraux et chez des patients atteints de cancer. Cette population hétérogène de cellules myéloïdes immatures présente une activité suppressive via un contact cellulaire proche. Compte tenu de la physiopathologie du choc septique, des études récentes se sont intéressées au potentiel rôle des MDSC dans l'immunosuppression, notamment dans la réponse inadaptée des lymphocytes T, observée chez les patients atteints de choc septique. De plus, l'expansion et l'activation des MDSC étant stimulées par différents facteurs inflammatoires, ces cellules pourraient être impliquées dès la phase pro-inflammatoire du sepsis. Delano *et al.* (395) ont mis en évidence pour la première fois l'augmentation du nombre de cellules Gr-1⁺ CD11b⁺ dans la rate, les ganglions lymphatiques et la moelle osseuse dans un modèle murin de sepsis polymicrobien. De plus, ce nombre reste élevé pendant 12 semaines. Ces cellules représentent une population hétérogène de progéniteurs de la lignée myéloïde immatures, en prolifération et produisent des quantités importantes de médiateurs inflammatoires. Cette expansion cellulaire implique la voie de signalisation de Myd88. Dans ce modèle, les cellules Gr-1⁺ CD11b⁺ contribuent à l'inhibition de la production d'IFN- γ par les lymphocytes T CD8⁺ et à la polarisation de la réponse d'un profil Th1 vers Th2, inhibant ainsi les cellules T. Enfin, ils mettent en évidence des différences phénotypiques des MDSC au cours du processus inflammatoire. Ren *et al.* (396) se sont intéressés à la localisation des MDSC 7 jours post CLP. Ils ont montré que les cellules Gr-1⁺ CD11b⁺ s'accumulent et restent dans le foie, et présentent un phénotype immature, plutôt hétérogène. De plus, ces MDSC sont capables d'inhiber la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ de manière concentration-dépendante via la sécrétion d'oxyde nitrique synthase et non via l'arginase. Du reste, si on induit une insuffisance hépatique 2h après le transfert de MDSC provenant du foie de souris septique chez une souris normale, cela permet d'en diminuer la mortalité. Un autre mécanisme entre en jeu dans l'inhibition des cellules T par les MDSC après un stress traumatique. En effet, dans un travail de Makarenkova *et al.* (261), on trouve ici les cellules Gr-1⁺ CD11b⁺ dans la rate et l'inhibition des cellules T par inhibition

de la prolifération, diminution de la production d'interleukine 2 et diminution d'expression du récepteur T (TCR) se fait via la production d'arginase. Le mécanisme d'action des MDSC n'est donc pas le même dans les différents processus inflammatoires. Dans un article de 2011, Cuenca *et al.* (397) soulignent le rôle paradoxal des MDSC dans le sepsis et trauma. En effet, ils notent que les MDSC pourraient être un composant physiologique de l'inflammation plutôt qu'une réponse pathologique au développement d'une tumeur. De plus, les MDSC présentent des différences morphologiques et fonctionnelles selon les tissus et les conditions inflammatoires. Brudecki *et al.* (398) ont voulu développer ce point en proposant des modèles murins de sepsis précoce (jour 3) et tardif (jour 12). Ils mettent ainsi en évidence que le transfert de MDSC Gr-1⁺ CD11b⁺ provenant de sepsis précoce ou tardif affecte différemment la réponse inflammatoire in vivo et la survie. Lors du transfert de MDSC de souris avec un sepsis précoce, la production de cytokines pro-inflammatoires augmente et la survie est diminuée alors que le transfert de MDSC de souris avec un sepsis tardif aboutit à l'accumulation des cytokines anti-inflammatoires avec un meilleur taux de survie. De plus, ils montrent que des mécanismes inflammatoires différents existent selon la phase du sepsis : les cellules Gr-1⁺ CD11b⁺ de souris avec un sepsis précoce produisent des quantités importantes d'oxyde nitrique tandis que les MDSC de souris avec un sepsis tardif ont une activité arginase augmentée. Il existe donc des changements séquentiels lors du processus inflammatoire du sepsis, la population hétérogène de MDSC devient plus immature et adopte un profil anti-inflammatoire. Une autre étude (399) met aussi en avant les différences entre les MDSC prélevés 3 jours (J3) après le début du sepsis et ceux prélevés 10 jours après (J10). Dans les 2 cas, les MDSC sont capables d'inhiber la prolifération des cellules T mais celles prélevées à J10 sécrètent plus de cytokines en réponse à une stimulation au LPS et libèrent plus d'espèces réactives de l'oxygène en réponse à l'IL-6. Les cellules Gr-1⁺ CD11b⁺ isolées à J3 se développent mais ne sont pas capables d'être activées avant J7-10. De plus, les MDSC prélevées à J10 sont capables d'atténuer localement les cytokines inflammatoires, de faciliter la clairance bactérienne et améliorent donc la survie. Les MDSC pourraient alors avoir un effet protecteur dans le sepsis. Ceci rejoint le travail de Sander *et al.* (400) qui ont montré que l'expansion des MDSC lors du sepsis peut avoir un effet bénéfique en inhibant la libération de cytokines pro-inflammatoires et donc en contrôlant la réponse inflammatoire. Ils ont également mis en évidence que la production de protéines hépatiques de la phase aiguë (APP) comme le sérum amyloïde A (SAA), dépendante de gp-130, favorise la mobilisation et la survie des MDSC, reflétant ainsi le lien entre les hépatocytes et les cellules de l'immunité innée au bénéfice du contrôle de l'infection. De plus, Guérin *et al.* soulignait la présence de granulocytes CD10^{dim}CD16^{dim} associée à la prédiction d'une détérioration du sepsis, mais également identifié au sein de cette population, des MDSC

CD14^{neg}CD24^{pos} capables d'inhiber les lymphocytes T en co-culture. Cette population était également associée avec une lymphopénie des T CD3+ et T CD4+ (8).

Les morphologies et caractéristiques des différentes sous-populations de neutrophiles sont représentées dans la **Figure 23** suivante.

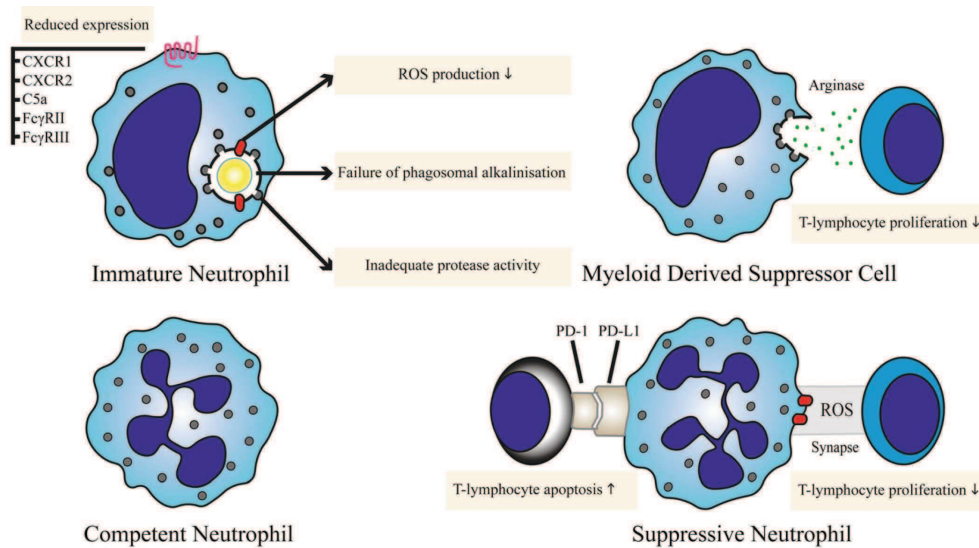


Figure 23 : Représentation schématique des sous-populations de neutrophiles circulants présentes lors d'une inflammation sévère (401)

Les MDSC constituent ainsi une population hétérogène intéressante dans l'immunosuppression post-septique. Néanmoins, beaucoup d'éléments restent encore à découvrir concernant les MDSC, notamment leur phénotypage chez l'homme. Ci-dessous, un tableau résumant les différents phénotypes mis au point à ce jour pour les identifier dans plusieurs types de cancer (402).

MDSC subtype	Phenotype	Patients	References
M-MDSC	CD14 ⁺ HLA-DR ^{-low}	DLBCL, melanoma, colon cancer, HCC, NSCLC, RCC	Tadmor [48], Filipazzi [26], Poschke [47], Zhao [12], Hoechst [46], Mao [31], Arihara [27], Huang [36], van Cuijsen [54]
	CD14 ⁺ IL4R α	Melanoma, colon cancer	Mandruzzato [21]
	CD14 ⁺ CD33 ⁺ CD34 ⁺	Ovarian cancer	Obermayer [30]
	CD11b ⁺ HLA-DR ^{-low} CD14 ⁺	Melanoma	Weide [49]
	Lin ⁻ HLA-DR ⁻ CD14 ⁺	Melanoma	Meyer [55]
	CD11b ⁺ HLA-DR ^{low} CD14 ⁺ CD33 ⁺	Melanoma	Rudolph [29]
	HLA-DR ⁻ CD33 ^{hi} CD15 ⁻ CD14 ⁺	RCC	Ko [18]
	CD33 ⁺ HLA-DR ⁻ Lin ⁻ CD15 ⁻	HNSCC, NSCLC, BC	Almand [23]
	CD11b ⁺ CD14 ⁺ HLA-DR ⁻ CD124 ⁺ CD33 ⁺	BC	Verma [16]
	Lin ⁻ CD11b ⁺ HLA-DR ⁻ CD14 ⁺ CD33 ⁺	Melanoma	Jordan [50]
	CD45 ⁺ Lin ⁻ HLA-DR ^{-low} CD14 ⁺ CD15 ^{dim}	Melanoma	Schilling [15]
	CD66b ⁺ CD33 ⁺ CD11b ⁺ arginase1 ⁺		
	CD16 ^{-low}		
	CD14 ⁺ HLA-DR ^{-low} CD11b ⁺ CD33 ⁺	HNSCC	Vasquez-Dunddel [25]
	CD34 ⁺ arginase 1 ⁺ Ros ⁺		
G-MDSC	CD15 ⁺	Pancreatic cancer, colon cancer, BC	Schmielau [43]
	CD11b ⁺ CD14 ⁺	RCC, GC	Rodriguez [17], Ochoa [39], Wang [22]
	CD66b ⁺ SSC ^{hi}	Head and neck cancer, lung cancer, bladder cancer, carcinoma of ureter	Brandau [14]
	CD15 ⁺ CD11b ⁺ CD14 ⁺	RCC	Zea [40]
	CD11b ⁺ CD14 ⁺ CD33 ⁺	MM	Ramachandran [60]
	CD66b ⁺ CD33 ^{int} HLA-DR ⁻	Head and neck cancer	Trellakis [13]
	HLA-DR ⁻ CD33 ^{low} CD15 ⁺ CD14 ⁺	RCC	Ko [18]
	CD15 ⁺ CD33 ⁺ CD11b ⁺ CD14 ⁺	NSCLC	Liu [41]
	CD15 ⁺ CD33 ⁺ CD11b ⁺ HLA-DR ⁻	BC	Mundy-Bosse [45]
	CD11b ⁺ CD33 ⁺ HLA-DR ⁻ CD14 ⁺	Esophageal cancer	Jiao [42]
	CD14 ⁺ HLA-DR ⁻ CD11b ⁺ CD33 ⁺	HCC	Kalathil [61]
	CD11b ⁺ CD14 ⁺ HLA-DR ^{-low} CD33 ⁺	MM	Gorgun [62]
	CD15 ⁺		
	CD11b ⁺ CD14 ⁺ CD66b ⁺ CD124 ⁺ CD15 ⁺	BC	Verma [16]
	Lin ⁻ CD11b ⁺ HLA-DR ⁻ CD14 ⁺ CD33 ⁺	Melanoma	Jordan [50]
Fibrocytes	CD45 ⁺ Lin ⁻ HLA-DR ⁻ CD14 ⁺ CD15 ⁺	Melanoma	Schilling [15]
	CD66b ⁺ CD33 ⁺ CD11b ⁺ arginase1 ⁺		
Fibrocytes	CD11b ⁺ HLA-DR ⁺ CD11c ^{hi} CD123 ⁺	Pediatric sarcomas	Zhang [19]
	CD14 ⁺		
MDSC unclassified	CD34 ⁺	HNSCC	Lathers [7], Young [10], Pandit [8], Young [9], Garrity [11], Pak [6]
	CD33 ⁺ HLA-DR ⁻	RCC	Ko [53], Feng [24]
	CD33 ⁺ CD11b ⁺	NSCLC	Srivastava [59]
	CD11b ⁺ HLA-DR ⁻	Pancreatic cancer	Annelis [57]
	CD33 ⁺ HLA-DR ⁻ Lin ^{-low}	Renal cancer, HCC, SCLC	Mirza [51], Shen [37], Iclozan [52]
	CD11b ⁺ HLA-DR ⁻ CD33 ⁺	RCC	Wang [56]
	CD11b ⁺ CD33 ⁺ HLA-DR ⁻ CD11c ⁻	Skin SCC	Gehad [32]
	Lin ⁻ CD45 ⁺ CD33 ⁺	Ovarian Cancer	Cui [20]
	Lin ^{-low} HLA-DR ⁻ CD11b ⁺ CD33 ⁺	Colon cancer, pancreatic cancer, esophageal cancer, GC, BC, sarcoma	Zhang [4], Gabitass [28], Diaz-Montero [2]
	HLA-DR ⁻ Lin ⁻ B7-2 ⁻ CD40 ⁻	HNSCC, NSCLC, BC	Almand [3]
	HLA-DR ⁻ CD33 ^{hi} CD15 ⁻ CD14 ⁺ Lin ⁻	RCC	Ko [18]
	CD45 ⁺ CD13 ⁺ CD33 ⁺ CD14 ⁺ CD15 ⁻	BC	Yu [44]

Tableau 7 : Différents phénotypes des MDSC humains (402)

f) Mortalité

En s'intéressant à la mortalité à 28 jours dans notre cohorte de 43 patients, avec un nombre aussi faible de non survivants (n = 8, 19%), peu de paramètres se révèlent différents entre les survivants et les non survivants. Ainsi, les paramètres immunologiques classiquement décrits comme prédicteurs de la mortalité (mHLA-DR à J3-4, pourcentage des Treg, valeur absolue des T CD4 à J3-4) ainsi que les scores de sévérité SOFA et SAPSII ne sont significativement pas différents entre ces deux groupes de patients. Ceci peut s'expliquer par la taille de la cohorte et la sévérité clinique. Nous parvenons aux mêmes conclusions concernant la prédiction d'infections nosocomiales secondaires.

Néanmoins, parmi les paramètres étudiés, la myéloperoxydase mesurée à J6-8 semble être le meilleur marqueur indépendant, prédicteur de mortalité à J28 (régression logistique / Modèle de Cox : Odds ratio : 8.39 – p-value = 0.033 – Intervalle de confiance à 95% : 1.185-59.441). De plus, la présence de PNN immatures CD10^{dim}CD16^{dim} à J6-8 est associée à une mortalité plus élevée (log-rank test p = 0.040).

Des analyses complémentaires sur une cohorte additionnelle plus importante sont nécessaires pour mieux évaluer l'intérêt potentiel de ces deux biomarqueurs.

g) Etude transcriptomique

Considérant la complexité du réseau de signalisation des PNN, un profil d'expression du génome complet est primordial (403). Ainsi, un objectif de cette thèse était également d'étudier la réponse transcriptomique de neutrophiles purifiés (via l'étude de l'ARNm) de patients en choc septique. L'expression des gènes a été comparée entre les patients prélevés à J3-4 et J6-8 et les volontaires sains. Dans notre cohorte, 364 gènes étaient up-régulés et 328 étaient down-régulés chez les patients. Après une étude fonctionnelle de ces gènes différentiellement exprimés, les variations observées étaient concordantes avec la littérature du sepsis. En effet, nous avons observé une diminution d'expression des gènes impliqués dans l'apoptose des neutrophiles (STK4, Caspase 8...), dans leur recrutement et le chimiotactisme (CREB1, RICTOR, SH3BP2, TPST, MMP9) et une augmentation d'expression des gènes à l'origine des propriétés antimicrobiennes (ARG1, STOM, ADAM9...). Par ailleurs, l'arginase 1 (ARG1) a pour propriété d'inhiber la prolifération des lymphocytes T en dégradant l'arginine extracellulaire, aboutissant à une réponse réduite des T à une stimulation CD3/TCR. Chez l'homme, l'ARG1 est stockée sous forme inactive dans les granules des neutrophiles et s'active lors de sa libération. Elle peut également être produite par les MDSC (404). L'expression du gène de l'ARG1 est augmentée dans les échantillons des patients, soulignant ainsi la potentielle implication d'un mécanisme immunosuppresseur.

h) Intérêt du CD177

De manière intéressante, dans notre cohorte, CD177 semble être le gène le plus différentiellement exprimé entre les patients en choc septique et les volontaires sains. En effet, on observe une augmentation d'expression du CD177 chez les patients. Ceci est concordant avec la littérature qui souligne une implication du CD177 dans la réponse des PNN à une infection ainsi qu'une augmentation de l'ARNm du CD177 dans des pathologies sévères avec neutrophilie comme le sepsis sévère (405, 406). CD177 semble être impliqué dans l'adhésion des neutrophiles au niveau des cellules endothéliales et dans la migration transendothéliale grâce à son interaction avec PECAM-1

(407). Nous avons également retrouvé une augmentation d'expression du CD177 au niveau protéique dans la cohorte de patients en choc septique. En particulier, les intensités de fluorescence de CD10 et CD177 étaient négativement corrélées. Comme décrit précédemment, une diminution d'expression de CD10 est caractéristique des cellules myéloïdes immatures (394). Passamonti *et al.* ont observé que les PNN isolés de la moelle osseuse de volontaires sains ou à partir de sang périphérique après une administration de G-CSF, présentaient un niveau d'expression de l'ARNm de CD177 plus élevé. Ceci souligne une expression génique plus élevée de CD177 dans les stades précoces de la maturation des neutrophiles (408). Ces résultats ont été confirmés par cytométrie en flux après l'administration de G-CSF pendant 10 jours à des volontaires sains. En effet, l'expression du CD177 augmentait après 2 jours de traitement (409). de Kleijn *et al.* ont mis en avant, dans un modèle expérimental d'endotoxémie humaine, que lors d'une inflammation systémique précoce, le profil d'expression génique suggère une combinaison d'activation des PNN circulants avec la mobilisation de neutrophiles issus de la moelle osseuse, notamment caractérisés par une up-régulation de CD177 (410). Enfin Hu *et al.* ont observé l'émergence graduelle de CD177 sur la membrane des PNN lors de la maturation dans la moelle osseuse. Surtout, dans cette étude, CD177 était le plus exprimé dans les band cells (411). Ainsi, on peut considérer l'intérêt de CD177 comme marqueur de la maturation des neutrophiles sortants de la moelle osseuse. De plus, CD177 peut être évalué comme marqueur d'activation qui augmente dans un contexte d'inflammation/infection, comme le CD64, un indicateur sensible et spécifique des infections systémiques et des sepsis chez l'adulte, l'enfant et le nouveau-né (329). Le CD177 pourrait donc être considéré comme marqueur diagnostique au début du développement de l'inflammation/infection. Néanmoins, ce point mérite des études plus poussées et dédiées, impliquant différentes pathologies inflammatoires.

4. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le cœur de cette thèse, basé sur l'étude des polynucléaires neutrophiles, a permis de mettre en évidence des altérations phénotypiques, fonctionnelles et transcriptomiques chez les patients en choc septique lors de la phase immunosuppressive en comparaison à des volontaires sains. Nous avons également pu souligner la présence, chez les patients septiques, de sous-populations de PNN présentant des différences morphologiques. Néanmoins, un des objectifs de notre travail qui était de retrouver la sous-population CD16^{bright}CD62L^{dim} décrite par Pillay *et al.* chez des patients en SRIS, n'a pas été atteint. En effet, elle était peu représentée, ne nous permettant pas de réaliser des analyses complémentaires. En revanche, une population de PNN immatures CD10^{dim}CD16^{dim} a été retrouvée plus fréquemment dans notre cohorte. Par conséquent, la contribution des sous-populations, notamment des PNN immatures, dans le contexte de l'immunosuppression induite par les états septiques sévères, mérite d'être approfondie, en particulier au niveau fonctionnel (*i.e.*, marquages multi-couleurs en cytométrie en flux). Nous pourrions également comparer le phénotypage et les propriétés de nos sous-populations avec MDSC. Cette population hétérogène de cellules myéloïdes immatures présente une activité suppressive et des études récentes s'interrogent sur leur potentielle implication dans l'immunosuppression, notamment dans la réponse inadaptée des lymphocytes T, observée chez les patients atteints de choc septique.

L'intérêt du CD177 comme marqueur d'activation et de maturité des neutrophiles mérite également d'être investigué dans des cohortes plus importantes impliquant différents contextes inflammatoires/infectieux. De plus, la perte de myéloperoxydase et lactoferrine, la diminution du chimiotactisme, la présence de cellules immatures et leur lien avec la mortalité et les MDSC pourraient contribuer au contexte d'immunosuppression présent chez les patients en choc septique. Ainsi, en lien avec cette notion d'immaturité, le rôle spécifique du CD177 reste à élucider. Au final, les pistes d'exploration futures convergent donc vers la population de neutrophiles immatures.

Comme nous l'avons documenté dans la première partie et avec nos travaux personnels, les outils de monitoring s'améliorent et il est maintenant possible d'envisager des travaux de plus grande envergure en recherche translationnelle. La meilleure caractérisation des patients sur le plan immuno-inflammatoire sera probablement un des facteurs de réussite de l'immunomodulation adjuvante.

5. ANNEXES

ANNEXE I :

- Inter-laboratory assessment of flow cytometric monocyte HLA-DR expression in clinical samples. *Cytometry B Clin Cytom.* 2013 Jan-Feb;84(1):59-62.
- Assessment of a novel flow cytometry technique of one-step intracellular staining: example of FOXP3 in clinical samples. *Cytometry B Clin Cytom.* 2013 May;84(3):187-93.
- STAT5 phosphorylation in T cell subsets from septic patients in response to recombinant human interleukin-7: a pilot study. *J Leukoc Biol.* 2015 Apr;97(4):791-6.
- Elevated plasmatic level of soluble IL-7 receptor is associated with increased mortality in septic shock patients. *Intensive Care Medicine* 2014 Aug;40(8):1089-96.

ANNEXE II :

- Altérations phénotypiques et fonctionnelles des polynucléaires neutrophiles dans les états septiques sévères. *Revue Francophone des Laboratoires.* Mai 2014, n°462:65-71.
- Intracellular flow Cytometry improvements in clinical studies. *Methods in Molecular Biology – in press*

ANNEXE I

Brief Communication

Inter-Laboratory Assessment of Flow Cytometric Monocyte HLA-DR Expression in Clinical Samples

Julie Demaret,^{1,2} Alexandre Walencik,³ Marie-Christine Jacob,³ Jean-François Timsit,⁴ Fabienne Venet,^{1,2} Alain Lepape,^{2,5} and Guillaume Monneret^{1,2*}

¹Hospices Civils de Lyon, Hôpital Edouard Herriot, Laboratoire d'Immunologie, Lyon F-69003, France

²EAM 4174, HCL-Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France

³Centre Hospitalo-Universitaire Albert Michallon, Laboratoire d'immunologie, Grenoble, France

⁴Université Grenoble 1, UFR Santé, Albert Michallon Hospital, Medical ICU, Grenoble, France

⁵Hospices Civils de Lyon, CH Lyon-Sud, Réanimation, Lyon, France

Background: Diminished expression of human leukocyte antigen DR on circulating monocytes (mHLA-DR) is a reliable indicator of immunosuppression in critically ill patients, predictive of both adverse outcome and septic complications. The objective of the present work was to test, in an inter-laboratory clinical study, a standardized protocol for mHLA-DR measurement by flow cytometry.

Methods: mHLA-DR was assessed in fresh whole blood according to a standardized staining protocol. Cells were analyzed on different flow cytometers (FC500, Navios, FACS Canto II) in different laboratories (Lyon and Grenoble). Results were expressed as numbers of antibodies bound per cell (AB/C).

Results: Correlations between results were excellent (Pearson and interclass correlation coefficients > 0.98). Coefficients of variations for intra-assay precision ranged from 1.9 to 3.2%. **Conclusion:** The present report highlights the robustness of this standardized flow cytometric protocol for mHLA-DR measurement in multicentric clinical studies. © 2012 International Clinical Cytometry Society

Key terms: HLA-DR; monocyte; sepsis; flow cytometry; standardization

How to cite this article: Demaret J, Walencik A, Jacob M, Timsit J, Venet F, Lepape A, Monneret G. Inter-laboratory Assessment of Flow Cytometric Monocyte HLA-DR Expression in Clinical Samples. *Cytometry Part B* 2013; 84B: 59–62.

After severe stress/injury, the development of a state of immunosuppression is now a well-documented phenomenon in intensive care unit (ICU) patients. This might directly participate in detrimental outcome and in lowering patients' resistance to secondary infections (1,2). Therefore, it is now hypothesized that restoring immune functions in ICU patients could represent a major therapeutic avenue (3). Preliminary clinical trials in the field, testing either IFN- γ or GM-CSF, have shown promising results (4–6). Nevertheless, a crucial aspect is our capacity to identify only the most immunosuppressed patients (i.e., who could benefit the most from immunostimulating therapies).

To date, a diminished expression of human leukocyte antigen-DR on circulating monocytes (mHLA-DR) measured by flow cytometry is consensually accepted as a

reliable indicator of immunosuppression in critically ill patients (2). In terms of functionality, monocytes with low HLA-DR expression are known to be unable to mount a pro-inflammatory response to any subsequent bacterial challenge or to properly present antigens to T

Julie Demaret and Alexandre Walencik contributed equally to the work.

*Correspondence to: Guillaume Monneret, Immunology Laboratory, Hôpital E. Herriot, Hospices Civils de Lyon, 5 place d'Arsonval, 69437 Lyon Cedex 03, France.

E-mail: guillaume.monneret@chu-lyon.fr

Received 31 May 2012; Revision 31 July 2012; Accepted 20 August 2012

Published online 14 September 2012 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

DOI: 10.1002/cyto.b.21043

cells (2,7). In terms of clinical information, decreased mHLA-DR has been shown to be predictive of both adverse outcome and septic complications after trauma, surgery, pancreatitis, burn, and septic shock (8–11).

Recently, mHLA-DR has been used to stratify the administration of GM-CSF in a clinical trial including a small cohort of septic patients (6). This biomarker-guided GM-CSF therapy appeared safe and effective in restoring monocytic immunocompetence and shortening the duration of mechanical ventilation and hospital/ICU stay (6). Therefore, the next challenge would be to design a multicentric clinical trial to test this hypothesis in a large cohort of patients. However, a prerequisite is to ensure a standardized flow cytometric protocol for mHLA-DR measurement, so as to obtain reproducible results between centers. Regarding this aspect, pre-analytical requirements have been published in 2002 (12). Then, an international group of experts established a consensually accepted standardized protocol in 2005 (13). Using this standardized protocol, the objective of the present work was to assess the reproducibility of flow cytometric mHLA-DR measurements in an inter-laboratory clinical study.

MATERIALS AND METHODS

Cell Preparation and Flow Cytometric Analysis

Samples of peripheral blood were collected in EDTA anticoagulant tubes. The protocol (thereafter called “standardized protocol”) has been extensively described in 2005 (13). Briefly, whole blood (50 μ L) was stained with 20 μ L of QuantiBrite HLA-DR/Monocyte mixture (QuantiBrite anti-HLA-DR PE (clone L243)/Anti-monocytes (CD14) PerCP-Cy5.5 (clone M Φ P9), Becton Dickinson San Jose, CA, USA) at room temperature for 30 min in a dark chamber. Alternatively, cells were stained with FITC-labeled anti-CD14 (BeckmanCoulter, Miami, FL) and PE-labeled anti-HLA-DR (clone L243, Becton Dickinson-Pharmingen, San Jose, CA) at room temperature for 30 min in a dark chamber according to a previously used protocol (thereafter called “alternate protocol” (11)). Samples were then lysed using the FACS Lysing solution (Becton Dickinson) for 15 min. After a washing step, cells were analyzed on three different flow cytometers: FC500, Navios (BeckmanCoulter) and FACSCanto-II (Becton Dickinson). A lyse-no wash procedure was also evaluated for some samples. Monocytes were first gated out from other cells on the basis of CD14 expression and mHLA-DR expression was then measured on their surface (mono-parametric histogram) as median of fluorescence intensity related to the entire monocyte population (as recommended by manufacturer). These results were then transformed in AB/C (number of antibodies fixed per cell) thanks to calibrated PE-beads (BD QuantiBrite™ - PE Beads, Becton Dickinson) that were run on each flow cytometer.

Results obtained with FC500 and Navios flow cytometers, both located in the same laboratory in Lyon (Immunology Laboratory, Hôp. E. Herriot), were first compared. In this case, cell stainings (i.e., standardized

and alternate protocols) were performed within 2 h after blood collection. Every sample was obtained from our routine workout (17 septic shock patients, 12 HIV-infected patients, and 13 healthy donors). In a second experiment, comparison was made between results obtained in Lyon (Navios) and Grenoble (FACSCanto-II) according to the standardized protocol. Samples were obtained in Lyon ICU ($n = 5$), Grenoble ICU ($n = 6$) and from healthy donors ($n = 3$). As there is a 90 min-drive between the cities of Lyon and Grenoble, samples were collected on the same day as follows. First, Lyon samples were obtained at 8:30am immediately placed on ice and driven to Grenoble. Meanwhile, in Grenoble, samples were collected at 9:30am and stored on ice. At 10:00am in Grenoble, every sample (i.e., from Lyon and Grenoble) were split in two aliquots. The first batch of aliquot was driven to Lyon on ice, the second stayed on ice in Grenoble. Finally, at 12:00am, staining procedure was simultaneously started in both centers after phone call to ensure a perfect synchronization.

Statistical Analysis

Correlations were evaluated using the Pearson's correlation coefficient and intra-class correlation coefficient tests. The statistical analyses were performed using SPSS software (version 16.0, SPSS, Chicago, IL).

RESULTS

FC500 (Alternate Protocol)/Navios (Standardized Protocol) Comparison

In a previous study (11), we set up a homemade protocol based on the same principle as the standardized procedure for mHLA-DR measurement (i.e., monocyte identification through CD14 expression / PE-HLA-DR - clone L243, Becton for HLA-DR expression measurement and QuantiBrite beads for calculation of AB/C) but without using the ready-to-use QuantiBrite mixture. As a first step, we compared this protocol run on a FC500 flow cytometer to the standardized protocol run on a Navios analyzer. For this purpose, we included 42 samples. Results are shown in Figure 1A. An excellent correlation was obtained between protocols ($y = x + 582$, $r: 0.98$, $p < 0.001$) without any outlier.

Navios (Lyon) / FACSCanto-II (Grenoble) Comparison

In a second step, we compared results of clinical samples stained according to the standardized protocol but analyzed simultaneously in two different laboratories on flow cytometers provided by different manufacturers (Navios - BeckmanCoulter and FACSCanto-II - BectonDickinson). Again, we observed an excellent correlation ($y = 1.05x + 258$, $r: 0.99$, $p < 0.001$ and intra-class correlation coefficient: 0.996 , $p < 0.001$). Indeed, results were thus found to be identical between centers (Fig. 1B).

Wash/No Wash Procedure and Method Precision

As the necessity for a washing step before data acquisition on flow cytometers was not definitely established

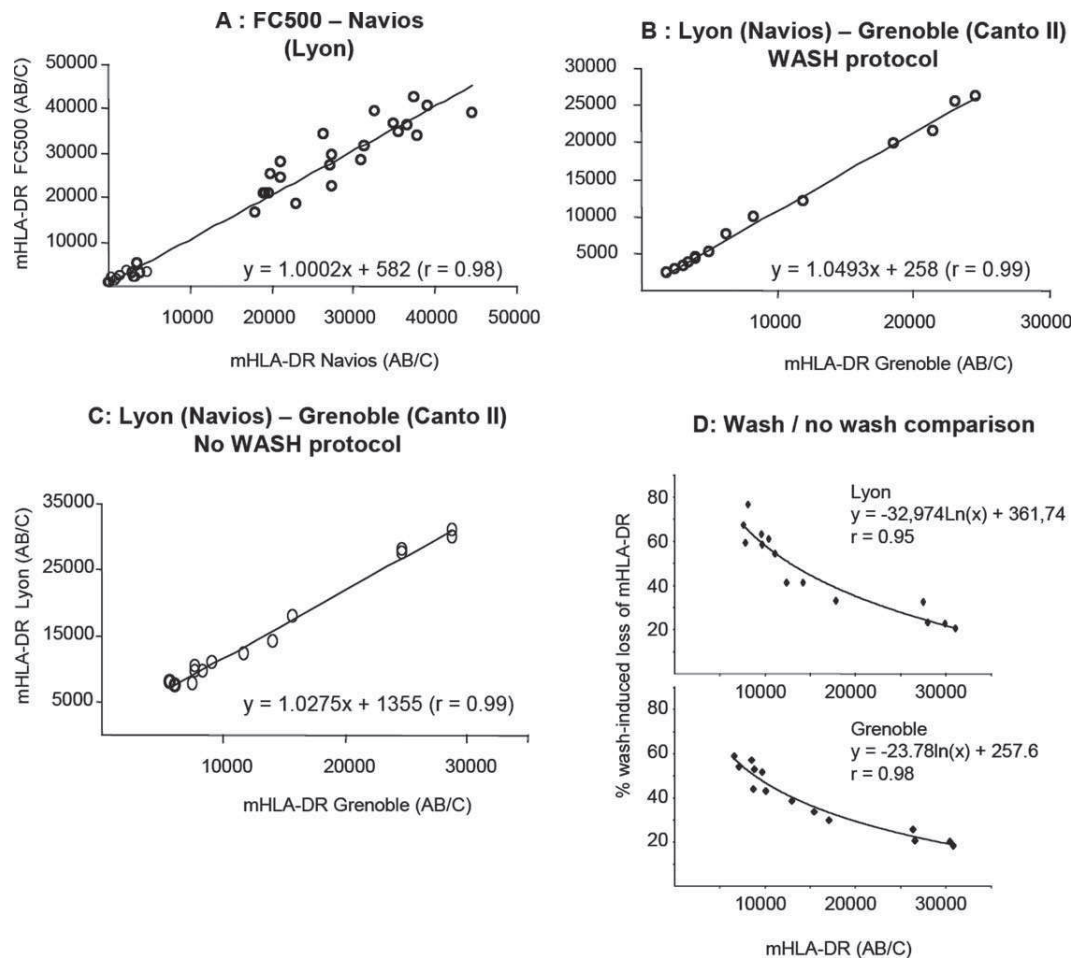


Fig. 1. Comparison of FC500 (alternate protocol) and Navios (standardized protocol) results in a same laboratory. 47 blood samples from patients (12 HIV-infected and 17 ICU patients) and 13 healthy donors were either treated according to homemade staining procedure (11) or the standardized protocol (13). Cells were washed after staining. Results were expressed as number of antibodies bound per cell (AB/C). **B.** Comparison of Navios – Lyon (standardized protocol) and FACS Canto II – Grenoble (standardized protocol) results. 14 blood samples from ICU patients ($n = 11$) and healthy donors ($n = 3$) were treated according to standardized procedure (13). Cells were washed after staining. Results were expressed as number of antibodies bound per cell (AB/C). **C.** No wash procedure results comparison (standardized protocol, Navios – Lyon and FACS Canto II – Grenoble). 14 blood samples from ICU patients ($n = 11$) and healthy donors ($n = 3$) were treated according to standardized protocol (13). Cells were not washed after staining. Results were expressed as number of antibodies bound per cell (AB/C). **D.** Wash-induced loss of mHLA-DR in Grenoble and Lyon (standardized protocol). The effect of a washing step was evaluated by calculating the percentage of mHLA-DR loss in comparison with the no wash procedure. 14 blood samples from ICU patients ($n = 11$) and healthy donors ($n = 3$) were treated according to standardized protocol (13). Cells were either washed or not after staining. Results were expressed as number of antibodies bound per cell (AB/C) and as logarithmic regression.

in the 2005 standardized protocol (13), we assessed again this aspect in both centers. As shown in Figure 1D, the wash procedure decreases mHLA-DR values. This loss was more pronounced for the lowest mHLA-DR values. Nevertheless, when comparing results obtained in both centers with the “no wash” protocol, we again observed an excellent correlation ($r: 0.99$, $p < 0.001$ and intra-class correlation coefficient: 0.994 , $p < 0.001$, Fig. 1C). In addition, in Lyon, the intra-assay precision was evaluated in the “wash” protocol by two ways: one sample stained once and analyzed five times or one sample stained five times and analyzed five times. Importantly, this showed that, by using the “wash” procedure, the intra-assay coefficients of variations (CVs) ranged from 1.9 to 3.2%.

DISCUSSION

The major result of the present report is to show the excellent correlation between mHLA-DR results obtained in two different laboratories when the standardized protocol is performed according to previously described pre-analytical recommendations (e.g., staining < 2 h after sampling or < 4 h at $+4^{\circ}\text{C}$ (12,13)). Measured on clinical samples, this observation was valid between laboratories, between different flow cytometers (Beckman-Coulter and Becton-Dickinson) and was even found when performed with slightly different staining procedures (alternate versus standardized protocols). To the best of our knowledge, such an inter-laboratory assessment on fresh clinical samples has never been performed since publication of the standardized protocol in

2005 (13). In the original paper, only two clinical samples were sent to participating laboratories and staining was started > 24 h after sampling (13). In this study, coefficients of variation (i.e., values from different laboratories) were found at 20% (mHLA-DR around 11,000 AB/C) and 15% (for mHLA-DR around 35,000 AB/C). Meanwhile, some multicentric studies have been published. However, whereas patients' inclusions were multicentric, mHLA-DR measurements were all performed in a single laboratory (6,14).

As initially reported (13), we observed that the final washing step before cell acquisition induces a decrease in mHLA-DR expression while both protocols remained well correlated. As, in some cases, this loss may not be reproducible due to non-specific antibody binding caused by inflammation-induced up-regulation of Fc γ receptors – which is obviously the case in ICU patients – the wash procedure may be preferred. Furthermore, this step clearly diminishes the non-specific background and thus ameliorates cell identification on dot plots. This may explain that we obtained an almost perfect regression line (slope equals 1, intercept at the origin of the y- and x-axes) when comparing results obtained using the wash protocol between centers (Fig. 1B). In line, regarding the wash procedure, intra-assay precision CVs were found below 5% which is excellent for such a manual technique. As far as we know, most groups that have published on mHLA-DR (and that we have contacted during completion of the manuscript) are currently performing this wash procedure, which is actually not significantly time consuming. Collectively, these data indicate that, although requiring one additional working step, the final wash step is preferable.

To date, the main indication of mHLA-DR measurement is to identify ICU patients at increased risk of nosocomial infections/death. One promising application in the future is to help these immunosuppressed patients in restoring their immune defenses. As an example, decreased mHLA-DR expression has recently been used to stratify the administration of GM-CSF in a small cohort of septic patients (6). This biomarker-guided GM-CSF therapy has been demonstrated to be safe and effective for restoring monocytic immunocompetence and shortening the time of mechanical ventilation and hospital/ICU stay (6). Patients were included into this prospective, randomized, double-blinded, placebo-controlled trial on the basis of a low mHLA-DR (i.e., below 8000 AB/C) on two consecutive days. The next step would be to conduct multicentric studies to validate these promising GM-CSF effects on larger cohorts of patients by using this standardized mHLA-DR procedure providing reproducible results between centers.

More generally, regarding the measurement of mHLA-DR after severe stress, a key challenge will be to delineate, for each subgroup of ICU patients (i.e., burn, trauma, sepsis, pancreatitis), the best thresholds defining the risk of secondary infection / death. Indeed, it is very likely that these thresholds will be different between septic shock, trauma or burn patients. Obviously, such per-

spective will rely on the use of flow cytometry, which is now ready for clinical applications when standardized protocols are properly designed and validated (15–17).

In conclusion, the present report and previous results (13) highlight the robustness of this standardized flow cytometry protocol for mHLA-DR measurement in multicentric studies.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors report no potential conflicts of interest. They thank Anne Portier and Hélène Vallin for technical assistance.

LITERATURE CITED

- Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003;348:138–150.
- Monneret G, Venet F, Pachot A, Lepape A. Monitoring immune dysfunctions in the septic patient: a new skin for the old ceremony. *Mol Med* 2008;14:64–78.
- Hotchkiss RS, Opal S. Immunotherapy for sepsis—a new approach against an ancient foe. *N Engl J Med* 2010;363:87–89.
- Docke WD, Randow F, Syrbe U, Krausch D, Asadullah K, Reinke P, Volk HD, Kox W. Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN- γ treatment. *Nat Med* 1997;3:678–681.
- Nakos G, Malamou-Mitsi VD, Lachana A, Karassavoglou A, Kitsioulis E, Agnandi N, Lekka ME. Immunoparalysis in patients with severe trauma and the effect of inhaled interferon- γ . *Crit Care Med* 2002;30:1488–1494.
- Meisel C, Scheffold JC, Pschowski R, Baumann T, Hetzger K, Gregor J, Weber-Carstens S, Hasper D, Keh D, Zuckermann H, et al. GM-CSF to reverse sepsis-associated immunosuppression: a double-blind randomized placebo-controlled multicenter trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;180:640–648.
- Wolk K, Docke WD, von Baehr V, Volk HD, Sabat R. Impaired antigen presentation by human monocytes during endotoxin tolerance. *Blood* 2000;96:218–223.
- Monneret G, Lepape A, Voirin N, Bohe J, Venet F, Debard AL, Thizy H, Biennu J, Gueyffier F, Vanhems P. Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive Care Med* 2006;32:1175–1183.
- Landelle C, Lepape A, Voirin N, Tognet E, Venet F, Bohe J, Vanhems P, Monneret G. Low monocyte human leukocyte antigen-DR is independently associated with nosocomial infections after septic shock. *Intensive Care Med* 2010;36:1859–1866.
- Venet F, Tissot S, Debard AL, Faudot C, Crampe C, Pachot A, Ayala A, Monneret G. Decreased monocyte human leukocyte antigen-DR expression after severe burn injury: correlation with severity and secondary septic shock. *Crit Care Med* 2007;35:1910–1917.
- Cheron A, Floccard B, Allaouchiche B, Guignant C, Poitevin F, Malcus C, Crozon J, Faure A, Guillaume C, Marcotte G, et al. Lack of recovery in monocyte human leukocyte antigen-DR expression is independently associated with the development of sepsis after major trauma. *Crit Care* 2010;14:R208.
- Monneret G, Elmenkouri N, Bohe J, Debard AL, Gutowski MC, Biennu J, Lepape A. Analytical requirements for measuring monocytic human lymphocyte antigen DR by flow cytometry: application to the monitoring of patients with septic shock. *Clin Chem* 2002;48:1589–1592.
- Docke WD, Hofflich C, Davis KA, Rottgers K, Meisel C, Kiefer P, Weber SU, Hedwig-Geissing M, Kreuzfelder E, Tschentscher P, et al. Monitoring temporary immunodepression by flow cytometric measurement of monocytic HLA-DR expression: a multicenter standardized study. *Clin Chem* 2005;51:2341–2347.
- Lukaszewicz AC, Griénay M, Resche-Rigon M, Pirracchio R, Faivre V, Boval B, Payen D. Monocytic HLA-DR expression in intensive care patients: interest for prognosis and secondary infection prediction. *Crit Care Med* 2009;37:2746–2752.
- Maack HT, McCoy JR, Jr., Amos M, Elliott J, Gaigalas A, Wang L, Aranda R, Banchereau J, Boshoff C, Braun J, et al. A model for harmonizing flow cytometry in clinical trials. *Nat Immunol* 2010;11:975–978.
- Venet F, Lepape A, Monneret G. Clinical review: flow cytometry perspectives in the ICU – from diagnosis of infection to monitoring of injury-induced immune dysfunctions. *Crit Care* 2012;15:231.
- Jaye DL, Bray RA, Gebel HM, Harris WA, Waller EK. Translational applications of flow cytometry in clinical practice. *J Immunol* 2012;188:4715–4719.

Original Article

Assessment of a Novel Flow Cytometry Technique of One-Step Intracellular Staining: Example of FOXP3 in Clinical Samples

Julie Demaret,^{1,2†} Julien Saison,^{1,2,3,5†} Fabienne Venet,^{1,2} Christophe Malcus,¹ Francoise Poitevin-Later,¹ Alain Lepape,^{2,4} Tristan Ferry,^{2,3,5} and Guillaume Monneret^{1,2*}

¹Hospices Civils de Lyon, Hôpital Edouard Herriot, Laboratoire d'Immunologie, Lyon, F-69003, France

²Université Claude Bernard Lyon 1, Hospices civils de Lyon 1 -EAM 4174, Lyon, F-69008, France

³Hospices Civils de Lyon, Hôpital de la Croix Rousse, Service de Maladies Infectieuses et Tropicales, Lyon, F-69004, France

⁴Hospices Civils de Lyon, Centre Hospitalier Lyon-Sud, Réanimation, Pierre-Bénite F-69495, France

⁵INSERM, U851, 21 avenue Tony Garnier, Lyon, F-69007, France

Background: By measuring multiple parameters on a single-cell basis, flow cytometry is a potent tool to dissect the phenotypes and functions of cell subsets. However, because this technique may be time-consuming, particularly for intracellular staining, it could be problematic for its use in daily routine or in large cohorts. Recently, a novel reagent has been developed to perform intracellular staining in one step. The objective of our study was thus to assess this new method in comparison with the reference technique by focusing on FOXP3 staining in clinical samples.

Methods: Peripheral blood was collected from 15 HIV-1-infected patients, 5 critically ill patients, and 5 healthy volunteers and stained using the two different methods. Different subsets of FOXP3 positive cells were investigated by flow cytometry.

Results: When comparing results obtained with the two techniques, no statistical differences between the percentages of CD4+FOXP3+, CD4+CD25+FOXP3+, and CD4+CD25+CD127–FOXP3+ cells were observed. Besides, a strong correlation between percentages of CD4+FOXP3+CD25+CD127– lymphocytes measured with both techniques was found in patients (r : 0.843, $P < 0.001$, intra-class correlation coefficient: 0.820, $P < 0.001$). Importantly, flow cytometry stainings obtained with the one-step method were very robust with an excellent intra-assay precision, a better discriminative power and correct stability and reproducibility of the staining even after blood storage.

Conclusions: With a strong correlation between the percentages of FOXP3+ Tregs when compared with the reference method, a better staining quality, a shorter realization time and no need of isotype control, this one step procedure may represent an important improvement for a daily routine use of intracellular staining. © 2013 International Clinical Cytometry Society

Key terms: flow cytometry; intracellular staining; CD4+CD25+; FOXP3; regulatory T cells

How to cite this article: Demaret J, Saison J, Venet F, Malcus C, Poitevin-Later F, Lepape A, Ferry T, Monneret G. Assessment of a novel flow cytometry technique of one-step intracellular staining: Example of FOXP3 in clinical samples. *Cytometry Part B* 2013; 84B: 187–193.

Grant sponsor: Beckman Coulter.

[†]Julie Demaret and Julien Saison contributed equally to the work.

*Correspondence to: Dr. Guillaume Monneret, Immunology Laboratory, Hôpital E. Herriot, Hospices Civils de Lyon, 5 places d'Arsonval, 69437 Lyon Cedex 03, France.

E-mail: guillaume.monneret@chu-lyon.fr.

Received 5 September 2012; Revision 30 November 2012; Accepted 3 December 2012

Published online 16 January 2013 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

DOI: 10.1002/cyto.b.21070

Flow cytometry is considered as a powerful tool for cellular analysis, either for studying cell phenotypes or various immune cell functions (1). However, several issues exist when considering flow cytometric intracellular stainings, especially in the context of a daily routine use and in clinical research protocols including large cohorts of patients for whom samples need to be processed immediately (2). In particular, this technique is time-consuming due to permeabilization and multiple washing steps and most importantly, results are usually poorly reproducible and hardly standardizable. This renders intracellular flow cytometry use poorly suitable for multicentric clinical studies.

Recently, a novel reagent has been developed to perform flow cytometry intracellular staining in one step (including permeabilization and staining). The aim of this study was thus to test the robustness of this reagent in daily routine conditions in clinical samples.

Accumulated evidence suggests the essential functions of regulatory T cells (Treg) in the pathophysiology of many clinical conditions such as autoimmune diseases (3), transplantations (4), severe septic shock (5), cancer (6), HIV infection (7), and in the development and maintenance of immunologic tolerance (8). However, very few studies have been conducted in large prospective clinical cohorts. This could be partly explained as Treg can only be precisely identified by flow cytometry using intracellular FOXP3 staining, the key transcriptional factor for Treg (9,10). Even if other phenotypes (such as CD4+CD25+ or CD4+CD25+CD127-) are known to be good surrogate identification strategy for Treg (11), FOXP3 remains to date, the only marker to appropriately identify those cells (9,12).

In this study, we thus assessed the quality and reproducibility of FOXP3 intracellular staining by using this novel one-step protocol in comparison with the well-accepted reference method in clinical samples.

MATERIAL AND METHODS

Study Population

HIV-1-infected patients from the Hospices Civils de Lyon HIV cohort, located in Croix-Rousse Hospital and intensive care unit (ICU) patients from Lyon-Sud Hospital and Edouard Herriot Hospital (Hospices Civils de Lyon, Lyon, France) were included. Samples were collected in EDTA anticoagulant tubes. Analyses were performed on available residual blood after routine analyses were performed.

Fifteen HIV-1-infected patients [men = 10 (67%), median age = 50 years, inter-quartile range (IQR): 38–69] were included. They all received highly active anti-retroviral therapy (HAART) [median treatment duration = 7.65 years, IQR: 3.03–11.03] and were aviremic with a viral load (VL) at baseline below 50 copies/ml (Abbott RealTime HIV-1 assay and *m2000* RT system platform). Their median CD4+ cell count at baseline was 573 cells/mm³ [IQR: 391–761].

Five ICU patients were included [men = 2 (40%), median age = 70 years, IQR: 29–79]. Three of them met

criteria for septic shock diagnosis of the American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine (13) and two were trauma patients (Injury Severity Score: ISS > 25).

Five healthy volunteers [men = 2 (40%), median age = 34, IQR: 26–56], all members of the laboratory staff, were also included after informed consent was given.

No statistical differences were observed in clinical data for age ($P = 0.317$) and gender ($P = 0.342$) among HIV patients, ICU patients, and healthy donors.

Reference Method of Intracellular Staining

Samples were stained with Anti-Human Foxp3 Staining Set following manufacturer's recommendations (eBioscience, San Diego, CA). As already described (14), samples were first stained using surface markers: anti human phycoerythrin (PE)-labeled anti-CD127, PE-Texas Red (ECD)-labeled anti-CD4 and PE-Cyanine5 (PC5)-labeled anti-CD25 antibodies (Beckman Coulter, Hialeah, FL) and incubated for 15 min. Samples were then lysed using Versalys lysing solution (Beckman Coulter) for 15 min. After a washing step, permeabilization was performed using Fix/Perm Buffer for 40 min. Following three more washing steps with permeabilization buffer and incubation with this buffer and normal rat serum for 15 min (blocking step), the FoxP3 intracellular staining using anti human FoxP3-FITC antibody (clone PCH101, eBioscience) was performed for 30 min. Samples were finally washed two times with permeabilization buffer. Rat IgG2a isotype control was used to evaluate non-specific staining.

One-Step Method of Intracellular Staining

The PerFix-no centrifuge assay Kit from Beckman Coulter was assessed. Staining of fresh whole blood was performed using PE-labeled anti-CD25, PE-Cyanine7 (PC7)-labeled anti-CD127, Alexa fluor 647 (AF647)-labeled anti-FoxP3, and Pacific Blue (PB)-labeled anti-CD4 (Beckman Coulter). FoxP3-antibodies (clone 259D) were purchased from BioLegend (San Diego, CA). According to the manufacturer's instructions, samples were first fixed with the fixative reagent and incubated for 15 min. Then, aliquots were simultaneously permeabilized thanks to the permeabilizing reagent and stained with fluorochrome-conjugated antibodies. After 60 min of incubation, samples were washed once with PBS and secondly with a solution containing formaldehyde.

One-Step Method Robustness

To study intra-assay precision, two sets of analyses were performed: (i) one sample stained 10 times and analyzed 10 times (ii) one sample stained once and analyzed 10 times. To assess the stability of the staining, expression of the markers was measured immediately after staining, then 2 h and 24 h later for five patients. To assess the effect of blood storage before staining, results from fresh whole blood or obtained after blood storage for 24 h at 4°C and at room temperature for three patients were compared.

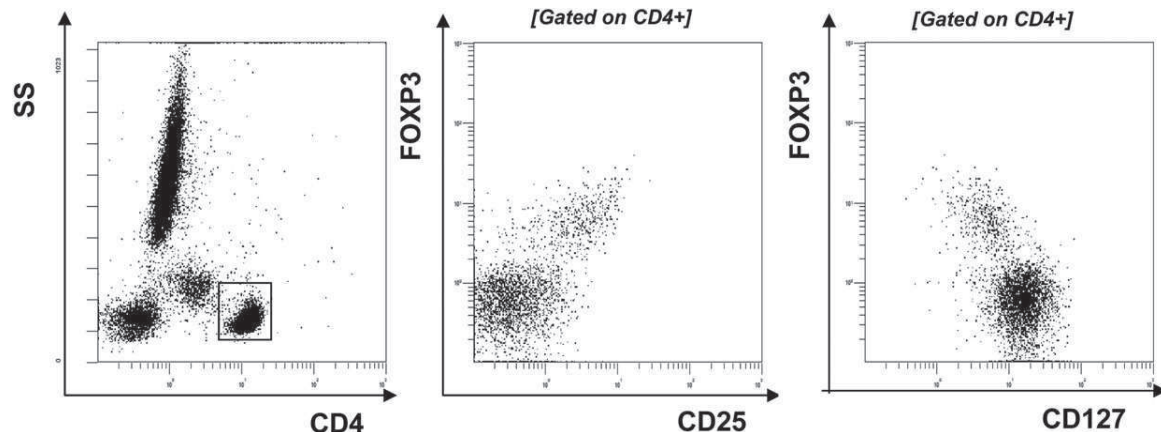


FIG. 1. Examples of plots representing co-expression of FOXP3 and CD25 or FOXP3 and CD127 in CD4+ cells. Cells were first gated on SSC/CD4 (left histogram).

Flow Cytometric Data Acquisition and Analysis

Cytometry analyses were performed on a NAVIOS flow cytometer using the NAVIOS software (Beckman Coulter). FOXP3 expression was examined in three different CD4+ subsets as followed: CD4+, CD4+CD25+, and CD4+CD25+CD127– lymphocytes.

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using SPSS (version 17.0; SPSS, Chicago, IL) and GraphPad Prism (version 5.03, GraphPad Software, La Jolla, CA) software. Normality of the parameters was assessed using the Kolmogorov-Smirnov test. *T*-test, Wilcoxon test for continuous variables and exact Fisher test for categorical variables were performed. Correlations were studied using the Pearson's correlation coefficient test and the intra-class correlation coefficient (ICC). The Bland-Altman approach was also used to assess the agreement between the methods. *P*-values were considered significant when lower than 0.05.

RESULTS

As Treg, independently of FOXP3 expression, are usually described as either CD4+CD25+ or CD4+CD25+CD127– lymphocytes, FOXP3 expression was evaluated in these different subsets. Examples of plots representing co-expression of either FOXP3 and CD25 or FOXP3 and CD127 in CD4+ gated cells are shown in Figure 1.

No statistical differences between the percentages of CD4+FOXP3+, CD4+CD25+FOXP3+, and CD4+CD25+CD127–FOXP3+ lymphocytes measured with the two techniques were observed. This was true for the overall patient population as well as in each group individually (Table 1). In line, a strong correlation between percentages of CD4+FOXP3+ cells obtained with the two different techniques was identified in the global population (r : 0.763, P < 0.001, ICC: 0.759,

P < 0.001). Likewise, percentages of CD4+CD25+FOXP3+ (r : 0.715, P < 0.001, ICC: 0.659, P < 0.001) and CD4+CD25+CD127–FOXP3+ lymphocytes (r : 0.843, P < 0.001, ICC: 0.820, P < 0.001) (Fig. 2) were nicely correlated between reference and one-step procedures. Moreover, Bland-Altman plots revealed good agreement between both methods regardless of the phenotype (Fig. 2).

We then compared the cell separation/discriminative power of these two techniques for FOXP3+ lymphocytes gating. The signal to noise ratio was calculated for each technique by comparing the mean of fluorescence intensity (MFI) of FOXP3 positive versus negative cells among CD4+ lymphocytes (MFI ratios and differences). Interestingly, significantly different discriminative power was identified between these two techniques in each study group and in the whole study population (Table 1). We indeed observed that FOXP3+ cell identification after one-step intracellular staining was largely easier than with the reference method (Fig. 3).

When testing intra-assay precision, we observed that coefficients of variation (CV) of the percentage of CD4+FOXP3+ cells measured with the one-step technique ranged from 4 to 5.8%. Similar results were obtained when percentages of CD4+CD25+FOXP3+ lymphocytes were measured (CV between 3.3 and 6.4%).

When testing stability of the staining, we did not observe any statistical difference. We observed in five patients that mean percentage of CD4+FOXP3+ cells was 7.6% (standard deviation, SD: 1.7) at T_0 , 7.1% (SD: 1.1) at $T+2$ h, and 7.4% (SD: 1.4) at $T+24$ h (Fig. 4a). In the same patients, the mean MFI ratio between FOXP3– and FOXP3+ cells among CD4+ lymphocytes was 10.5 (SD: 2.2) at T_0 , 10.3 (SD: 1.5) at $T+2$ h, and 9.6 (SD: 2) at $T+24$ h (Fig. 4b). Similar results were obtained with other phenotypes of Treg (CD4+CD25+FOXP3+ and CD4+CD25+CD127–FOXP3+). These results indicated an excellent staining stability.

Table 1
Percentages of Positive Cells Among CD4+ Lymphocytes and Mean of Fluorescence Intensity (MFI) of FOXP3 for Different Treg Phenotypes

		Reference method	One step method	P
Percentages among CD4+ cells				
FOXP3+	HIV	9.26 [7.09–10.44]	10.66 [9.62–12.27]	0.072
	ICU	11.85 [9.11–17.32]	12.65 [9.68–16.53]	0.98
	HV	11.92 [9.45–12.53]	11.65 [10–12.08]	0.99
	Total	10.08 [7.89–11.89]	11.29 [9.80–12.5]	0.257
FOXP3+ CD25+	HIV	7.27 [5.28–9.09]	6.91 [5.27–8.16]	0.492
	ICU	10.51 [6.96–14.86]	9.04 [5.85–10.32]	0.314
	HV	5.96 [5.69–7.83]	6.73 [6.41–8.11]	0.481
	Total	7.34 [5.63–9.44]	6.97 [5.97–8.59]	0.33
FOXP3+ CD25+ CD127–	HIV	5.62 [4.63–6.46]	6.32 [5.83–7.13]	0.192
	ICU	9 [6.07–12.7]	8.9 [6.35–10.68]	0.753
	HV	5.72 [5.03–6.83]	6.18 [5.22–7.28]	0.666
	Total	5.74 [4.83–7.92]	6.32 [5.84–8.46]	0.529
Mean of Fluorescence Intensity				
MFI Difference: FOXP3+ minus FOXP3–	HIV	1.81 [1.60–2.01]	7.40 [6.16–9.52]	<0.001
	ICU	2.6 [1.57–3.16]	10.59 [6.51–17.43]	0.019
	HV	1.27 [1.16–1.36]	9.94 [5.67–10]	0.003
	Total	1.63 [1.36–2.03]	7.52 [6.18–10.13]	<0.001
MFI Ratio: FOXP3+ versus FOXP3–	HIV	3.17 [2.71–3.46]	10.84 [9.82–12.19]	<0.001
	ICU	4.92 [3.3–5.35]	12.64 [11.24–17.29]	0.001
	HV	2.78 [2.64–2.94]	12.5 [10–12.76]	<0.001
	Total	3.17 [2.74–3.46]	11.81 [10.35–12.58]	<0.001

Results were obtained in HIV-infected patients (HIV, $n = 15$), critically ill patients (ICU, $n = 5$), healthy volunteers (HV, $n = 5$) and in the whole cohort (Total, $n = 25$). Results are presented as median and IQR (inter quartile range) between brackets. P values were calculated using student T -test.

Finally, when blood storage before staining was tested, we did not observe any statistical difference. The mean percentage of CD4+FOXP3+ cells for three patients were respectively, 7.0% (SD: 0.8) at T0, 6.9% (SD: 1.6) after storage for 24 h at 4°C, and 7.1% (SD: 0.9) after 24 h storage at room temperature (Fig. 4c). The mean MFI ratio between FOXP3– and FOXP3+ cells among CD4+ population for these patients was found to be very stable at 10.7 (SD: 3.1) at T0, 11.7 (SD: 3.2) after 24 h storage at 4°C, and 10.6 (SD: 2.1) after 24 h storage at room temperature (Fig. 4d). We obtained the same results considering other phenotypes of Treg (CD4+CD25+FOXP3+ and CD4+CD25+CD127–FOXP3+).

DISCUSSION

The main result of our study is to show that Treg percentages obtained using reference and one-step techniques are well correlated. This was observed whatever the phenotype used for Treg identification (i.e., FOXP3+ cells among CD4+, CD4+CD25+, or CD4+CD25+CD127– lymphocytes). Another important result was that flow cytometry staining obtained by using one-step intracellular staining appeared as a robust technique with good intra-assay precision and adequate staining stability even after blood storage.

Interestingly, this novel technique presents with better advantages than reference technique.

Indeed, this one-step intracellular staining procedure offers several improvements. Intracellular FOXP3 staining with this technique takes about 90 min to complete (CD4, CD25, CD127, and FOXP3 stainings) whereas 200 min are needed for the usual reference method. This is

due to the steps of permeabilization and staining (extra and intracellular) that are done at the same time in the one-step technique therefore shortening additional incubation times and wash/centrifugations cycles. Importantly, this diminished number of washing cycles did not impact the non-specific background fluorescence that could have been expected to be amplified. In contrast, the signal to noise ratio between FOXP3+ and FOXP3– cells was even improved with the one-step approach (Table 1). This enables for a better discrimination of the positive FOXP3 cells amongst CD4+ population with the one-step method. This is without the requirement of an isotype control use. In contrary, such specific cell separation appears as virtually impossible in some patients with the reference technique (Fig. 2).

Therefore, specifically regarding FOXP3 staining in clinical samples, our results open new perspectives of Treg investigation either in large prospective clinical studies or in daily routine. This could also be relevant for the study of different Treg subsets such as cells co-expressing CD45RA, CD38, or CTLA4 (15,16). Moreover, this new technique obviously allows for the staining of other intracellular markers whatever the cells/phenotypes considered and could be of major interest for various users of flow cytometry.

Our study presents some limitations. In particular, two different fluorochromes and two different clones were used for intracellular FOXP3 staining in the compared techniques. This could partly explain the difference in discriminative power between the methods. For example, some studies have pointed out that the clone used in the reference method was associated with a

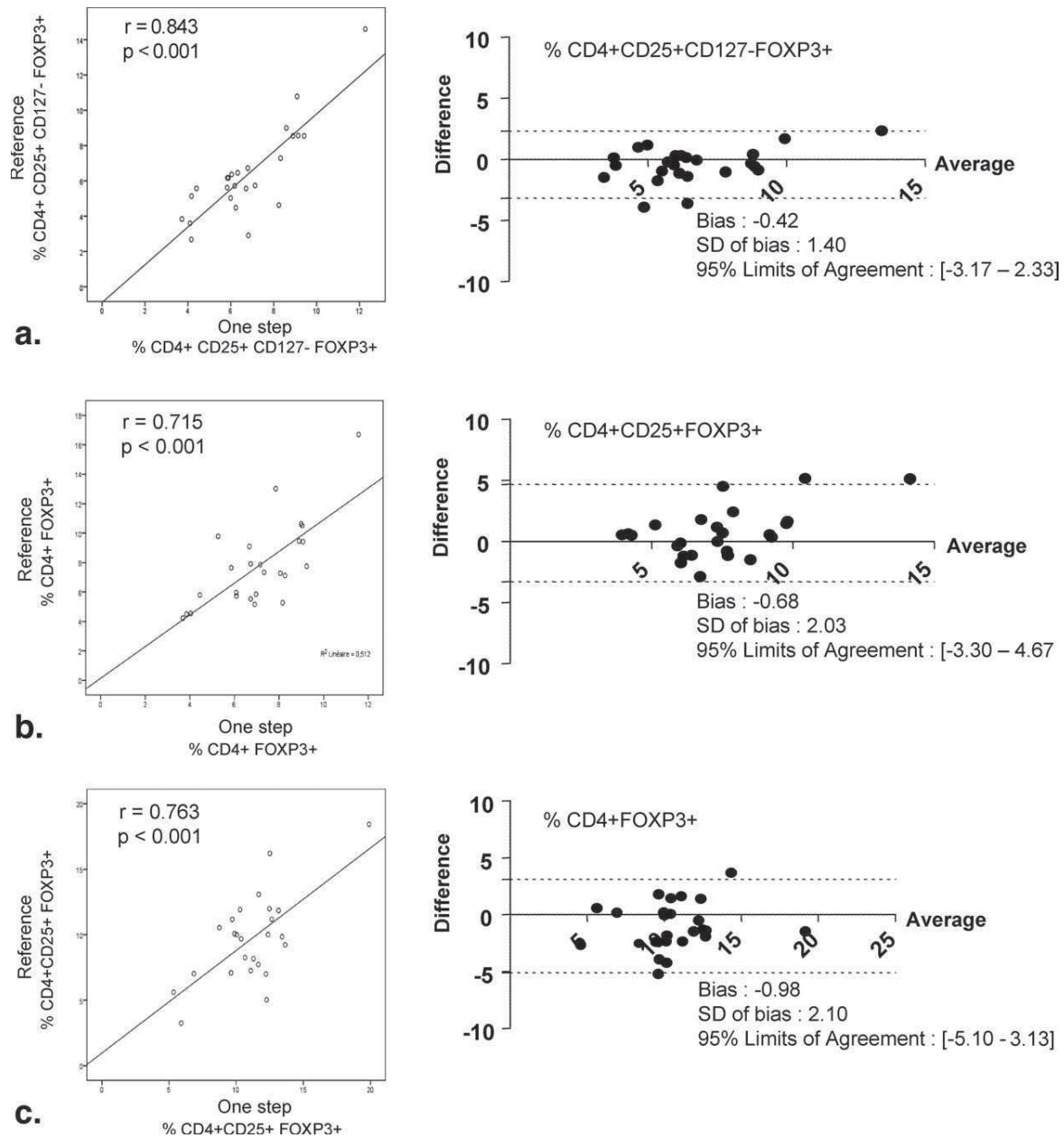


Fig. 2. Correlation and Bland–Altman plots between Treg percentages measured by using reference and one-step techniques. For each Treg phenotype, correlation (left side—Pearson's correlation coefficient test) and Bland–Altman plot (right side—the black line indicates the average value of the differences between the two methods; the two dotted lines form the 95% reference range) are represented as (a) CD4+CD25+CD127–FOXP3+ cells; (b) CD4+CD25+FOXP3+ cells, and (c) CD4+FOXP3+ cells.

higher level of non-specific staining compared with other clones (17,18). This obviously needs to be confirmed in a subsequent study. Moreover, we only studied the correlation between the methods in three different pathologic situations. This novel method may therefore not be suitable in other clinical conditions. Thus, these preliminary results should be validated in a larger cohort of patients and in other clinical contexts.

Besides, standardization of this novel technique should be elaborated on.

CONCLUSION

By comparing a one-step intracellular staining procedure with a reference protocol, we obtained a strong correlation between percentages of FOXP3+ Treg. Moreover, with a better staining quality, a shorter realization

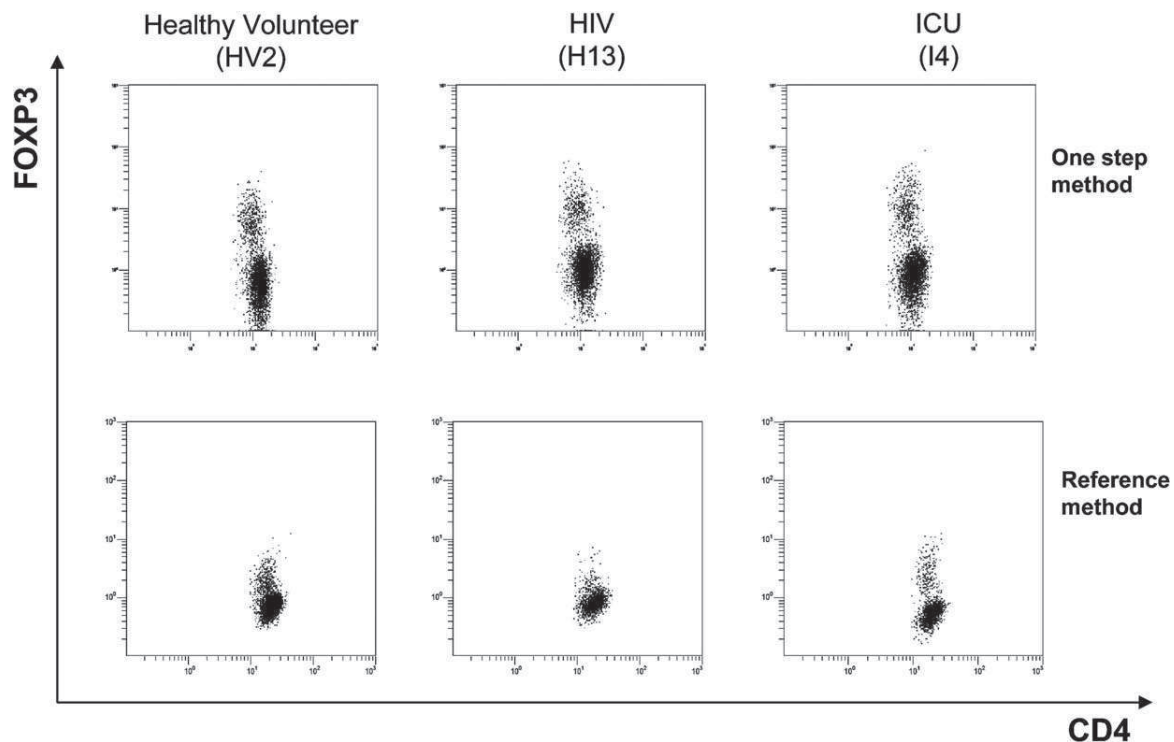


Fig. 3. Representative biparametric histograms of CD4+FOXP3+ cells for one-step and reference procedures. Both procedures were simultaneously used in one healthy volunteer, one HIV-infected patient, and one ICU patient.

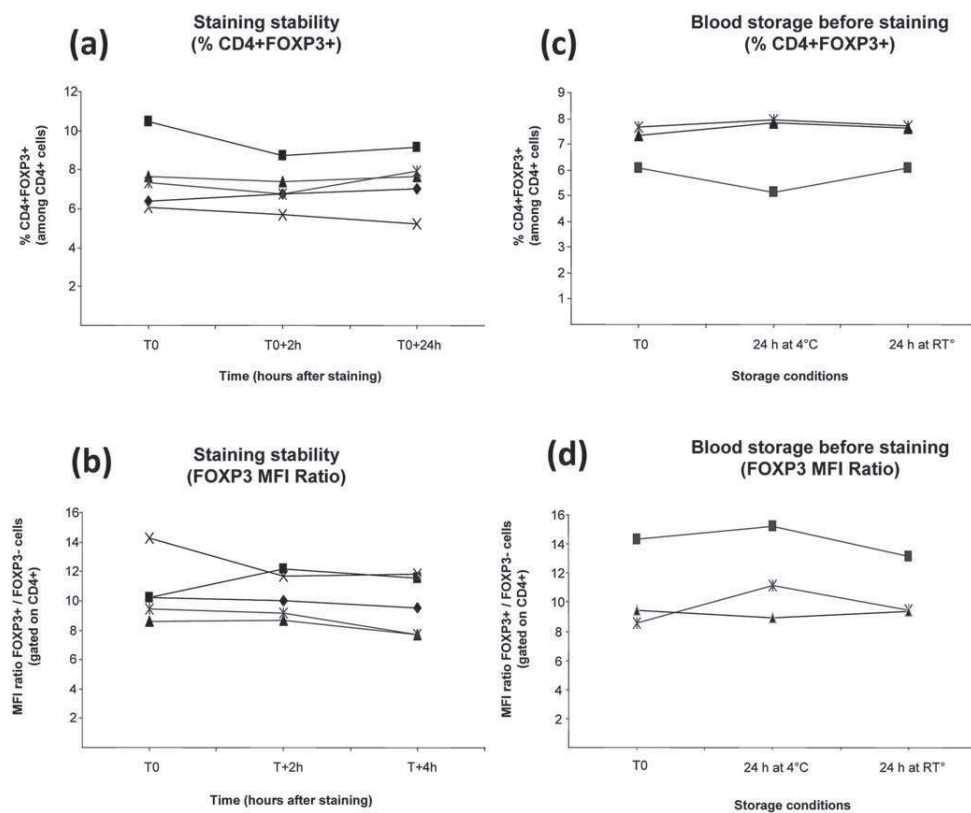


Fig. 4. One-step method robustness (example of CD4+FOXP3+ cells). (a,b) Staining stability was evaluated for the one-step technique at three time points (T0, T+2 h after staining, T+24 h after staining) in five HIV-infected patients for (a) % CD4+FOXP3+ cells and (b) MFI ratio between FOXP3+ and FOXP3- cells. (c,d). Effect of blood storage before staining was evaluated for (c) CD4+FOXP3+ cells and (d) MFI ratio between FOXP3+ and FOXP3- cells. The one-step technique was performed in three HIV-infected patients. Cells were stained at T0 and after 24 h storage at 4°C and 24 h storage at room temperature (RT). For each graph, individual values are presented.

time and no isotype control requirement, this one-step procedure appears adequate for a daily routine use and in prospective clinical studies. This one-step procedure of intracellular staining therefore may represent an important improvement in the study of intracellular molecules by flow cytometry in clinical studies.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Anne Portier and Caroline Guignant for technical assistance.

DISCLOSURE

This study was supported by Beckman Coulter through donations of laboratory equipments and supplies. This private company had no role in the study design, the collection or interpretation of the data. Similarly, Beckman Coulter had no role in the preparation of the manuscript or the decision to submit it for publication. Conversely, eBioscience did not supply any of the reagents for the reference method.

LITERATURE CITED

1. Maecker HT, McCoy JP, Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nat Rev Immunol* 2012;12:191–200.
2. Perez OD, Mitchell D, Campos R, Gao GJ, Li L, Nolan GP. Multi-parameter analysis of intracellular phosphoepitopes in immunophenotyped cell populations by flow cytometry. *Curr Protoc Cytom* 2005;Chapter 6:Unit 6 20.
3. Baecher-Allan C, Hafler DA. Human regulatory T cells and their role in autoimmune disease. *Immunol Rev* 2006;212:203–216.
4. Wood KJ, Bushell A, Hester J. Regulatory immune cells in transplantation. *Nat Rev Immunol* 2012;12:417–430.
5. Monneret G, Venet F. Additional bad news from regulatory T cells in sepsis. *Crit Care* 2010;14:453.
6. Erfani N, Mehrabadi SM, Ghayumi MA, Haghshenas MR, Mojtahedi Z, Ghaderi A, Amani D. Increase of regulatory T cells in metastatic stage and CTLA-4 over expression in lymphocytes of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). *Lung Cancer* 2012;77:306–311.
7. Elahi S, Dinges WL, Lejarcegui N, Laing KJ, Collier AC, Koelle DM, McElrath MJ, Horton H. Protective HIV-specific CD8+ T cells evade Treg cell suppression. *Nat Med* 2011;17:989–995.
8. Fukaya T, Takagi H, Sato Y, Sato K, Eizumi K, Taya H, Shin T, Chen L, Dong C, Azuma M, et al. Crucial roles of B7-H1 and B7-DC expressed on mesenteric lymph node dendritic cells in the generation of antigen-specific CD4+Foxp3+ regulatory T cells in the establishment of oral tolerance. *Blood* 2010;116:2266–2276.
9. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol* 2010;10:490–500.
10. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003;4:330–336.
11. Saison J, Demaret J, Venet F, Chidiac C, Malcus C, Poitevin-Later F, Tardy JC, Ferry T, Monneret G. CD4+CD25+CD127- assessment as a surrogate phenotype for FOXP3+ regulatory T cells in HIV-1 infected viremic and aviremic subjects. *Cytometry B Clin Cytom* 2013;84B: 50–54.
12. Lanza F. Toward standardization of Foxp3+ regulatory T-cell measurement in clinical settings. *Cytometry B Clin Cytom* 2009;76B:67–68.
13. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* 2003;31:1250–1256.
14. Venet F, Chung CS, Kherouf H, Geeraert A, Malcus C, Poitevin F, Bohe J, Lepape A, Ayala A, Monneret G. Increased circulating regulatory T cells (CD4(+)CD25 (+)CD127 (–)) contribute to lymphocyte energy in septic shock patients. *Intensive Care Med* 2009;35:678–686.
15. Duhon T, Duhon R, Lanzavecchia A, Sallusto F, Campbell DJ. Functionally distinct subsets of human FOXP3+ Treg cells that phenotypically mirror effector Th cells. *Blood* 2012;119:4430–4440.
16. Simonetta F, Lecuroux C, Girault I, Goujard C, Sinet M, Lambotte O, Venet A, Bourgeois C. Early and long-lasting alteration of effector CD45RA(–)Foxp3(high) regulatory T-cell homeostasis during HIV infection. *J Infect Dis* 2012;205:1510–1519.
17. Grant J, Bourcier K, Wallace S, Pan D, Conway A, Seyfert-Margolis V, Wallace PK. Validated protocol for FoxP3 reveals increased expression in type 1 diabetes patients. *Cytometry B Clin Cytom* 2009;76B:69–78.
18. Tran DQ, Ramsey H, Shevach EM. Induction of FOXP3 expression in naive human CD4+FOXP3 T cells by T-cell receptor stimulation is transforming growth factor-beta dependent but does not confer a regulatory phenotype. *Blood* 2007;110:2983–2990.

STAT5 phosphorylation in T cell subsets from septic patients in response to recombinant human interleukin-7: a pilot study

Julie Demaret,^{*,†,1} Guillaume Dupont,^{*,†,1} Fabienne Venet,^{*,†} Arnaud Friggeri,[§] Alain Lepape,[§] Thomas Rimmelé,[†] Jérôme Morel,[‡] and Guillaume Monneret^{*,†,2}

^{*}Immunology Laboratory and [†]Intensive Care Units, Hospices Civils de Lyon, Hôpital Edouard Herriot, Lyon, France; [‡]Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France; [‡]Centre hospitalier universitaire de Saint-Etienne, Intensive Care Units, Saint-Etienne, France; and [§]Hospices Civils de Lyon, Centre hospitalier Lyon-Sud, Intensive Care Units, Pierre Bénite, France

RECEIVED NOVEMBER 17, 2014; REVISED DECEMBER 27, 2014; ACCEPTED JANUARY 26, 2015. DOI: 10.1189/jlb.5AB1114-545R

ABSTRACT

Septic shock is characterized by lymphocyte alterations associated with increased risk of nosocomial infections and mortality. IL-7, a cytokine required for T cell survival, is thought as a novel therapy for septic patients with severe lymphopenia. We assessed CD4⁺ lymphocyte responsiveness to rhIL-7 in septic shock patients *ex vivo*. Thirteen septic shock patients and 10 controls were included. The MFI of pSTAT5, a key signaling molecule for IL-7, was measured by flow cytometry in CD4⁺FOXP3[−] (T_{effs}) and CD4⁺FOXP3⁺ (T_{regs}) lymphocytes after whole-blood incubation with increasing doses of rhIL-7. The basal level of pSTAT5 in nonstimulated T cells was higher in patients. However, the maximal activation level in response to the highest doses of rhIL-7 was similar in both groups. Importantly, low doses of rhIL-7 preferentially activated T_{eff} versus T_{reg} in patients and nonsurvivors tended to present with decreased pSTAT5 expression. This pilot study is the first to highlight, in septic patients, the interest of pSTAT5 measurement in whole blood for the monitoring of rhIL-7 therapy. Such a method could represent an innovative, biologic tool for monitoring leukocyte pharmacological responses to biotherapies in daily clinical practice in other clinical contexts. *J. Leukoc. Biol.* 97: 000-000; 2015.

Introduction

Severe sepsis and septic shock are major health care problems and represent the leading cause of mortality in ICUs. Despite improved treatment algorithms that have resulted in an increasing number of patients surviving the early inflammatory phase of the disease, the mortality rate in these patients is still high [1, 2]. Importantly, it is reported that a majority of deaths occurs after the first 3 days of the disorder [3]. At this time, it is

well established that septic patients develop severe immune alterations (innate and adaptive), of which the intensity and duration are correlated with viral reactivation and increased risk of death or nosocomial infections. Therefore, immunotherapy may represent an interesting treatment to restore patients' immunity [3].

IL-7 is an indispensable cytokine for growth, proliferation, and differentiation of CD4⁺ T cells [4]. As a drug, rhIL-7 is currently being assessed in various clinical conditions with the objective of rejuvenating T cells. In clinical trials, rhIL-7 has been used to treat patients with lymphopenia and lymphopenia-driven diseases. In addition, this cytokine is currently undergoing clinical testing as an immune-enhancing agent in patients with cancer, HIV-1 infection, and progressive multifocal leukoencephalopathy [5–7].

As sepsis-induced lymphocyte alterations share many similarities with immune dysfunctions observed in these clinical conditions [3, 8], rhIL-7 has been proposed as a potential candidate for treating septic patients with severe lymphocyte alterations [3, 9]. In mouse models of septic shock, IL-7 was shown to be protective against secondary infections and to improve survival [10, 11]. In septic patients, rhIL-7 *ex vivo* incubation totally restored normal lymphocyte functions [9].

Interestingly, recent clinical and experimental studies have suggested that depending on its dosage, rhIL-7 may have differential effects on T_{effs} versus CD4⁺ T_{regs}. This has been related to the different levels of expression of its receptor (CD127; IL-7R α chain) on these T cell subsets [4]. As T_{regs} are hypothesized to play a deleterious role during sepsis-induced immunosuppression [12], there is a great interest in testing this differential response in septic patients.

In this study, we assessed the *ex vivo* responses of septic shock patients' T cell subsets to increasing doses of rhIL-7 compared with healthy volunteers by measuring

Abbreviations: AF647 = Alexa Fluor-647, FOXP3 = forkhead box P3, ICU = Intensive Care Unit, MFI = mean of fluorescence intensity, mHLA-DR = HLA-DR expressed on monocytes, pSTAT5 = phosphorylated STAT5, rh = recombinant human, SAPS II = Simplified Acute Physiologic Score II, SOFA = Sequential Organ Failure Assessment score, T_{eff} = effector T lymphocyte, T_{reg} = regulatory T cell

1. These authors contributed equally to this work.

2. Correspondence: Immunology Laboratory, Hôpital E. Herriot, Hospices Civils de Lyon, 5 places d'Arsonval, 69437 Lyon Cedex 03, France. E-mail: guillaume.monneret@chu-lyon.fr

intracellular pSTAT5 by flow cytometry in cells as native as possible (in fresh whole blood).

MATERIALS AND METHODS

Study population

The study group consisted of 13 septic shock patients (diagnostic criteria of the International Guidelines for Management of Severe Sepsis and Septic Shock [13]), admitted to the surgical or medical ICUs of Saint-Etienne and Lyon University hospitals. Ten healthy volunteers were included in the study after informed consent was given (median age, 45; 6 women and 4 men). This work belongs to a global study on ICU-induced immune dysfunctions. It has been approved by our Institutional Review Board for ethics ("Comité de Protection des Personnes") and registered at the French Ministry of Research and Enseignement (#DC-2008-509). It is also recorded at the Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés.

The exclusion criteria were patients under the age of 18 yr old and subjects with aplasia or immunosuppressive disease (e.g., HIV infection). Septic shock was defined by an identifiable site of infection, persisting hypotension despite fluid resuscitation requiring vasopressor therapy, and evidence of a systemic inflammatory response manifested by at least 2 of the following criteria: 1) temperature $>38^{\circ}\text{C}$ or $<36^{\circ}\text{C}$; 2) heart rate >90 beats/min; 3) respiratory rate >20 breaths/min; or 4) white blood cell count $>12,000/\text{mm}^3$ or $<4000/\text{mm}^3$. Severity was assessed by the SAPS II, calculated at inclusion in the protocol. Development of organ dysfunction was assessed by the SOFA (range: 0–24), measured after 24 h of ICU stay. Mortality was defined as death occurring within 28 days after the onset of shock, which was defined as the beginning of vasopressor therapy. The immunosuppressive state of septic patients was verified by measuring decreased mHLA-DR expression, low CD4^+ lymphocyte count, and elevated T_{reg} percentage, as described previously [14].

Flow cytometry staining

EDTA anticoagulated blood was collected once from patients at day 3 or day 4 after diagnosis of septic shock. The staining of fresh whole blood was performed as described previously [15]. The preanalytical procedure was exactly the same between healthy volunteers and septic shock patients. Blood samples were stimulated with increasing concentrations of rhIL-7 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) to measure pSTAT5 in CD4^+ T cell subsets with the PerFix EXPOSE kit (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Staining was performed by use of Pacific Blue-labeled anti- CD4 , PE-labeled anti-pSTAT5 (Beckman Coulter), and AF647-labeled anti-FOXP3 (Clone 259D; BioLegend, San Diego, CA, USA) antibodies. It takes 90 min to complete the entire protocol (both intra and cell surface staining, lysis, and wash steps).

Analyses were performed on a NAVIOS flow cytometer by use of NAVIOS software (Beckman Coulter). pSTAT5 expression was measured in both CD4^+ T populations: T_{reg} ($\text{CD4}^+\text{FOXP3}^+$ cells) and $\text{CD4}^+\text{FOXP3}^-$ cells (which are a mixture of effector, memory, and naïve CD4^+ T cells and which we will abbreviate as T_{eff} as opposed to T_{reg}), selected among CD4^+ lymphocytes (Fig. 1A and B). MFIs were reported for each subset (Fig. 1C).

Statistical analysis

Results (MFI) are expressed as means $\pm$ sd. MFIs were compared between T cell subsets by use of the nonparametric Mann-Whitney *U*-test and Wilcoxon test. Based on the percentages of maximal effect, the EC_{50} were calculated for each cytokine in T_{reg} and T_{eff} . EC_{50} were then compared by use of extra sum-of-squares F-test. Statistical analyses were performed with GraphPad Prism Software (version 5.0; GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). $P < 0.05$ was considered significant.

RESULTS AND DISCUSSION

Septic syndromes represent the first cause of mortality in ICUs [2]. Although a huge effort has been expended during the last 20 yr to find new, specific therapies, the mortality of septic patients remains considerable. It is now well established that septic patients develop innate and adaptive severe immune alterations. Besides, intensity and duration of these alterations are linked with increased risk of death and development of ICU-acquired infections [16]. Consequently, immune-stimulating therapies are now considered in the treatment of sepsis [14, 17, 18]. Interestingly, several studies supported the hypothesis that IL-7, a cytokine required for T cell development and differentiation, could represent an innovative therapy in the treatment of sepsis [3, 6, 19, 20]. IL-7R (i.e., CD127) is differently expressed on T_{eff} and T_{reg} , explaining why rhIL-7 may have differential effects on these T cell subsets. With the consideration of the putative, harmful role of T_{reg} during sepsis-induced immunosuppression, it was of interest to assess this differential response in septic patients. Thus, the main goal of this pilot study was to compare the ex vivo responses of septic shock patients and healthy volunteers' T cell subsets with increasing rhIL-7 concentrations by measuring intracellular pSTAT5 in whole blood by flow cytometry.

Thirteen septic shock patients were included in this study. Five of them died (31.5%) after 28 days follow-up. Clinical characteristics are listed in Table 1. Patients were sampled once at day 3 or day 4 after the onset of shock, as previous studies showed that sepsis-induced lymphocyte anergy is maximal at this time-point [14]. Indeed, we observed that patients presented with low CD4^+ T cell counts, elevated T_{reg} percentage, and decreased mHLA-DR expression (Table 1).

We observed typical dose responses for pSTAT5 to rising doses of rhIL-7 in T_{eff} and T_{reg} in patients and healthy volunteers. Moreover, maximal responses to the highest rhIL-7 concentrations were similar between septic patients and controls, and no difference in plateau effects was observed (Fig. 2). This

Figure 1. Gating strategy and representative examples of pSTAT5 expression in T cell subsets. CD4^+ lymphocytes were identified based on side-scattered (SSC) versus CD4 expression on a biparametric histogram (A). T_{reg} and T_{eff} were identified among selected CD4^+ cells depending on FOXP3 expression (B). The MFI of pSTAT5 was reported for T_{eff} (C) at baseline (white) and after low rhIL-7 stimulation (1 pg/ml; gray) in an overlay representation for a septic shock patient.

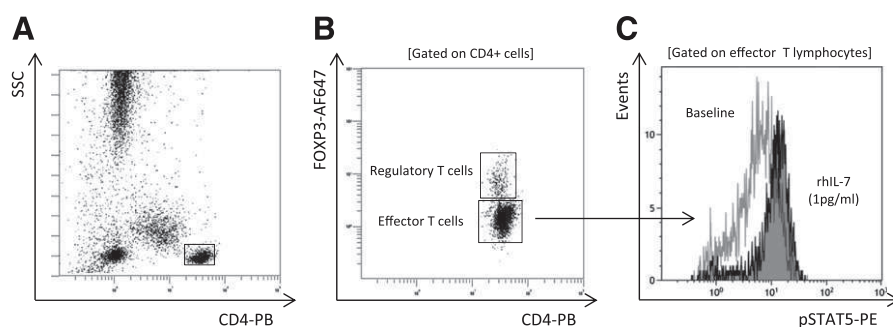


TABLE 1. Demographic, clinical, and immunological data for septic shock patients

Parameters	Overall septic shock patients, <i>n</i> = 13
Age at admission (yr)	78 (65–79)
Gender—male, <i>n</i> (%)	10 (76.9)
SAPS II at diagnosis of shock	51 (46–72)
SOFA at diagnosis of shock	9 (7–12)
28 day nonsurvivors, <i>n</i> (%)	5 (38.5)
Main admission category	
Medical, <i>n</i> (%)	7
Surgery, <i>n</i> (%)	6
Number of comorbidities	
0, <i>n</i> (%)	3 (23.1)
≥1, <i>n</i> (%)	10 (76.9)
Macabe score at diagnosis of shock	
0, <i>n</i> (%)	10 (76.9)
1, <i>n</i> (%)	2 (15.4)
2, <i>n</i> (%)	1 (7.7)
Infection diagnosis, <i>n</i> (%)	
Radiology	3 (23.1)
Microbiology	7 (53.8)
Surgery	2 (15.4)
Microbiologically documented, <i>n</i> (%)	
Bacilli gram –	7 (53.8)
Cocci gram+	1 (7.7)
Fungi	0
Other	0
Type of infection, <i>n</i> (%)	
Community acquired	10 (76.9)
Nosocomial	3 (23.1)
Site of infection, <i>n</i> (%)	
Pulmonary	4 (30.8)
Abdominal	4 (30.8)
Others	5 (38.5)
Immunologic parameters	
CD4 days 3–4 (cells/ μ l)	278 (146–540)
T _{reg} (%)	7.9 (6.9–16.5)
mHLA-DR Days 3–4 (antibody bound per cell)	3927 (3017–8643)

important result shows that rhIL-7 can still activate circulating CD4⁺ lymphocytes during sepsis-induced immunosuppression. This result agrees with a previous report showing that anergic/exhausted septic patients' lymphocytes were rejuvenated by

ex vivo IL-7 treatment (i.e., restoration of proliferation and IFN- γ production) [9].

A second noteworthy result is that basal levels of pSTAT5 expression in nonstimulated cells were significantly higher in CD4⁺ lymphocytes from septic patients compared with controls (Fig. 2; T_{eff}, *P* = 0.0004; T_{reg}, *P* = 0.0006). This increased pSTAT5 expression in circulating lymphocytes from patients might be the consequence of the major cellular activation occurring during the very first hours of septic shock (cytokine storm).

Regarding rhIL-7 stimulation with the lowest dose (1 pg/ml), both healthy volunteers' T_{eff}s and T_{reg}s were activated (Fig. 3A and B; T_{eff}, *P* = 0.002; T_{reg}, *P* = 0.002). Importantly, we observed that depending on its dosage, rhIL-7 could stimulate preferentially T_{eff} over T_{reg} in septic shock patients. Indeed, the lowest concentrations of rhIL-7 (1 pg/ml) significantly activated T_{eff} (Fig. 3C; *P* = 0.027) but had no effect on T_{reg} (Fig. 3D; *P* = 0.151) subsets. This is of utmost importance, as T_{reg}s are known to play a deleterious role during sepsis-induced immunosuppression. These results are in accordance with results reported in clinical trials. In HIV-infected patients, Lévy et al. [5] observed that the relative frequency of T_{reg} decreased significantly for the rhIL-7-treated subjects at day 28, whereas other CD4⁺ subsets had greater expansions. Similar results were observed by Sportès et al. [7] in subjects with refractory malignancy. In these studies, no major adverse effect was recorded for IL-7. Regarding septic shock, Unsinger et al. [10] observed in mice models of fungal sepsis that IL-7 improved survival, increased CD4⁺ and CD8⁺ cells' absolute counts, and improved proliferation and activation of CD4⁺ T cells. In line, in septic shock patients presenting features of severe immunosuppression, ex vivo IL-7 administration restored all altered lymphocyte functions, e.g., proliferation and IFN- γ production [9]. In this preclinical study, the authors pointed out that the rhIL-7 intracellular pathway remained active in immunosuppressed septic patients.

One intriguing development of the present results was that despite similar kinetic responses in both T cell subsets (Fig. 4A and B), nonsurviving patients exhibited significantly lower STAT5 expression. Indeed, EC₅₀ were not significantly different between survivors and nonsurvivors for T_{eff} or T_{reg} (T_{eff}: EC₅₀ survivors, 0.001 ng/ml, and EC₅₀ nonsurvivors, 0.0025 ng/ml, *P* = 0.163; T_{reg}: EC₅₀ survivors, 0.005 ng/ml, and EC₅₀ nonsurvivors, 0.015 ng/ml, *P* = 0.100). However, lower

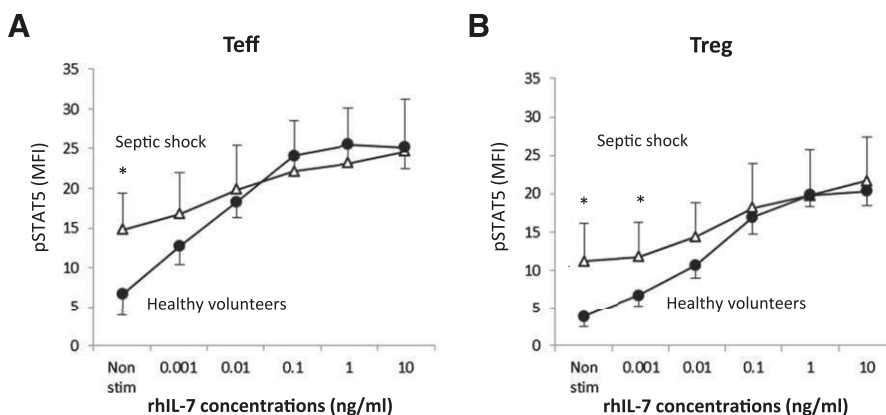


Figure 2. rhIL-7 dose effects on pSTAT5 in T cells from septic patients and healthy controls. MFI of pSTAT5 expressions in T_{eff}s (A) and T_{reg}s (B) from septic shock patients (open triangles, *n* = 13) and healthy volunteers (closed circles, *n* = 10) in response to rhIL-7 challenge. Results are presented as means and sd. **P* < 0.05 (Mann-Whitney tests) for a given rhIL-7 concentration.

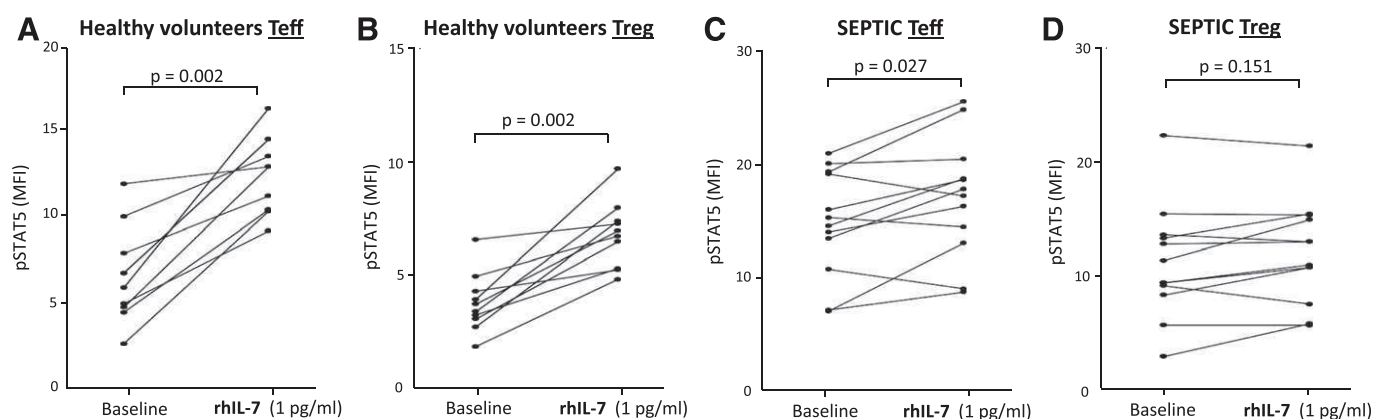


Figure 3. pSTAT5 expression variations between baseline and low rhIL-7 stimulation. Individual MFIs of pSTAT5 expression variations between baseline and after rhIL-7 stimulation (1 pg/ml) in healthy volunteers for T_{eff} s (A) and T_{reg} s (B) and in septic shock patients for T_{eff} (C) and T_{reg} s (D; Wilcoxon tests).

pSTAT5 expressions were observed in nonsurvivors (Fig. 4A and B; T_{eff} : rhIL-7, 1 pg/ml, $P = 0.045$, T_{eff} : rhIL-7, 10 ng/ml, $P = 0.019$; T_{reg} : rhIL-7, 1 pg/ml, $P = 0.045$, T_{reg} : rhIL-7, 10 ng/ml, $P = 0.093$). Even at high rhIL-7 dosage, they could not reach activation levels seen in healthy donors. We also found that stimulation with the lowest concentration of rhIL-7

induced an activation of T_{eff} in survivors (Fig 4D; $P = 0.047$), whereas no significant difference was observed between baseline and lowest rhIL-7 stimulation in nonsurvivors (Fig 4C; $P = 0.438$). One may hypothesize that this could be related to the newly described phenomenon of cellular exhaustion, in which upon strong activation, lymphocytes progressively lose their

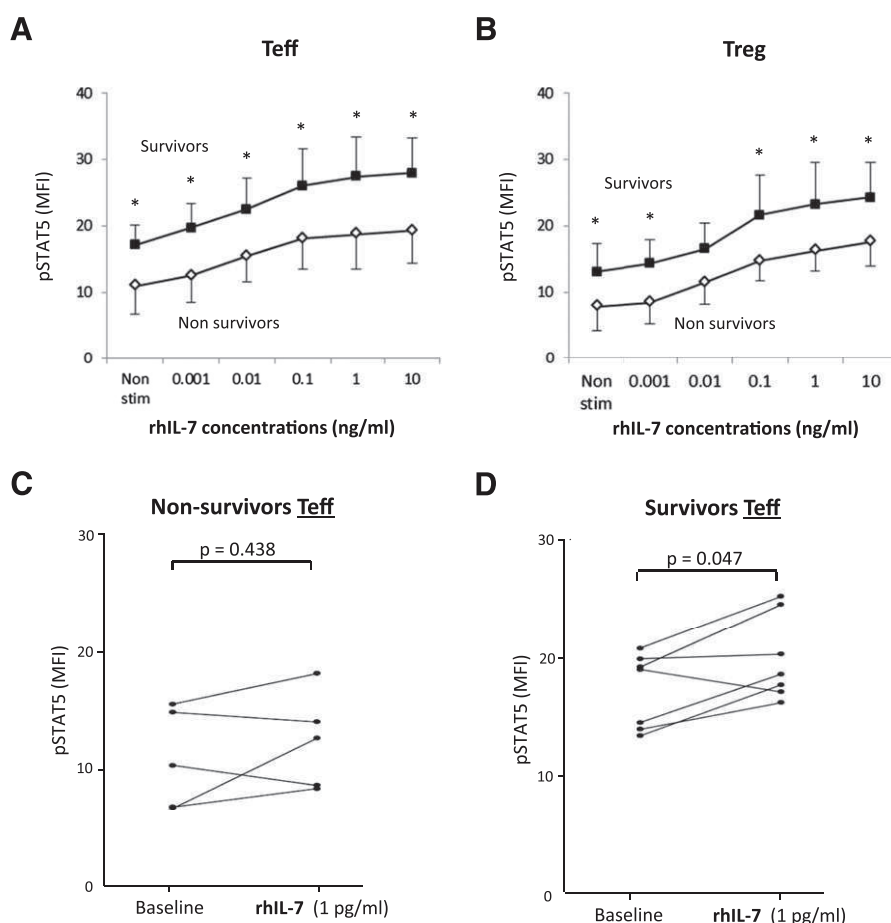


Figure 4. rhIL-7 dose effects on pSTAT5 in T cells from septic patients in survivors and nonsurvivors. MFIs of pSTAT5 expressions in T_{eff} s (A) and in T_{reg} s (B) from survivor (closed squares, $n = 8$) and nonsurvivor (open diamonds, $n = 5$) patients in response to rhIL-7 challenge. Results are presented as means and SD. $*P < 0.05$ (Mann-Whitney tests) for a given rhIL-7 concentration. Individual MFIs of pSTAT5 expression variations between baseline and after rhIL-7 stimulation (1 pg/ml) for T_{eff} s in nonsurvivors (C; $n = 5$) and survivors (D; $n = 8$; Wilcoxon tests).

effector functions. However, this aspect needs to be confirmed by additional study investigating simultaneously pSTAT5 expression, effector function (proliferation and cytokine production), and negative coregulator protein expression (e.g., CTLA-4 or programmed cell death 1) in lymphocytes from septic shock patients. Indeed, further work should be performed to investigate whether pSTAT5 might represent a surrogate marker of lymphocyte functions (such as proliferation, cytokine secretion, etc.).

By nature, a pilot study presents with limitations (in this case, few patients, controls not matched in age), but 1 of our objectives was, as a first step, to establish the feasibility of conducting this kind of pharmacological approach in the whole blood of patients. As results appear to be of interest, further works should be conducted in larger cohort of patients with serial sampling to assess immune response over time evolution, while considering the effect of age on a putative STAT5 overexpression and including critically ill, nonseptic patients as controls. In addition, the exact role of T_{reg} during sepsis remains a matter of debate. Authors report different effects (deleterious or protective) depending on time and model of experimental sepsis [21–23]. This aspect has not been investigated in the present work.

Finally, the present report illustrates the value of this simple flow cytometric approach for monitoring pharmacological responses to drugs used in daily ICU practice. Direct treatment of whole blood, including surface (e.g., CD4) and intracellular staining (here, phosphoantigen and FOXP3), represents a true improvement in the field. Although this protocol cannot be considered as a typical functional test (e.g., equivalent to the measurement of lymphocyte proliferation or cytokine production), it functionally assesses the immediate cellular response to a given cytokine. On the basis of discrepant results between survivors and nonsurvivors, we may also envisage this method for identifying the more immune-depressed patients. In addition, this approach might be of considerable interest to monitor the effects of recombinant cytokines used in a clinical setting and to get further insights into a cell's activation status, in addition to the usual measurement of cell count, as performed previously. This may be particularly interesting with respect to rhIL-7, which has been proposed by some authors as a good candidate to treat patients surviving the first hours of septic shock, who present with major lymphocyte alterations [18].

In conclusion, we showed here the capacity of rhIL-7 to ex vivo activate CD4⁺ lymphocyte subsets from septic shock patients through pSTAT5 measurement. Importantly, we have reported here a differential response of T_{eff} versus T_{reg} from patients exposed to rhIL-7 at low concentration and observe significantly lower T_{eff} STAT5 expression in patients who were going to die. In lieu of validation in a larger cohort of patients, the present report indicates that such results, obtained in <90 min, may serve to monitor rhIL-7 therapy efficacy in future clinical studies.

AUTHORSHIP

J.D. and G.D. performed the experiments and the statistical analyses. J.D., G.D., F.V., and G.M. wrote the paper and designed

the experiments. G.D., A.L., T.R., and J.M. included patients. F.V., A.F., A.L., T.R., J.M., and G.M. analyzed and discussed the results and read and discussed the paper. All authors read and approved the final manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Anne Portier from the Immunology Laboratory of Hopital E. Herriot-Lyon for her help in performing preanalytical handling of samples and H       Vallin (Clinical Research Center, Lyon-sud) for her work on patients' inclusion and clinical data acquisition.

DISCLOSURES

This study was supported by Beckman Coulter through donations of laboratory equipment and supplies. This private company had no role in the study design, collection, or interpretation of the data. Likewise, Beckman Coulter had no role in the preparation of the manuscript or the decision to submit it for publication.

REFERENCES

1. Angus, D. C., van der Poll, T. (2013) Severe sepsis and septic shock. *N. Engl. J. Med.* **369**, 840–851.
2. Levy, M. L., Artigas, A., Phillips, G. S., Rhodes, A., Beale, R., Osborn, T., Vincent, J. M., Townsend, S., Lemeshow, S., Dellinger, R. P. (2012) 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.
3. Hotchkiss, R. S., Monneret, G., Payen, D. (2013) Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 862–874.
4. Rochman, Y., Spolski, R., Leonard, W. J. (2009) New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 480–490.
5. Lévy, Y., Sereti, I., Tambussi, G., Routy, J. P., Lelièvre, J. D., Delfraissy, J. F., Molina, J. M., Fischl, M., Goujard, C., Rodriguez, B., Rouzioux, C., Avettand-Fenoël, V., Croughs, T., Beq, S., Morre, M., Poulin, J. F., Sekaly, R. P., Thiebaut, R., Lederman, M. M. (2012) Effects of recombinant human interleukin-7 on T-cell recovery and thymic output in HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy: results of a phase I/IIa randomized, placebo-controlled, multicenter study. *Clin. Infect. Dis.* **55**, 291–300.
6. Mackall, C. L., Fry, T. J., Gress, R. E. (2011) Harnessing the biology of IL-7 for therapeutic application. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 330–342.
7. Sportès, C., Babb, R. R., Krumlauf, M. C., Hakim, F. T., Steinberg, S. M., Chow, C. K., Brown, M. R., Fleisher, T. A., Noel, P., Maric, I., Stetler-Stevenson, M., Engel, J., Buffet, R., Morre, M., Amato, R. J., Pecora, A., Mackall, C. L., Gress, R. E. (2010) Phase I study of recombinant human interleukin-7 administration in subjects with refractory malignancy. *Clin. Cancer Res.* **16**, 727–735.
8. Hotchkiss, R. S., Moldawer, L. L. (2014) Parallels between cancer and infectious disease. *N. Engl. J. Med.* **371**, 380–383.
9. Venet, F., Foray, A. P., Villars-Méchin, A., Malcu, C., Poitevin-Later, F., Lepape, A., Monneret, G. (2012) IL-7 restores lymphocyte functions in septic patients. *J. Immunol.* **189**, 5073–5081.
10. Unsinger, J., Burnham, C. A., McDonough, J., Morre, M., Prakash, P. S., Caldwell, C. C., Dunne, Jr., W. M., Hotchkiss, R. S. (2012) Interleukin-7 ameliorates immune dysfunction and improves survival in a 2-hit model of fungal sepsis. *J. Infect. Dis.* **206**, 606–616.
11. Unsinger, J., McGlynn, M., Kasten, K. R., Hoekzema, A. S., Watanabe, E., Muenzer, J. T., McDonough, J. S., Tschoep, J., Ferguson, T. A., McDunn, J. E., Morre, M., Hildeman, D. A., Caldwell, C. C., Hotchkiss, R. S. (2010) IL-7 promotes T cell viability, trafficking, and functionality and improves survival in sepsis. *J. Immunol.* **184**, 3768–3779.
12. Venet, F., Chung, C. S., Kherouf, H., Geeraert, A., Malcu, C., Poitevin, F., Bohé, J., Lepape, A., Ayala, A., Monneret, G. (2009) Increased circulating regulatory T cells (CD4(+)CD25(+)CD127(–)) contribute to lymphocyte anergy in septic shock patients. *Intensive Care Med.* **35**, 678–686.
13. Dellinger, R. P., Levy, M. M., Rhodes, A., Annane, D., Gerlach, H., Opal, S. M., Sevransky, J. E., Sprung, C. L., Douglas, I. S., Jaeschke, R., Osborn,

- T. M., Nunnally, M. E., Townsend, S. R., Reinhart, K., Kleinpell, R. M., Angus, D. C., Deutschman, C. S., Machado, F. R., Rubenfeld, G. D., Webb, S. A., Beale, R. J., Vincent, J. L., Moreno, R.; Surviving Sepsis Campaign Guidelines Committee including the Pediatric Subgroup. (2013) Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Crit. Care Med.* **41**, 580–637.
14. Venet, F., Lukaszewicz, A. C., Payen, D., Hotchkiss, R., Monneret, G. (2013) Monitoring the immune response in sepsis: a rational approach to administration of immunoadjuvant therapies. *Curr. Opin. Immunol.* **25**, 477–483.
 15. Dupont, G., Demaret, J., Venet, F., Malergue, F., Malcus, C., Poitevin-Later, F., Morel, J., Monneret, G. (2014) Comparative dose-responses of recombinant human IL-2 and IL-7 on STAT5 phosphorylation in CD4+FOXP3⁺ cells versus regulatory T cells: a whole blood perspective. *Cytokine* **69**, 146–149.
 16. Hotchkiss, R. S., Coopersmith, C. M., McDunn, J. E., Ferguson, T. A. (2009) The sepsis seesaw: tilting toward immunosuppression. *Nat. Med.* **15**, 496–497.
 17. Hotchkiss, R. S., Opal, S. (2010) Immunotherapy for sepsis—a new approach against an ancient foe. *N. Engl. J. Med.* **363**, 87–89.
 18. Hotchkiss, R. S., Monneret, G., Payen, D. (2013) Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect. Dis.* **13**, 260–268.
 19. Alpdogan, O., van den Brink, M. R. (2005) IL-7 and IL-15: therapeutic cytokines for immunodeficiency. *Trends Immunol.* **26**, 56–64.
 20. Morre, M., Beq, S. (2012) Interleukin-7 and immune reconstitution in cancer patients: a new paradigm for dramatically increasing overall survival. *Target Oncol.* **7**, 55–68.
 21. Kühnhorn, F., Rath, M., Schmoeckel, K., Cziupka, K., Nguyen, H. H., Hildebrandt, P., Hünig, T., Sparwasser, T., Huehn, J., Pötschke, C., Bröker, B. M. (2013) Foxp3⁺ regulatory T cells are required for recovery from severe sepsis. *PLoS ONE* **8**, e65109.
 22. Scumpia, P. O., Delano, M. J., Kelly, K. M., O'Malley, K. A., Efron, P. A., McAuliffe, P. F., Brusko, T., Ungaro, R., Barker, T., Wynn, J. L., Atkinson, M. A., Reeves, W. H., Salzler, M. J., Moldawer, L. L. (2006) 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.
 23. Xiao, W., Mindrinos, M. N., Seok, J., Cuschieri, J., Cuenca, A. G., Gao, H., Hayden, D. L., Hennessy, L., Moore, E. E., Minei, J. P., Bankey, P. E., Johnson, J. L., Sperry, J., Nathens, A. B., Billiar, T. R., West, M. A., Brownstein, B. H., Mason, P. H., Baker, H. V., Finnerty, C. C., Jeschke, M. G., López, M. C., Klein, M. B., Gamelli, R. L., Gibran, N. S., Arnoldo, B., Xu, W., Zhang, Y., Calvano, S. E., McDonald-Smith, G. P., Schoenfeld, D. A., Storey, J. D., Cobb, J. P., Warren, H. S., Moldawer, L. L., Herndon, D. N., Lowry, S. F., Maier, R. V., Davis, R. W., Tompkins, R. G.; Inflammation and Host Response to Injury Large-Scale Collaborative Research Program. (2011) A genomic storm in critically injured humans. *J. Exp. Med.* **208**, 2581–2590.

KEY WORDS:

septic shock · interleukin-7 · immunosuppression · sepsis

Julie Demaret
Astrid Villars-Méchin
Alain Lepape
Jonathan Plassais
Hélène Vallin
Christophe Malcus
Françoise Poitevin-Later
Guillaume Monneret
Fabienne Venet

Elevated plasmatic level of soluble IL-7 receptor is associated with increased mortality in septic shock patients

Received: 21 March 2014
Accepted: 16 May 2014
Published online: 25 June 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg and ESICM 2014

Take-home message: Increased plasmatic level of soluble IL-7 receptor (CD127) is associated with elevated mortality in septic shock patients. This may be of interest for patient stratification in future clinical trials testing immunoadjuvant therapies.

Electronic supplementary material

The online version of this article (doi:10.1007/s00134-014-3346-0) contains supplementary material, which is available to authorized users.

J. Demaret · A. Villars-Méchin ·
C. Malcus · F. Poitevin-Later ·
G. Monneret (✉) · F. Venet
Cellular Immunology Laboratory, Hôpital
E. Herriot, Hospices Civils de Lyon,
Pavillon E, 5 place d'Arsonval, 69437 Lyon
Cedex 03, France
e-mail: guillaume.monneret@chu-lyon.fr
Tel.: +33 4 72 11 97 58

J. Demaret · A. Lepape ·
G. Monneret · F. Venet
Université Claude Bernard Lyon I, Hospices
Civils de Lyon, EAM 4174, Lyon, France

A. Lepape · H. Vallin
Intensive Care Units, Lyon-Sud University
Hospital, Hospices Civils de Lyon,
Pierre-Bénite, France

J. Demaret · A. Lepape ·
J. Plassais · G. Monneret · F. Venet
BioMérieux Joint Research Unit, Hôpital E
Herriot, Hospices Civils de Lyon, Lyon,
France

Abstract *Purpose:* Adjunctive immunoadjuvant therapies are now proposed in the treatment of septic patients that develop immune dysfunctions. However, a prerequisite is to identify patients at high risk of death that would benefit from such therapy. Knowing that rhIL-7 is a putative candidate for septic shock treatment, we evaluated the association between increased plasmatic level of soluble CD127 (sCD127, IL-7 receptor alpha chain) and mortality after septic shock.

Methods: sCD127 plasmatic level was measured in 70 septic shock patients sampled at day 1–2 (D1) and day 3–4 (D3) after the onset of shock and 41 healthy volunteers.

Results: Compared with survivors, non-survivors presented with

significantly higher sCD127 concentrations at D1 and D3 ($p < 0.001$ and $p = 0.002$). At D1, the area under the receiver operating characteristic curve for sCD127 level association with mortality was 0.846 ($p < 0.0001$). Kaplan–Meier survival curves illustrated that mortality was significantly different after stratification based on D1 sCD127 level (log rank test, hazard ratio 9.10, $p < 0.0001$). This association was preserved in multivariate logistic regression analysis including clinical confounders (age, SAPS II and SOFA scores, odds ratio 12.71, $p = 0.003$). Importantly, patient stratification on both D1 sCD127 value and SAPS II score improved this predictive capacity (log rank test, $p = 0.0001$). *Conclusions:* Increased sCD127 plasmatic level enables the identification of a group of septic shock patients at high risk of death. After confirmation in a larger cohort, this biomarker may be of interest for patient stratification in future clinical trials.

Keywords IL-7 receptor · CD127 · Septic shock · Mortality · Biomarker

Introduction

Despite improvement in patient care and the implementation of Surviving Sepsis Campaign guidelines, septic syndromes are still associated with a high risk of death in

intensive care units (ICU) [1]. Indeed, a recent epidemiological study including more than 25,000 patients in the USA and in Europe showed that overall hospital mortality from severe sepsis or septic shock is still over 30 % [2]. In line with this, one in 1,200 Americans will die of

severe sepsis this year and this is despite numerous clinical trials testing various adjuvant therapies and including thousands of patients [3].

One proposed explanation for the failure of these clinical trials was the absence of patient selection before the initiation of such adjunctive therapies. Indeed septic syndromes represent a group of heterogeneous diseases (from chronic pulmonary infection to purpura fulminans or peritonitis) with various germs (Gram-positive or Gram-negative bacteria or even fungi) occurring in patients with various clinical history (age, comorbidities like type I diabetes or hypertension). Moreover, host immune response to septic shock is heterogeneous as well: from massive cytokine release and cytokine storm to immune suppression [3–7]. Therefore, biomarker-based patient stratification is now strongly recommended as a prerequisite to drug administration in the design of future clinical trials testing adjunctive therapies in septic shock [8]. Such biomarkers of host response to infection should help the clinicians to (1) identify the most severe patients (at high risk of death or secondary nosocomial infection), (2) stratify patients before the initiation of targeted therapy, and (3) follow response to treatment.

Among adjunctive treatments now proposed in the therapeutic arsenal of sepsis are immunoadjuvant therapies [4, 8, 9]. Indeed, it is now well accepted that septic patients develop immune alterations that affect both innate and adaptive immune responses and whose intensity and duration are linked to increased risk of death and ICU-acquired infections [10]. In particular, one such therapy is recombinant human IL-7 (rhIL-7) as four studies in mice recently described its beneficial effects on mortality and sepsis-induced immune dysfunctions [11–14]. rhIL-7 is currently undergoing clinical trials notably to treat patients with cancer or chronic viral infections such as HIV or HBV infections. So far, this immunostimulant treatment has been well tolerated [15]. Moreover, we recently showed that ex vivo rhIL-7 treatment of septic patients' cells significantly restored sepsis-induced lymphocyte functions to a normal response [16].

The biological activities of IL-7 are mediated by its binding to a specific cell surface receptor partly consisting of the IL-7R α chain (CD127). Soluble forms of IL-7R α (sCD127) have been reported and recent studies associated their concentration with the pathogenesis of autoimmune diseases [17–19]. As IL-7 is to be tested in septic patients, we investigated whether its soluble receptor (i.e., sCD127) may be associated with clinical deleterious outcomes, and thus could constitute a potential biomarker for patient stratification. In the current study, we assessed the potential value of sCD127 as a predictor of mortality or nosocomial infection.

Methods

Study population

Seventy consecutive septic shock patients, according to the diagnostic criteria of the American College of Chest Physician/Society of Critical Care Medicine [20], who were alive 3 days after the onset of shock were included in this study (Table 1). This inclusion criterion was chosen because IL-7 (or any other potential immunoadjuvant therapy) is thought to be used in a delayed step of the disease (i.e., after day 3) [4]. Additional information is available in the electronic supplementary material (ESM).

Biological analyses were performed on residual blood after completing routine follow-up performed in the ICU. EDTA-anticoagulated tubes were collected at two time points after septic shock onset: day 1–2 (D1) and day 3–4 (D3). Reference values and control samples were obtained from a cohort of 41 healthy volunteers after informed consent was given.

Results

Seventy consecutive septic shock patients were included in this study. Fifty-six (80 %) were still alive after 28-day follow-up (10 in-ICU and 4 in-hospital deaths). No statistical difference was observed regarding gender, number of comorbidities, McCabe score, ventilation, use of vasopressors, or renal replacement therapy between survivors and non-survivors (Table 1). However, a significant difference was observed between these patients when considering age ($p = 0.041$), initial SAPS II ($p = 0.001$) and SOFA scores ($p = 0.026$). Reference values and control samples were obtained from a cohort of 41 healthy volunteers (median age 42 years, 23 women, 18 men).

As a first step, we measured plasmatic IL-7 concentration to assess whether it can predict, by itself, mortality or nosocomial infection in septic shock patients. Although very close to the detection limit of our technique, plasmatic IL-7 concentrations were significantly increased in septic shock patients versus healthy volunteers at D1 and D3 ($p < 0.001$, Fig. 1a in ESM). However, no evolution of IL-7 concentrations over time could be detected between D1 and D3 in patients and no difference was observed between survivors and non-survivors, or between patients developing or not developing secondary ICU-acquired infection (data not shown).

Despite the absence of difference at D1 ($p = 0.99$), we observed a small decrease of plasmatic sCD127 levels between healthy volunteers and septic shock patients at D3 ($p = 0.03$). Interestingly, a significant decrease in sCD127 concentrations was noted between D1 and D3 after septic shock ($p < 0.001$, Fig. 1a).

Table 1 Clinical characteristics of the 70 septic shock patients

Parameters	Overall septic shock patients <i>n</i> = 70	Survivors <i>n</i> = 56 (80 %)	Non-survivors <i>n</i> = 14 (20 %)	<i>p</i> value
Age at admission (years)	67 [56–76]	64 [55–74]	71 [67–77]	0.041
Gender—male, <i>n</i> (%)	45 (64.3)	36 (64.3)	9 (64.3)	1
Main admission category				
Medical, <i>n</i> (%)	34 (48.6)	27 (48.2)	7 (50)	1
Surgery, <i>n</i> (%)	36 (51.4)	29 (51.8)	7 (50)	
Number of comorbidities				
0, <i>n</i> (%)	40 (57.1)	30 (53.6)	10 (71.4)	0.366
≥1, <i>n</i> (%)	30 (42.9)	26 (46.4)	4 (28.6)	
SAPS II	52 [42–65]	50 [39–60]	66 [52–77]	0.001
SOFA score	10 [8–13]	10 [8–12]	13 [10–17]	0.026
McCabe score				
1, <i>n</i> (%)	44 (62.8)	36 (64.3)	8 (57.2)	0.196
2, <i>n</i> (%)	20 (28.6)	17 (30.3)	3 (21.4)	
3, <i>n</i> (%)	6 (8.6)	3 (5.4)	3 (21.4)	
Infection (<i>n</i> , %)				
Diagnosis				
Radiology	10 (14.3)	7 (12.5)	3 (21.4)	0.505
Surgery	9 (12.9)	7 (12.5)	2 (14.3)	
Microbiologically documented				
Bacilli Gram—	37 (52.9)	29 (51.8)	8 (57.1)	0.772
Cocci Gram+	27 (38.6)	23 (41.1)	4 (28.6)	0.542
Fungi	6 (8.6)	4 (7.1)	2 (14.3)	0.592
Other	7 (10)	5 (8.9)	2 (14.3)	0.621
Type of infection				
Community acquired	39 (55.7)	32 (57.1)	7 (50)	0.766
Nosocomial	31 (44.3)	24 (42.9)	7 (50)	
Site of infection				
Pulmonary	27 (38.6)	19 (34)	8 (57.2)	0.192
Abdominal	29 (41.4)	26 (46.4)	3 (21.4)	
Others	14 (20)	11 (19.6)	3 (21.4)	
Ventilation D3–4	64 (91.4)	50 (89.3)	14 (100)	0.337
Vasopressors D3–4	50 (71.4)	39 (69.6)	11 (78.6)	0.742
Renal replacement therapy D3–4	15 (21.4)	9 (16.1)	6 (42.9)	0.062
Secondary nosocomial infections, <i>n</i> (%)	22 (31.4)			
In-ICU mortality, <i>n</i> (%)	10 (14.3)			
Post-ICU mortality, <i>n</i> (%)	4 (5.7)			
Immunologic parameters				
mHLA-DR day 3–4 (AB/C)	5,396 [2,159–10,033]	8,041 [2,237–10,854]	5,024 [1,949–6,688]	0.428
Lymphocyte count D3–4 (10 ⁹ /l)	0.84 [0.54–1.38]	0.90 [0.66–1.42]	0.59 [0.43–1.07]	0.120

Blood samples were obtained from 70 septic shock patients after the onset of shock. For clinical parameters, categorical data are presented as number of cases and percentage of the total population in brackets. Continuous data and biological parameters are presented as medians and interquartile ranges [Q1–Q3]. SAPS II (Simplified Acute Physiology Score II) and McCabe scores were calculated after admission. SOFA (Sequential Organ Failure

Assessment) score was measured after 24 h of ICU stay. mHLA-DR (AB/C), number of anti-HLA-DR antibodies bound per monocyte (normal value from age-matched healthy volunteers is >15,000 AB/C). Continuous parameters are compared between survivors and non-survivors using Mann–Whitney tests and Fisher's exact tests were performed for categorical data

No correlation between plasmatic sCD127 and IL-7 concentrations was found at day D1 or D3 (respective Spearman's rank correlation coefficients, $r = -0.148$ and $r = -0.066$). Similarly, no significant correlation between sCD127 levels and mHLA-DR, SOFA or SAPS II scores was observed at D1 or D3 (data not shown). Moreover, no statistical difference was observed for sCD127 measurements when comparing patients with or without comorbidities and with nosocomial or community-acquired septic shock at both time points.

When comparing sCD127 concentrations between patients developing or not developing secondary ICU-

acquired infections, no statistical difference was observed at D1 ($p = 0.60$) or D3 ($p = 0.28$, Fig. 1b in ESM). However, non-survivors presented with significantly higher sCD127 concentrations at D1 ($p < 0.001$) and at D3 ($p = 0.002$) compared with survivors (Fig. 1b).

The areas under the receiver operating characteristic curves (AUC) for prediction of 28-day mortality were calculated for sCD127, SAPS II, and SOFA scores. The best AUC was observed for sCD127 concentration at D1 (0.846, [95 % CI] 0.741–0.951, $p < 0.001$, Fig. 2). At D3, the AUC for sCD127 was 0.774 ([95 % CI] 0.618–0.930, $p = 0.002$). The AUC for SOFA and

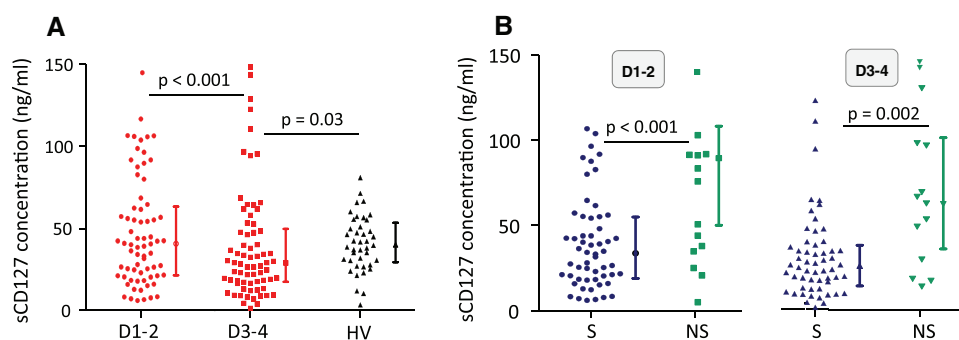


Fig. 1 Plasmatic concentration of soluble IL-7R α -chain (sCD127) in septic shock patients. Plasmatic sCD127 concentrations were measured in septic shock patients ($n = 70$) at day 1–2 (D1–2, red circles) and day 3–4 (D3–4, red squares) after the onset of shock in comparison with healthy volunteers (HV, black triangles, $n = 41$)

SAPS II scores were, respectively 0.692 ([95 % CI] 0.531–0.853, $p = 0.027$) and 0.770 ([95 % CI] 0.644–0.897, $p = 0.002$).

Logistic regression analyses were then performed to assess if this marker remained independently associated with mortality after septic shock. When considering independently other usual clinical confounders such as SOFA or SAPS II scores, higher sCD127 concentrations at D1 or D3 remained significantly associated with a higher risk of death after septic shock (Table 2).

Using cutoff values determined on ROC curves based on calculation of the minimum d (sCD127 at D1, 48.78 ng/ml; sCD127 at D3, 41.56 ng/ml; SAPS II, 59), Kaplan–Meier survival curves were established (Fig. 3a, b). The survival rates of septic patients were significantly different when stratified according to sCD127 concentrations at D1 and D3. Patients with lower sCD127 concentration had better survival compared with patients with higher sCD127 concentration (log rank test, at D1, $p < 0.001$, hazard ratio 9.10, [95 % CI] 2.92–28.35; at D3, $p < 0.001$, hazard ratio 13.47, [95 % CI] 3.93–46.14). When using cutoff value of 59 for SAPS II, we observed a statistical difference in the survival rates of septic patients ($p = 0.0082$, log rank test, hazard ratio 4.61, [95 % CI] 1.48–14.31, data not shown).

Besides, using this threshold (sCD127 at D1, 48.78 ng/ml), the sensitivity of sCD127 concentration for differentiating survivors from non-survivors was 79 % and its specificity 73 %. The positive predictive value (PPV) was 42 % and the negative predictive value (NPV) 93 %. In comparison, respective sensitivity and specificity for SAPS II score were 64 and 73 %. PPV and NPV were 38 and 89 %.

Interestingly, at D1, when stratified on the basis of the combination of sCD127 concentration and SAPS II score, the difference between the survival rates of patients was even greater. Indeed, patients with lower sCD127 concentration and lower SAPS II had a significantly better survival than patients with higher sCD127 concentration and higher SAPS II ($p < 0.001$, log rank test, Fig. 2a in

(a), and in survivors (S, blue, $n = 56$) versus non-survivors (NS, green, $n = 14$) (b). Non-parametric Mann–Whitney U test was used to compare results between groups. Non-parametric Wilcoxon paired test was used to evaluate overtime evolution within a group

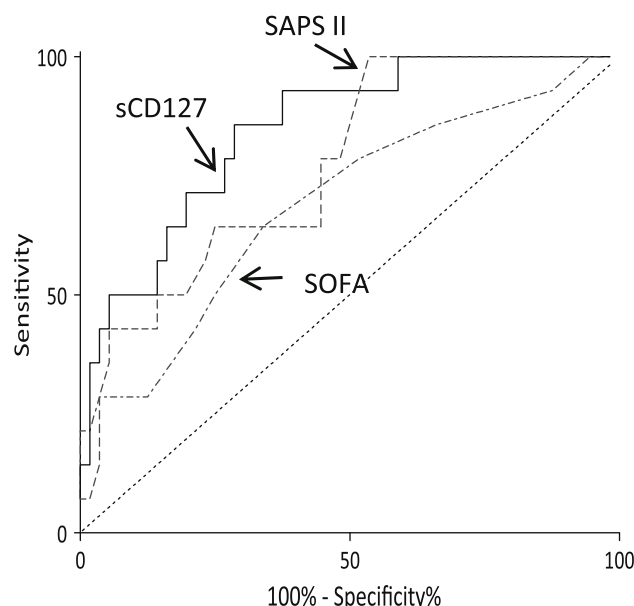


Fig. 2 Receiving operating characteristic curves of SAPS II, SOFA, and sCD127 at D1–2 for predicting mortality. Area under receiver operating characteristic curves, 0.846 ($p < 0.001$) for sCD127 D1, 0.770 ($p = 0.002$) for SAPS II, and 0.692 ($p = 0.027$) for SOFA. Regarding sCD127 values, the best threshold calculated on the basis of minimum d (minimum distance between ROC curve and point of sensitivity and specificity = 1) was 48.78 ng/ml at D1. For this cutoff value at day 1–2, positive predictive value was 42 % and negative predictive value was 93 %

ESM). This was even conserved when sCD127 measurement was delayed until D3 after the onset of shock ($p < 0.001$, log rank test, Fig. 2b in ESM).

Discussion

The failure of several high-profile clinical trials in sepsis testing various adjuvant therapies represents one of the

Table 2 Multivariate analysis

Parameters included in multivariate analysis	Threshold	OR	95 % CI	<i>p</i> *
sCD127 D1–2	>48.78	8.97	2.10–38.36	0.003
SAPS II	>59	4.18	1.07–16.33	0.040
sCD127 D1–2	>48.78	10.74	2.36–48.95	0.002
SOFA	>13.5	0.82	0.17–4.00	0.811
sCD127 D3–4	>41.56	13.53	2.95–62.09	0.001
SAPS II	>59	7.01	1.54–31.91	0.012
sCD127 D3–4	>41.56	10.35	2.47–43.40	0.001
SOFA	>13.5	0.96	0.19–4.93	0.964

Multivariate logistic regression analysis was used to identify the variables associated with death ($n = 56$ survivors and 14 non-survivors). sCD127 (D1–2 or D3–4) was included in models either with SAPS II (Simplified Acute Physiology Score II) or SOFA (Sequential Organ Failure Assessment) scores. SAPS II score was

calculated after admission. SOFA score was measured after 24 h of ICU stay

OR odds ratio, 95 % CI 95 % confidence interval

* Backward selection was used and a p value of 0.05 was considered as statistically significant

greatest disappointments of the past 30 years [3]. Among others, one explanation proposed for the failure of these trials is that the heterogeneity of the septic patient population and of their pathophysiologic response was never considered in the design of these clinical studies. Indeed, septic syndrome affects a group of patients with different etiologies (from pneumopathy to peritonitis) caused by different germs (Gram-positive or Gram-negative bacteria or even fungi) and with different medical history (with or without comorbidities). Moreover, it is now clear that the host immune response after septic shock is variable from one patient to another and also evolves over time, being associated with both an overwhelming cytokine release called cytokine storm and the later development of sepsis-induced immune dysfunctions [4, 5]. Therefore, the need for patient stratification before the initiation of any therapy targeting host response is now considered as mandatory in the design of future clinical trials testing such adjunctive therapies in sepsis [8].

To enable such stratification, robust and reliable biomarkers identifying patients at high risk of death or nosocomial infections are mandatory. One example is the decreased expression on circulating monocytes of human leukocyte antigen-DR (mHLA-DR), which has been shown to be associated with increased risk of death or secondary infections in various ICU clinical contexts (septic shock, trauma, burn, pancreatitis, etc.) [8, 21]. Interestingly, the measurement of this marker is now included for patient stratification in the design of clinical trials evaluating immune-stimulating therapies such as GM-CSF [22]. One limitation to the use of this biomarker is that its measurement is performed by flow cytometry which requires strict pre-analytical conditions and is not available 24/7 in most clinical labs.

In the current study, knowing that IL-7 is to be assessed in sepsis clinical trials, we tested the hypothesis that plasmatic sCD127 (its soluble receptor) level measurement might represent a robust and easy-to-measure biomarker for identification of patients at high risk of

death after septic shock. The main result was to observe the highest sCD127 levels in a group of patients presenting with increased mortality.

CD127 constitutes the alpha chain of the IL-7 receptor, a heterodimer comprised of CD127 and the common cytokine receptor γ -chain (CD132). As with many cytokine receptors, a soluble form of the IL-7R α chain (sCD127) has been identified [23]. However, the origins (alternative splicing and release of membrane-bound form) and functions of plasmatic sCD127 as well as the mechanisms regulating the level of CD127 expression on the cell surface are not well known. The soluble protein was shown to bind to IL-7 in solution and is known to be involved in several aspects of the immune response including inflammation, cellular proliferation, and apoptosis [24, 25]. In addition, studies have pointed out that sCD127 could be a marker of immunopathogenesis in several diseases such as HIV infection, multiple sclerosis [26], leukemia [26, 27], systemic lupus erythematosus [17], and type 1 diabetes [18].

In the current study, we observed a significant association between increased sCD127 plasmatic level and increased risk of death after septic shock. Moreover, maximal difference in sCD127 concentrations between survivors and non-survivors was observed as early as D1 after the onset of shock. This is interesting because most biomarkers of host immune response usually present with predictive value in regard to deleterious outcome later on after the onset of shock (as is the case for mHLA-DR). Therefore, increased sCD127 could thus prove to be a very early biomarker usable for patient stratification rapidly after septic shock. Moreover, as suggested by experts in the field, as the immune response after sepsis is a rapidly evolving phenomenon, the dynamic measurement of sCD127 over time could be more informative than a single measurement [28]. Although we may hypothesize that sCD127 is a consequence of tremendous lymphocyte activation, the reason for this amplified increase in non-survivors remains to be investigated.

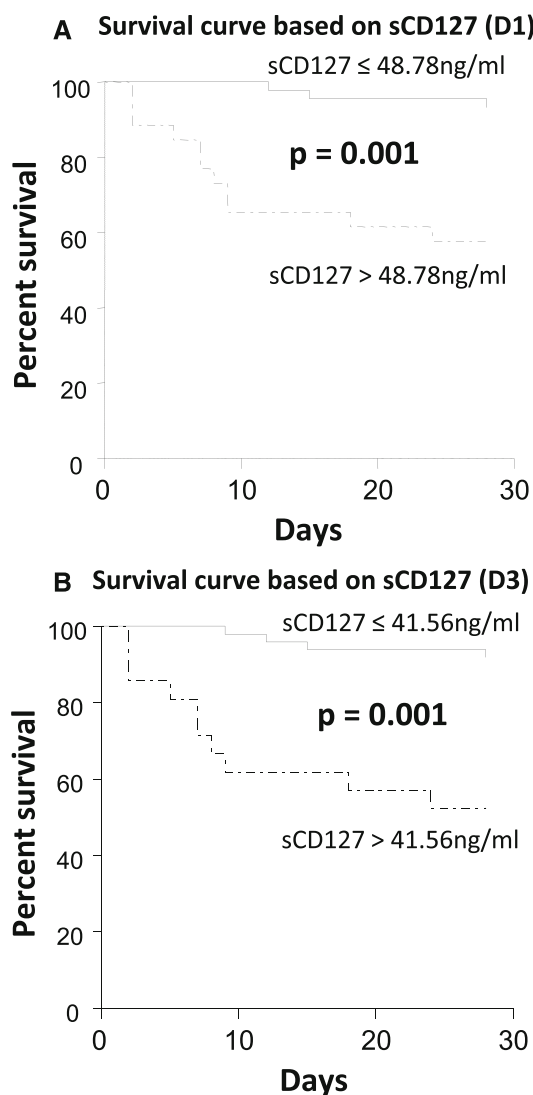


Fig. 3 Survival curves. Kaplan–Meier survival curves were established on the basis of sCD127 cutoff values at day 1–2 (48.78 ng/ml) (a) and day 3–4 (41.56 ng/ml) (b). A significant difference was measured between the two curves (a: $p < 0.001$, log rank test, hazard ratio 9.10, [95 % CI] 2.92–28.35 at day 1–2. b: $p < 0.001$, log rank test, hazard ratio 13.47, [95 % CI] 3.93–46.14 at day 3–4)

In addition, the association between increased sCD127 and higher risk of death was preserved in multivariate analysis including clinical confounders such as SOFA and SAPS II scores. This suggests that the predictive value of this biomarker is independent of patients' initial severity and that this marker may be informative by itself. Most interestingly, the combination of sCD127 level and SAPS II improved the predictive value compared with each parameter considered alone. Thus, as proposed in the PIRO (Predisposition, Infection, Response, Organ dysfunction) score, this highlights the interest of combining clinical parameters and biomarkers of host response in a

single score to improve patient characterization and thus their stratification [29].

Furthermore, as opposed to other parameters such as mHLA-DR, sCD127 concentration may appear easy to measure in plasma on routine automated tests which are available in emergency laboratories. In fact, ELISA techniques are commonly used for many biological parameters in routine practice and sCD127 measurement may be easily automated.

Thus our results suggest that this parameter may be used for identification of a group of patients with a high risk of death after septic shock. Such stratification strategy is now highly recommended in the design of future clinical trials testing immunoadjuvant therapies in sepsis. Interestingly, one such immunostimulating drug proposed for the treatment of septic shock patients is recombinant human interleukin-7 (rhIL-7) whose receptor partly comprises CD127. Indeed, since T lymphocyte anergy has been shown to be a hallmark of sepsis-induced immune dysfunctions, rhIL-7 has been proposed as a putative therapeutic strategy in sepsis. IL-7 is a pluripotent cytokine and plays a fundamental role in T cell development, peripheral T cell homeostasis, and immune tolerance. Importantly, IL-7 is currently undergoing numerous clinical trials, including in patients with cancer or human immunodeficiency virus 1 (HIV-1), and could represent an innovative therapy in the treatment of sepsis [15]. Indeed, rhIL-7 treatment has been shown to act at multiple levels to improve host immunity during sepsis in different studies in mice such as prevention of T cell apoptosis and improvements in T cell trafficking and functionality after bacterial or fungal sepsis. Beneficial effects on mortality and sepsis-induced immune dysfunctions have been described with rhIL-7 treatment [11–14]. We recently evaluated the interest of ex vivo rhIL-7 administration in septic shock patients. We showed that the IL-7 pathway was not significantly altered and was still functional in septic shock patients. Moreover, in this study, ex vivo rhIL-7 treatment significantly restored sepsis-induced lymphocyte functions to a normal response [16]. Although we did not investigate the correlation between high levels of sCD127 and the response following ex vivo rhIL-7 administration, we believe that this is worth assessing in a further study.

Our study has some limitations. First, these results need to be confirmed in a larger ideally multicentric study including important cohorts of patients. Furthermore, other groups of septic patients should be included, as here we focused on a specific group of patients still alive after day 3. A prerequisite would be the optimization of sCD127 ELISA measurement so as to allow its standardization. In addition, as this study was exploratory and very preliminary, mechanisms responsible for plasmatic sCD127 increase after septic shock (altered clearance in the most severe patients, shedding from activated cells, etc.) as well as the link between plasmatic sCD127 level,

lymphopenia, and lymphocyte anergy and/or its restoration by rhIL-7 need to be evaluated in a dedicated study. Understanding how sCD127 measurement could direct rhIL-7 therapy would also deserve investigation in a dedicated study, especially regarding sCD127 measurement and lymphocyte alterations. Finally, healthy volunteers were not age-matched with septic shock patients. Nevertheless, as the main outcome was mortality among septic patients, we hypothesize that this did not interfere with the results.

To conclude, our results strongly support the hypothesis that sCD127 measurement could represent a new attractive biomarker for identification of a group of patients presenting with higher risk of mortality. Upon

association studies showing a link between sCD127 measurement and sepsis-induced immune/lymphocyte alterations and/or response to rhIL-7 treatment, we can imagine that in upcoming clinical trials evaluating new immunoadjuvant therapies in sepsis (especially aimed at rejuvenating the adaptive side of immunity), assessment of sCD127 might be of help for patient stratification.

Acknowledgments The authors would like to thank Anne Portier and Caroline Guignant from the Immunology Laboratory of Hôpital E. Herriot—Lyon for their help in performing pre-analytical handling of samples; Nathalie Panel and Marion Provent (Clinical Research Center, Lyon-Sud) for their work on patient inclusion and clinical data acquisition. This work was supported by funds from the Hospices Civils de Lyon to AL, GM, and FV.

References

- Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, Sevransky JE, Sprung CL, Douglas IS, Jaeschke R, Osborn TM, Nunnally ME, Townsend SR, Reinhart K, Kleinpell RM, Angus DC, Deutschman CS, Machado FR, Rubenfeld GD, Webb S, Beale RJ, Vincent JL, Moreno R (2013) Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. *Intensive Care Med* 39:165–228
- Levy MM, Artigas A, Phillips GS, Rhodes A, Beale R, Osborn T, Vincent JL, Townsend S, Lemeshow S, Dellinger RP (2012) 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
- Angus DC, van der Poll T (2013) Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 369:840–851
- Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D (2013) Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect Dis* 13:260–268
- Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D (2013) Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 13:862–874
- Guignant C, Venet F, Planel S, Demaret J, Gouel-Cheron A, Nougier C, Friggeri A, Allaouchiche B, Lepape A, Monneret G (2013) Increased MerTK expression in circulating innate immune cells of patients with septic shock. *Intensive Care Med* 39:1556–1564
- Grimaldi D, Louis S, Pene F, Sirgo G, Rousseau C, Claessens YE, Vimeux L, Cariou A, Mira JP, Hosmalin A, Chiche JD (2011) Profound and persistent decrease of circulating dendritic cells is associated with ICU-acquired infection in patients with septic shock. *Intensive Care Med* 37:1438–1446
- Venet F, Lukaszewicz AC, Payen D, Hotchkiss R, Monneret G (2013) Monitoring the immune response in sepsis: a rational approach to administration of immunoadjuvant therapies. *Curr Opin Immunol* 25:477–483
- Hotchkiss RS, Opal S (2010) Immunotherapy for sepsis—a new approach against an ancient foe. *N Engl J Med* 363:87–89
- Hotchkiss RS, Coopersmith CM, McDunn JE, Ferguson TA (2009) The sepsis seesaw: tilting toward immunosuppression. *Nat Med* 15:496–497
- Unsinger J, Burnham CA, McDonough J, Morre M, Prakash PS, Caldwell CC, Dunne WM Jr, Hotchkiss RS (2012) Interleukin-7 ameliorates immune dysfunction and improves survival in a 2-hit model of fungal sepsis. *J Infect Dis* 206:606–616
- Unsinger J, Kazama H, McDonough JS, Griffith TS, Hotchkiss RS, Ferguson TA (2010) Sepsis-induced apoptosis leads to active suppression of delayed-type hypersensitivity by CD8+ regulatory T cells through a TRAIL-dependent mechanism. *J Immunol* 184:6766–6772
- Unsinger J, Kazama H, McDonough JS, Hotchkiss RS, Ferguson TA (2009) Differential lymphopenia-induced homeostatic proliferation for CD4+ and CD8+ T cells following septic injury. *J Leukoc Biol* 85:382–390
- Kasten KR, Prakash PS, Unsinger J, Goetzman HS, England LG, Cave CM, Seitz AP, Mazuski CN, Zhou TT, Morre M, Hotchkiss RS, Hildeman DA, Caldwell CC (2010) Interleukin-7 (IL-7) treatment accelerates neutrophil recruitment through gamma delta T-cell IL-17 production in a murine model of sepsis. *Infect Immun* 78:4714–4722
- Mackall CL, Fry TJ, Gress RE (2011) Harnessing the biology of IL-7 for therapeutic application. *Nat Rev Immunol* 11:330–342
- Venet F, Foray AP, Villars-Mechin A, Malcus C, Poitevin-Later F, Lepape A, Monneret G (2012) IL-7 restores lymphocyte functions in septic patients. *J Immunol* 189:5073–5081
- Badot V, Luijten RK, van Roon JA, Depresseux G, Aydin S, Van den Eynde BJ, Houssiau FA, Lauwerys BR (2013) Serum soluble interleukin 7 receptor is strongly associated with lupus nephritis in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 72:453–456
- Monti P, Brigatti C, Krasmann M, Ziegler AG, Bonifacio E (2013) Concentration and activity of the soluble form of the Interleukin-7 receptor alpha in type 1 diabetes identifies an interplay between hyperglycemia and immune function. *Diabetes* 62:2500–2508
- Lundstrom W, Highfill S, Walsh ST, Beq S, Morse E, Kockum I, Alfredsson L, Olsson T, Hillert J, Mackall CL (2013) Soluble IL7Ralpha potentiates IL-7 bioactivity and promotes autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:E1761–E1770

-
20. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ (1992) Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 101:1644–1655
 21. Monneret G, Venet F, Pachot A, Lepape A (2008) Monitoring immune dysfunctions in the septic patient: a new skin for the old ceremony. *Mol Med* 14:64–78
 22. Meisel C, Schefold JC, Pschowski R, Baumann T, Hetzger K, Gregor J, Weber-Carstens S, Hasper D, Keh D, Zuckermann H, Reinke P, Volk HD (2009) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to reverse sepsis-associated immunosuppression: a double-blind, randomized, placebo-controlled multicenter trial. *Am J Respir Crit Care Med* 180:640–648
 23. Pleiman CM, Gimpel SD, Park LS, Harada H, Taniguchi T, Ziegler SF (1991) Organization of the murine and human interleukin-7 receptor genes: two mRNAs generated by differential splicing and presence of a type I-interferon-inducible promoter. *Mol Cell Biol* 11:3052–3059
 24. Crawley AM, Angel JB (2012) The influence of HIV on CD127 expression and its potential implications for IL-7 therapy. *Semin Immunol* 24:231–240
 25. Crawley AM, Faucher S, Angel JB (2010) Soluble IL-7R alpha (sCD127) inhibits IL-7 activity and is increased in HIV infection. *J Immunol* 184:4679–4687
 26. McKay FC, Swain LI, Schibeci SD, Rubio JP, Kilpatrick TJ, Heard RN, Stewart GJ, Booth DR (2008) Haplotypes of the interleukin 7 receptor alpha gene are correlated with altered expression in whole blood cells in multiple sclerosis. *Genes Immun* 9:1–6
 27. Korte A, Kochling J, Badiali L, Eckert C, Andrae J, Geilen W, Kebelmann-Betzing C, Taube T, Wu S, Henze G, Seeger K (2000) Expression analysis and characterization of alternatively spliced transcripts of human IL-7Ralpha chain encoding two truncated receptor proteins in relapsed childhood all. *Cytokine* 12:1597–1608
 28. Gouel-Cheron A, Allaouchiche B, Guignant C, Davin F, Floccard B, Monneret G (2012) 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
 29. Rubulotta F, Marshall JC, Ramsay G, Nelson D, Levy M, Williams M (2009) Predisposition, insult/infection, response, and organ dysfunction: a new model for staging severe sepsis. *Crit Care Med* 37:1329–1335

ANNEXE II

Altérations phénotypiques et fonctionnelles des polynucléaires neutrophiles au cours des états septiques sévères

Julie Demaret^{a,b}, Guillaume Monneret^{a,b}, Fabienne Venet^{a,b,*}

RÉSUMÉ

Les syndromes septiques représentent un problème majeur de santé publique du fait de leur incidence en constante augmentation et du taux élevé de décès associé. La forme la plus grave est le choc septique dont la mortalité approche encore les 40 %. La réponse immunitaire au cours du choc septique associe une importante réponse inflammatoire initiale responsable de l'état de choc et le développement secondaire d'altérations du système immunitaire.

Les polynucléaires neutrophiles (PNN), sentinelles de l'immunité grâce à leur rôle de phagocytose et leur potentiel antimicrobien, possèdent également un rôle central dans la réponse immunitaire du fait d'interactions constantes avec les cellules dendritiques, macrophages et lymphocytes *via* des cytokines. En conséquence, il n'est pas étonnant que les PNN participent à la physiopathologie des états septiques sévères.

Au cours de la phase pro-inflammatoire, on observe une augmentation du nombre de PNN, dont une proportion importante de cellules immatures circulantes d'origine médullaire, ainsi qu'une diminution de leur apoptose. Leurs réponses fonctionnelles telles que le métabolisme oxydatif et la phagocytose sont augmentées alors que leurs propriétés de chimiotactisme sont fortement inhibées. Ceci serait à l'origine d'effets délétères sur certains organes, notamment le poumon. Ainsi, la production sur les sites distants de l'infection par les PNN d'espèces réactives de l'oxygène et de cytokines pro-inflammatoires jouerait un rôle majeur dans le développement de défaillances d'organes chez les patients septiques.

Enfin, des données récentes de la littérature décrivent également un nouveau rôle immunosuppresseur pour les PNN suggérant non seulement un nouvel aspect de l'implication de ces cellules dans la réponse immunitaire mais également dans la physiopathologie du choc septique.

Polynucléaires neutrophiles – sepsis – immunodépression.

1. Généralités

1.1. Les syndromes septiques

Les syndromes septiques sont classiquement définis comme l'ensemble des manifestations immuno-inflammatoires

a Laboratoire d'immunologie

Hôpital Edouard-Herriot – Hospices civils de Lyon
Pavillon E – 5, place d'Arsonval
69437 Lyon cedex 03

b Hospices civils de Lyon – Université Claude-Bernard Lyon I
EAM 4174 – Lyon

* Correspondance

fabienne.venet@chu-lyon.fr

article reçu le 25 octobre 2013, accepté le 26 novembre 2013.

© 2014 – Elsevier Masson SAS – Tous droits réservés.

SUMMARY

Phenotypic and functional study of neutrophils during severe septic syndromes

Septic syndromes still represent a major public health challenge as they are the leading cause of death in intensive care units. In particular, septic shock (most severe form of septic syndromes) is associated with a high mortality approaching 40%. Immune response after septic shock associates a major inflammatory response leading to organ dysfunction and shock and the secondary development of immune dysfunctions affecting both innate and adaptive immune responses. Neutrophils are crucial components of the innate immune response and the first line of defense against infection. They also play a central role in initiation of adaptive immune responses by secreting cytokines. It is not surprising that neutrophils participate in the pathophysiology of severe septic syndromes.

During sepsis pro-inflammatory phase, recruitment of neutrophils from bone marrow is augmented and is illustrated by the increased proportion of immature PNN in circulating blood. This is also associated with a reduction in their apoptosis. Moreover, neutrophil oxidative burst and phagocytosis were found to be increased in patients whereas chemotaxis is strongly inhibited. This overwhelming activation of neutrophils and reduced motility is thought to participate in the development of organ damage after sepsis, notably because of the massive production by neutrophils of reactive oxygen species and pro-inflammatory cytokines at sites distant of the initial infection.

Interestingly, a novel aspect of neutrophils' function in immune response has recently been reported. Indeed, immunosuppressive properties have been described for PNN subsets both in murine models and in clinic. This adds a new complexity about their involvement in immune response let alone in septic shock pathophysiology.

Neutrophils – sepsis – immunosuppression.

induites par un processus infectieux. Il existe différents stades de gravité croissante: sepsis, sepsis sévère et choc septique. Le sepsis est un véritable problème de santé publique, il est responsable de 10 à 30 % des entrées en service de réanimation et son incidence est en constante augmentation. Malgré des progrès dans

Abréviations

CMV: cytomégalo virus

FcγR: récepteur au fragment constant des immunoglobulines G (IgG)

fMLP: formyl-méthionyl-leucyl-phenylalanine

GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

IFN-γ: interféron gamma

LPS: lipopolysaccharide

MDSC: cellules myéloïdes suppressives

NETs: neutrophil extracellular traps

NF-κB: nuclear factor kappa B

PAMPs: pathogen-associated molecular patterns

PMA: phorbol myristate acetate

PNN: polynucléaires neutrophiles

rhDNase: DNases recombinantes humaines

sTREM-1: soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1

TLR: toll like receptor

sa prise en charge, il représente la première cause de décès en service de réanimation avec un taux de mortalité variant de 45 à 63 % [1]. Une étude épidémiologique récente réalisée sur une cohorte française a permis de mettre en évidence une incidence de 13,7 % et un taux de mortalité de 42 % pour le choc septique [2]. Une autre étude incluant plus de 25 000 patients hospitalisés aux États-Unis et en Europe a montré un taux de mortalité dû au sepsis sévère et au choc septique toujours supérieur à 30 % [3].

Le point de départ de l'état septique est la colonisation locale de l'organisme par un microorganisme pathogène, induisant une réaction inflammatoire locale. Sur le site de l'infection, les macrophages résidents et cellules dendritiques détectent la présence du pathogène par l'intermédiaire des toll like récepteurs (TLR) qui reconnaissent des motifs présents sur la grande majorité des bactéries, virus ou champignons regroupés sous le terme de pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). L'activation par les TLR initie une cascade de réactions aboutissant à la translocation du nuclear factor kappa B (NF-κB) entraînant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires dont l'IL-1β, l'IL-6 et le TNF-α. D'autres composants de l'immunité innée se mettent simultanément en place tels que les polynucléaires neutrophiles ou le système du complément. Chez certains patients, le sepsis se développe lorsque la réponse anti-infectieuse initiale normale chez l'hôte est amplifiée et dérégulée. Les mécanismes indispensables au niveau local pour combattre une infection deviennent alors délétères lorsqu'ils se propagent au niveau de l'organisme. Cette amplification de la réponse immunitaire au niveau systémique provoque des dommages cellulaires et des dysfonctions d'organes conduisant au sepsis sévère et pouvant s'aggraver en choc septique voire même conduire au décès précoce des patients par défaillance multiviscérale [4].

Chez les patients qui survivent cette phase pro-inflammatoire initiale, une réponse anti-inflammatoire compensatrice se met en place [4] qui peut induire un état de dépression immunitaire affectant les versants innés et acquis de la réponse immunitaire. En effet, cette immunosuppression post-septique est illustrée par des données récentes de la littérature montrant, chez les patients survivants au 3^e jour du choc septique, une non éradication du pathogène initial, une susceptibilité accrue au développement d'infections nosocomiales secondaires (*P. aeruginosa*, *C. albicans*), ou à des réactivations virales (CMV, Herpes virus) généralement observées chez les patients immunodéprimés [5, 6].

1.2. Physiologie des polynucléaires neutrophiles

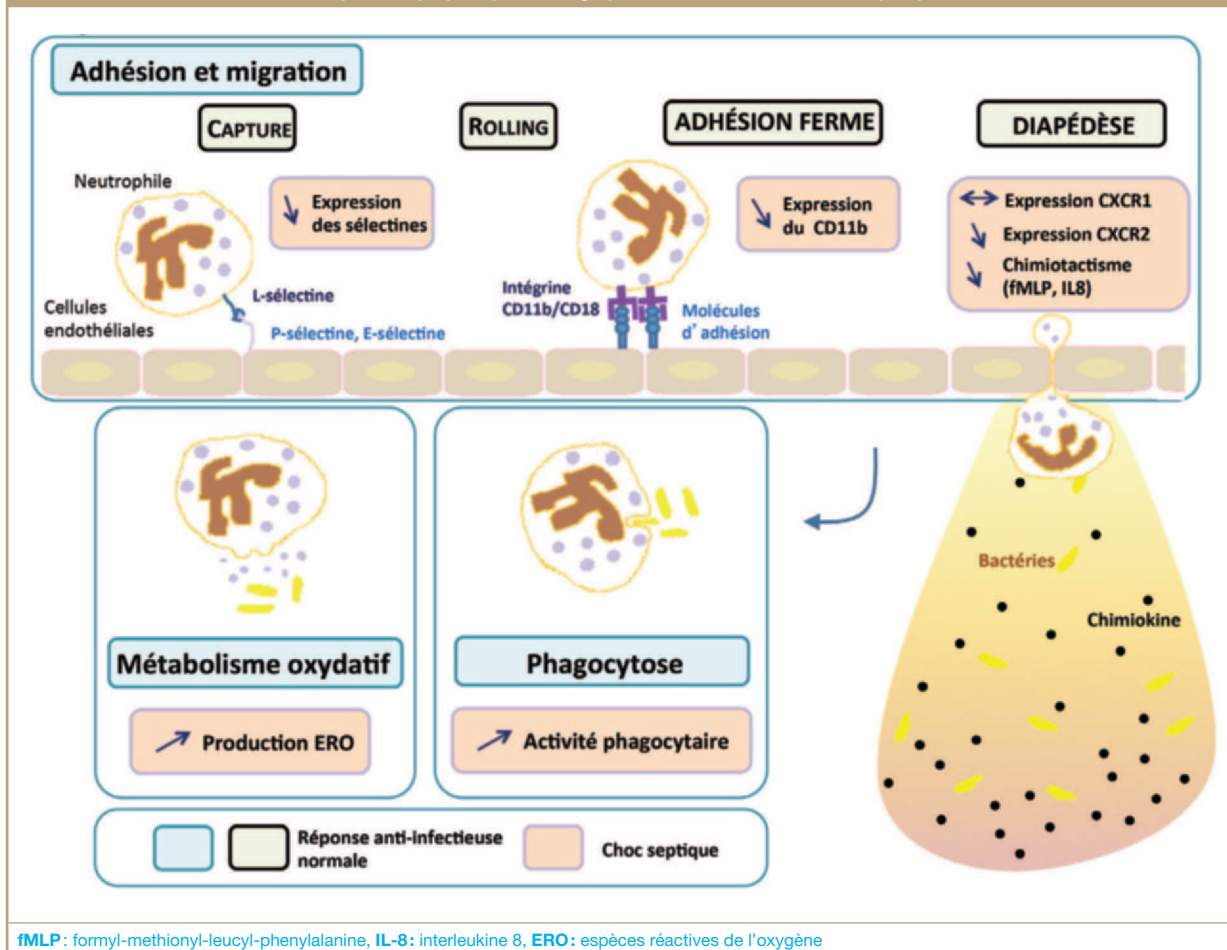
Les polynucléaires neutrophiles (PNN) représentent 60 à 75 % des globules blancs totaux. Ils ont été décrits pour la première fois par Paul Ehrlich à la fin du XIX^e siècle. Ces cellules sont caractérisées par un noyau plurilobé, la présence de nombreux granules cytoplasmiques et une affinité pour les colorants neutres. Ils sont sécrétés par la moelle osseuse et ont une durée de vie dans le sang de quelques heures.

Les PNN sont indispensables à la défense contre les micro-organismes. Grâce à leur rôle de sentinelle, ils constituent la première ligne d'action du système immunitaire inné. En effet, les patients souffrant de déficits immunitaires quantitatifs ou qualitatifs des neutrophiles (neutropénie congénitale, granulomatose septique chronique, déficit d'adhésion leucocytaire) sont souvent sujets à des infections sévères voire mortelles [7].

Si les micro-organismes parviennent à passer les barrières physiques telles que la peau ou les muqueuses, ils accèdent aux tissus et activent les cellules endothéliales qui vont alors attirer les neutrophiles circulants. La migration des PNN vers le site de l'infection est une étape importante dans le contrôle de l'infection.

En conditions normales, les neutrophiles s'attachent faiblement aux cellules endothéliales grâce à l'expression constitutive de molécules de faible affinité, les sélectines (L-sélectine, CD62L – **figure 1**). Leur interaction leur permet ainsi de « rouler » sur la paroi des vaisseaux, emportés par le flux sanguin. Lors d'un contact avec un composant bactérien, une cytokine inflammatoire ou une chimiokine, les PNN expriment à leur surface des intégrines (CD11b/CD18) qui, grâce à leur haute affinité pour les molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1), permettent une adhésion ferme à la paroi du vaisseau sanguin. Grâce à cette interaction, les PNN se fixent à la paroi du vaisseau sanguin et traversent ensuite la couche de cellules endothéliales via les jonctions serrées, guidés par un gradient de chimioattractant (IL-8, fMLP, C5a – **figure 1**). En effet, les chimiokines ont un rôle important dans le recrutement et l'activation des PNN. L'interleukine-8 est un acteur essentiel pour la migration des neutrophiles dans de nombreux contextes inflammatoires chez l'homme et l'animal [7]. La réponse à l'IL-8 est médiée par l'interaction avec deux récepteurs de haute affinité: CXCR1 et CXCR2. Ces récepteurs ont différents ligands avec des affinités variables; alors qu'ils interagissent avec l'IL-8 avec une affinité équivalente, CXCR2 fixe également d'autres chimiokines telles que GRO-α (CXCL1), GRO-β (CXCL2) et GRO-γ (CXCL3).

Figure 1 – Rôle physiologique des polynucléaires neutrophiles dans la réponse anti-infectieuse et réponse physiopathologique au cours du choc septique.



fMLP : formyl-méthionyl-leucyl-phenylalanine, IL-8 : interleukine 8, ERO : espèces réactives de l'oxygène

Une fois que les PNN ont reconnu leur cible, ils émettent des pseudopodes pour englober la bactérie dans une vacuole de phagocytose. Différents mécanismes tels que la dégranulation, la libération d'enzymes et de protéines à activité bactéricide comme la myéloperoxydase ou la lactoferrine, ou l'activation de la NADPH oxydase, sont alors mis en œuvre au niveau du phagolysosome pour détruire la bactérie [8] (*figure 1*).

Lors de leur stimulation, les neutrophiles peuvent être également soumis au phénomène de NETose, une forme active de mort cellulaire qui conduit à la libération de chromatine décondensée dans le milieu extracellulaire. Ces structures fibreuses, appelées neutrophil extracellular traps (NETs) contiennent aussi bien des histones que des protéines cytoplasmiques. La nature des mécanismes mis en jeu dans leur formation n'est pas encore bien définie. Les NETs sont capables de piéger différents pathogènes extracellulaires grâce à de puissantes propriétés antimicrobiennes et immunomodulatrices [9].

En étant l'une des premières cellules présentes sur le site de l'infection, les neutrophiles possèdent un rôle central dans l'immunité. Ils sécrètent des cytokines et chimiokines nécessaires à l'initiation de la réponse immunitaire adaptative. Les PNN sont notamment impliqués dans le recrutement et l'activation des cellules dendritiques et

interagissent avec les lymphocytes [7]. Comparés à d'autres types cellulaires tels que les macrophages, les neutrophiles produisent de plus faibles quantités de cytokines mais grâce à un recrutement abondant au niveau du site inflammatoire, leur contribution au pool total de cytokines est conséquente.

En l'absence d'inflammation, les PNN circulent pendant une courte période (durée de vie de quelques heures) avant de devenir sénescents et d'être éliminés par le foie, la rate ou la moelle osseuse grâce à des mécanismes apoptotiques. Ce processus de mort cellulaire programmée est essentiel dans la régulation de l'homéostasie des neutrophiles. Dès qu'ils arrivent au niveau du site de l'infection, leur durée de vie est prolongée par la présence de médiateurs inflammatoires, comme le GM-CSF, ou de chimiokines (IL-8, GRO- α). Bien que les neutrophiles jouent un rôle majeur dans l'élimination des pathogènes, ils peuvent également se montrer potentiellement délétères pour les cellules environnantes s'ils sont continuellement stimulés. Leur survie peut être à l'origine du développement de défaillances d'organes en produisant à l'excès les médiateurs pro-inflammatoires et ainsi, nuire à l'hôte. Il est donc important que les PNN soient efficacement éliminés en même temps que les micro-organismes nocifs à l'origine de leur activation [10].

Des données récentes de la littérature décrivent un nouveau rôle pour les neutrophiles. En effet, Pillay et al. rapportent l'apparition d'une sous population de PNN avec des propriétés immunosuppressives sur la prolifération des lymphocytes T grâce à la libération locale de peroxyde d'hydrogène au sein d'une synapse immunologique [11]. Une autre équipe a également mis en évidence la capacité des neutrophiles à dégrader des cytokines par la production d'une élastase et ainsi affaiblir la réponse pro-inflammatoire [12].

Ces nouveaux travaux apportent une nouvelle complexité sur l'implication des PNN dans la réponse immunitaire.

2. Rôle des polynucléaires neutrophiles dans la physiopathologie des syndromes septiques

De par leur rôle central comme première ligne de défense anti-infectieuse, un certain nombre d'études s'est intéressé au rôle des PNN dans la physiopathologie du choc septique.

2.1. Phase pro-inflammatoire

En particulier, de nombreuses modifications phénotypiques et fonctionnelles des PNN ont essentiellement été rapportées pendant la phase précoce des états septiques sévères. Nous allons détailler ces altérations fonctionnelles par fonction (*figure 1*).

2.1.1. Phénotypage

Les polynucléaires neutrophiles expriment à leur surface un récepteur au fragment constant des immunoglobulines G (FcγRI et IgG), CD64, uniquement lorsqu'ils sont activés. Ainsi, c'est en 1995 que la mesure en cytométrie en flux de l'expression de CD64 à la surface des PNN a été proposée comme marqueur diagnostique d'infection et de sepsis. Grâce à une sensibilité et une spécificité élevées, il a été évalué dans de nombreuses études en tant que biomarqueur, ou composant de combinaisons de biomarqueurs, dans les infections chez l'adulte et l'enfant [13]. À titre d'exemple, dans une étude publiée par Muller Kobold et al., une importante augmentation d'expression du CD64 a été rapportée chez des patients adultes en choc septique comparés à des volontaires sains [14]. Des résultats similaires ont été retrouvés chez les enfants et nouveaux nés. De plus, l'association de niveaux d'expressions élevés de CD64 à d'autres biomarqueurs pourrait ajouter une valeur diagnostique intéressante comme suggéré par Gibot et al. avec la combinaison CD64 – procalcitonine et sTREM-1 (soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1) dans le diagnostic du sepsis [15].

2.1.2. Myélémie

Le sepsis sévère ou toute autre réponse inflammatoire systémique s'accompagne d'une augmentation de la production de PNN au sein de la moelle osseuse, parfois décuplée, et le recrutement dans la circulation sanguine de neutrophiles immatures [16]. Ainsi, la présence de PNN immatures dans le sang périphérique traduisant une

activité de la moelle osseuse augmentée a été évaluée dans plusieurs études comme marqueur diagnostique dans le sepsis. Notamment, Nierhaus et al. ont souligné la supériorité du pouvoir discriminant du compte de PNN immatures pour différencier les patients infectés des non infectés par rapport à des marqueurs fréquemment utilisés tels que la protéine C réactive ou l'interleukine-6, et en particulier pendant les premières heures critiques [17]. Cependant, la capacité des PNN immatures à participer efficacement à la défense immunitaire contre les pathogènes, reste à définir. Drifte et al. ont étudié les fonctions immunitaires des neutrophiles matures et immatures en se basant sur le phénotypage de CD16 (expression du récepteur FcγRIII) chez des patients en sepsis ou présentant une réponse systémique inflammatoire et des volontaires sains [18]. Ils ont montré que les PNN circulants des patients étaient dans l'ensemble moins matures que ceux des contrôles et que ces PNN immatures étaient globalement moins efficaces (chimiotactisme, bactéricidie, phagocytose diminuées) comparés aux PNN matures. Il reste encore à déterminer si l'immaturité des neutrophiles lors du sepsis a une incidence clinique importante sur les défenses immunitaires des patients.

2.1.3. Apoptose

L'apoptose est impliquée dans l'élimination des cellules sénescentes et est nécessaire à la résolution de l'inflammation. En plus du phénomène de myélémie, l'absence de régulation de ce processus de mort programmée participe à la physiopathologie du sepsis. En effet, la survie prolongée des neutrophiles permet une réponse inflammatoire robuste et protège donc l'hôte d'une manière plus efficace. Cependant, elle est également à l'origine de développement de défaillances d'organes et augmente le risque de mortalité suite à la production continue de radicaux libres. Beaucoup se sont intéressés à cette thématique à travers différentes techniques (annexin V, iodure de propidium, TUNEL). Par exemple, dans une étude portant sur une cohorte de patients avec des degrés de sepsis différents et comparés à des volontaires sains, Fialkow et al. ont démontré que l'apoptose des neutrophiles est inversement proportionnelle à la sévérité [19]. De plus, d'après Tamayo et al., dans un groupe de patients en choc septique plus important, l'apoptose est toujours diminuée chez les patients. En revanche, cette diminution n'est pas statistiquement différente chez les non-survivants [20].

2.1.4. Adhésion et migration

En conditions normales, la L-sélectine est présente à la surface des neutrophiles. Si les PNN entrent en contact avec un produit pro-inflammatoire ou infectieux (LPS, fMLP), ils s'activent et expriment à leur surface des molécules d'adhésion de forte affinité : les intégrines (CD11b/CD18). Ils se fixent alors aux molécules d'adhésion (I-CAM, V-CAM) et traversent la couche de cellules endothéliales guidés par un gradient de chemoattractants (IL-8) qui se fixent sur les récepteurs correspondants (CXCR1 et CXCR2) [7] (*figure 1*). De nombreux auteurs tels que Chishti et al. mettent en évidence dans une cohorte de patients en choc septique, une augmentation de l'expression du CD11b [21]. Une autre étude de Muller Kobold et al.

sur des patients en sepsis soulignent un lien entre l'expression augmentée du CD11b et la mortalité avec une expression plus importante chez les survivants [14]. Néanmoins, d'autres auteurs ne retrouvent pas ces modifications d'expressions comme Martins et al. qui, dans leur cohorte de patients en sepsis, sepsis sévère et choc septique, ne rapportent pas de différence d'expression pour le CD11b et le CD11c par rapport aux volontaires sains [22]. Concernant l'expression des récepteurs aux chimiokines, Chishti et al. ont montré une diminution de l'expression de CXCR2 jusqu'à 5 jours après le début du choc par rapport à une cohorte de volontaires sains, alors que l'expression de CXCR1 reste inchangée [21]. Enfin, dans une étude de Tavares-Murta et al. sur des patients septiques, une suppression de la réponse aux stimuli de fMLP est notée et est d'autant plus importante chez les non-survivants [23]. Au total, il semble que la capacité d'activation et de migration des PNN soit altérée dans la phase précoce du choc septique.

2.1.5. Phagocytose

Une fois activés par des produits bactériens ou des médiateurs endogènes, les neutrophiles traversent les cellules endothéliales pour phagocyter et détruire les pathogènes (figure 1). Les études évaluant la phagocytose des PNN après un choc septique montrent des résultats divergents. Certaines études observent une phagocytose augmentée des PNN chez les patients en sepsis ou en choc septique lors de la phase précoce [24] en accord avec une augmentation de l'activité des PNN au début du choc. Cependant, d'autres auteurs mettent en évidence plutôt une diminution [25] voire aucune altération de la phagocytose. Ces résultats contradictoires pourraient être liés au degré de maturité des PNN au moment de la mesure de cette phagocytose. Par exemple, Taneja et al. soulignent une phagocytose inchangée chez des patients en sepsis sévère mais décrivent une différence dans l'activité phagocytaire des neutrophiles en fonction de leur maturité ; les PNN immatures des patients auraient une phagocytose diminuée comparée aux PNN matures. Ainsi, la phagocytose plus importante des neutrophiles matures serait contrebalancée par l'activité phagocytaire moindre des PNN immatures [26].

2.1.6. Métabolisme oxydatif

Le métabolisme oxydatif représente l'un des mécanismes de défense les plus importants pour contrôler une infection bactérienne [8]. Nous pouvons supposer que l'augmentation du métabolisme oxydatif est bénéfique au début du choc pour contenir le pathogène, mais la persistance de cette activité élevée peut s'avérer délétère pour l'organisme. Plusieurs études montrent une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène chez des patients en sepsis, sepsis sévère et choc septique sur des prélèvements précoces. Par exemple, dans une cohorte de patients septiques, Martins et al. soulignent une augmentation du métabolisme oxydatif en réponse à différents stimuli (LPS, PMA, fMLP, *S. aureus*) [22]. En lien avec la diminution de leur motilité, cet état d'activation augmentée des PNN pourrait participer au développement de dysfonctions d'organes chez les patients en choc septique

puisque les PNN piégés dans les veinules post-capillaires des organes tels que le poumon ou le rein libéreraient leurs granules au niveau de ces sites distants de l'infection initiale et induiraient des dommages tissulaires.

2.1.7. NETs (neutrophil extracellular traps)

Outre la capacité d'élimination des pathogènes grâce à la phagocytose et au métabolisme oxydatif, l'activation des PNN génère la formation de NETs [27]. Alors que la formation de NETs a été détectée lors d'infections et de sepsis, leur rôle *in vivo* n'est pas clairement défini. Il s'agit d'une arme à double tranchant. En effet, le confinement des pathogènes au niveau d'un site d'infection localisé est une fonction importante des NETs mais il peut aussi être délétère pour l'hôte. Les NETs réduisent l'infection localement et limitent la dispersion du pathogène dans l'organisme mais libèrent ainsi une concentration locale importante de composants antimicrobiens comme les protéases dans les tissus adjacents, qui peut être à l'origine de dommages tissulaires et de dysfonctions d'organes [9]. Dans le but d'évaluer l'implication des NETs dans la physiopathologie du sepsis, plusieurs équipes utilisent des DNases recombinantes humaines (rhDNase) qui catalysent l'hydrolyse de l'ADN extracellulaire dans des modèles murins. À titre d'exemple, Meng et al. rapportent que la déplétion des NETs par l'administration de rhDNase aggrave la pathologie qui suit un sepsis polymicrobien *in vivo* et qu'ainsi, induire la formation des NETs serait préférable à favoriser leur destruction dans une potentielle approche thérapeutique chez l'homme [28].

2.1.8. Conclusion

Lors du sepsis, le nombre de neutrophiles circulants est augmenté avec une proportion importante de PNN immatures au niveau du sang circulant et leur survie est allongée. De plus, les réponses fonctionnelles telles que la phagocytose et le métabolisme oxydatif sont renforcées alors que le chimiotactisme est inhibé. En effet, il y a un défaut dans le recrutement des PNN caractérisé par une incapacité des neutrophiles à migrer vers le site de l'infection combiné à une séquestration inappropriée de ces cellules dans les organes tels que les poumons, le cœur, le foie ou les reins. L'hyperactivation de ces PNN, ainsi qu'une augmentation de leur capacité à produire des espèces réactives de l'oxygène et de leur fonction phagocytaire vont créer un environnement nocif pour les organes voisins. Cette accumulation de neutrophiles dans les tissus participe alors aux dysfonctions d'organes observées dans la physiopathologie des états septiques sévères [29].

2.2. Neutrophiles et immunosuppression post septique

Peu d'études ont été réalisées jusqu'ici sur les altérations phénotypiques et fonctionnelles des neutrophiles au cours de la phase d'immunosuppression post-septique. Néanmoins, alors que le rôle des PNN semblait limité à leur fonction de sentinelle et de coordinateur de la réponse anti-infectieuse, un nouvel aspect d'immunosuppression a été récemment décrit dans la littérature. En effet, Gresnigt et al. ont souligné la capacité des neutrophiles à dégrader des cytokines par la production d'une

elastase et ainsi affaiblir la réponse pro-inflammatoire [12]. De plus, Pillay et al. ont mis en évidence une sous population de neutrophiles présentant des propriétés immunosuppressives et un phénotype distinct dans un modèle d'endotoxémie humaine [11]. Trois heures après l'injection de LPS par voie intraveineuse chez des volontaires sains, plusieurs sous populations de PNN sont apparues distinctement et notamment des neutrophiles présentant un phénotype CD16⁺CD62L⁻ capables d'inhiber la prolifération des lymphocytes T. Ceci grâce à la formation d'une synapse immunologique entre le neutrophile et le lymphocyte par l'intermédiaire de Mac-1 (CD11b/CD18) et à la libération de petites quantités de peroxyde d'hydrogène au niveau local. Cette sous population est confrontée morphologiquement et phénotypiquement à une sous population de PNN immatures CD16⁺CD62L⁻ qui ne présente pas les mêmes fonctions immunosuppressives. Ces différentes sous populations sont également retrouvées dans une petite cohorte de patients polytraumatisés graves. De plus, dans une étude ultérieure réalisée par la même équipe, la sous population CD16⁺CD62L⁻ présentait des propriétés d'adhésion altérées, facilitant la migration de ces cellules aux autres localisations tissulaires plutôt qu'au niveau du site de l'inflammation [30]. Cette même équipe a ensuite montré que l'administration de GM-CSF et d'IFN- γ induit un changement dans la composition des neutrophiles en faveur d'un profil anti-inflammatoire en augmentant la proportion de PNN CD16⁺CD62L⁻ avec une diminution du nombre total de neutrophiles [31].

Pillay et al. assimilent le rôle de la sous population immunosuppressive CD16⁺CD62L⁻ aux cellules myéloïdes suppressives (MDSC). Les MDSC ont été caractérisées pour la première fois dans des modèles murins tumoraux et chez des patients atteints de cancer. Cette population hétérogène de cellules myéloïdes immatures présente une activité suppressive *via* un contact cellulaire proche et des études récentes s'interrogent sur leur potentielle implication dans l'immunosuppression post-septique, notamment dans la réponse inadaptée des lymphocytes T,

observée chez les patients atteints de choc septique [32, 33]. Ces cellules, impliquées dans la physiopathologie du cancer, pourraient donc participer à celle du choc septique. Néanmoins, beaucoup d'éléments restent encore à définir concernant les MDSC, notamment leur phénotypage chez l'homme, leurs mécanismes d'action et les stimuli aboutissant à leur expansion et activation en conditions pathologiques.

3. Perspectives – Conclusion

Les polynucléaires neutrophiles sont considérés comme les sentinelles de l'immunité grâce à leur rôle de cellules phagocytaires et leur potentiel antimicrobien. Ils ont également un rôle central dans l'immunité en échangeant constamment avec les cellules dendritiques, macrophages et lymphocytes au moyen des cytokines. Ils jouent donc un rôle central dans la physiopathologie des états septiques sévères. Les études évaluant le rôle des PNN chez des patients de réanimation rapportent un recrutement important de PNN immatures et des neutrophiles plutôt « hyperactivés » pendant la phase précoce pro-inflammatoire du choc et un rôle potentiel de ces cellules dans le développement de défaillances d'organes post-choc septique. Néanmoins, l'article de Pillay et al. apporte une nouvelle lumière sur la potentielle implication des PNN dans l'immunosuppression du choc septique [11]. Il serait ainsi intéressant d'étudier la fonctionnalité des neutrophiles chez des patients en choc septique pendant la phase immunosuppressive.

À travers l'étude des neutrophiles, ce sont les mécanismes de l'équilibre inflammation/immunosuppression du choc septique qui pourraient être mieux compris et ainsi offrir de nouvelles perspectives thérapeutiques dans un contexte clinique toujours caractérisé par une très lourde mortalité.

Déclaration d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Références

- [1] Annane D, Aegerter P, Jars-Guincestre MC, et al. Current epidemiology of septic shock: the CUB-Rea Network. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168(2):165-72.
- [2] Quenot JP, Binquet C, Kara F, et al. The epidemiology of septic shock in French intensive care units: the prospective multicenter cohort EPISS study. *Crit Care* 2013;17(2):R65.
- [3] Levy MM, Artigas A, Phillips GS, et al. Outcomes of the Surviving Sepsis Campaign in intensive care units in the USA and Europe: a prospective cohort study. *Lancet Infect Dis* 2012;12(12):919-24.
- [4] Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*. 2013;369(9):840-51.
- [5] Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect Dis* 2013;13(3):260-8.
- [6] Venet F, Lukaszewicz AC, Payen D, et al. Monitoring the immune response in sepsis: a rational approach to administration of immunoadjuvant therapies. *Curr Opin Immunol* 2013;25(4):477-83.
- [7] Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, et al. Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu Rev Immunol* 2012;30:459-89.
- [8] Segal AW. How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol* 2005;23:197-223.
- [9] Kaplan MJ, Radic M. Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. *J Immunol* 2012;189(6):2689-95.
- [10] Hofman P. Molecular regulation of neutrophil apoptosis and potential targets for therapeutic strategy against the inflammatory process. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2004;3(1):1-9.
- [11] Pillay J, Kamp VM, van Hoffen E, et al. A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *J Clin Invest* 2012;122(1):327-36.
- [12] Gresnigt MS, Joosten LA, Verschueren I, et al. Neutrophil-mediated inhibition of proinflammatory cytokine responses. *J Immunol*. 2012;189(10):4806-15.
- [13] Hoffmann JJ. Neutrophil CD64: a diagnostic marker for infection and sepsis. *Clin Chem Lab Med* 2009;47(8):903-16.
- [14] Muller Kobold AC, Tulleken JE, Zijlstra JG, et al. Leukocyte activation in sepsis; correlations with disease state and mortality. *Intensive Care Med* 2000;26(7):883-92.
- [15] Gibot S, Bene MC, Noel R, et al. Combination biomarkers to diagnose sepsis in the critically ill patient. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;186(1):65-71.
- [16] Bone RC, Sibbald WJ, Sprung CL. The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. *Chest* 1992;101(6):1481-3.

- [17] Nierhaus A, Klatte S, Linssen J, et al. Revisiting the white blood cell count: immature granulocytes count as a diagnostic marker to discriminate between SIRS and sepsis--a prospective, observational study. *BMC Immunol* 2013;14:8.
- [18] Drifte G, Dunn-Siegrist I, Tissieres P, et al. Innate immune functions of immature neutrophils in patients with sepsis and severe systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med* 2013;41(3):820-32.
- [19] Fialkow L, Fochesatto Filho L, Bozzetti MC, et al. Neutrophil apoptosis: a marker of disease severity in sepsis and sepsis-induced acute respiratory distress syndrome. *Crit Care* 2006;10(6):R155.
- [20] Tamayo E, Gomez E, Bustamante J, et al. Evolution of neutrophil apoptosis in septic shock survivors and nonsurvivors. *J Crit Care* 2011;27(4):415 e1-11.
- [21] Chishti AD, Shenton BK, Kirby JA, et al. Neutrophil chemotaxis and receptor expression in clinical septic shock. *Intensive Care Med* 2004;30(4):605-11.
- [22] Martins PS, Brunialti MK, Martos LS, et al. Expression of cell surface receptors and oxidative metabolism modulation in the clinical continuum of sepsis. *Crit Care* 2008;12(1):R25.
- [23] Tavares-Murta BM, Zaparoli M, Ferreira RB, et al. Failure of neutrophil chemotactic function in septic patients. *Crit Care Med* 2002;30(5):1056-61.
- [24] Martins PS, Kallas EG, Neto MC, et al. Upregulation of reactive oxygen species generation and phagocytosis, and increased apoptosis in human neutrophils during severe sepsis and septic shock. *Shock* 2003;20(3):208-12.
- [25] Stephan F, Yang K, Tankovic J, et al. Impairment of polymorphonuclear neutrophil functions precedes nosocomial infections in critically ill patients. *Crit Care Med* 2002;30(2):315-22.
- [26] Taneja R, Sharma AP, Hallett MB, et al. Immature circulating neutrophils in sepsis have impaired phagocytosis and calcium signaling. *Shock* 2008;30(6):618-22.
- [27] Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004;303(5663):1532-5.
- [28] Meng W, Paunel-Gorgulu A, Flohe S, et al. Depletion of neutrophil extracellular traps in vivo results in hypersusceptibility to polymicrobial sepsis in mice. *Crit Care* 2012;16(4):R137.
- [29] Brown KA, Brain SD, Pearson JD, et al. Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *Lancet* 2006;368(9530):157-69.
- [30] Kamp VM, Pillay J, Lammers JW, et al. Human suppressive neutrophils CD16bright/CD62Ldim exhibit decreased adhesion. *J Leukoc Biol* 2012;92(5):1011-20.
- [31] Kamp VM, Leentjens J, Pillay J, et al. Modulation of granulocyte kinetics by GM-CSF/IFN-gamma in a human LPS rechallenge model. *J Leukoc Biol* 2013;94(3):513-20.
- [32] Brudecki L, Ferguson DA, McCall CE, et al. Myeloid-derived suppressor cells evolve during sepsis and can enhance or attenuate the systemic inflammatory response. *Infect Immun* 2012;80(6):2026-34.
- [33] Derive M, Bouazza Y, Alauzet C, et al. Myeloid-derived suppressor cells control microbial sepsis. *Intensive Care Med* 2012;38(6):1040-9.

Intracellular Flow Cytometry Improvements in Clinical Studies

Julie Demaret, Morgane Gossez, Fabienne Venet, Guillaume Monneret

Abstract

Flow cytometry has become a basic of biological research and clinical diagnostics, and its application has been crucial to numerous advances in immunology and cell biology. However, several issues remain when considering intracellular stainings, especially in the context of a daily routine use and in multicenter clinical research protocols including large cohorts of patients. The requirements for multiple protocol steps are not only time-consuming but also frequently associated with high cell loss and non-specific binding or reduced fluorescence. These drawbacks make standardized intracellular flow cytometry use in multicenter studies struggling. As a consequence, intracellular flow cytometry has mostly remained a tool for experimental and clinical research. In the current chapter, we will complete flow cytometry protocols described in the previous edition by presenting novel intracellular protocols usable in clinic. These present with many advantages including shorter time-to-results, one-step whole blood procedures, lyse-no-wash-no-centrifuge protocols, improved staining quality, and lyophilized coated reagents in ready-to-use tubes. This opens novel perspectives for standardization and feasibility in clinical studies, for drug efficacy monitoring and for patients' stratification within a context of personalized medicine. Here, we will present illustrative examples taken from septic patients' immunomonitoring. We will consider the evaluation of myeloperoxidase and lactoferrin expressions in neutrophils, FOXP3 lymphocyte expression and STAT5 phosphorylation in lymphocyte subsets.

Key words: Intracellular flow cytometry, sepsis, neutrophil, myeloperoxidase, lactoferrin, FOXP3, regulatory T cells, STAT5

1.Introduction

1.1 Flow Cytometry for Clinics

Flow cytometry represents one inevitable method for cell study and identification through cell analyses and sorting according to their distinguishing characteristics. Such single cell technique has helped to reveal much about cells function and position in the immune system [1]. It has evolved over the past 50 years from a niche laboratory technique to a routine tool used by clinical pathologists and immunologists for diagnosis and monitoring of patients notably with cancer and immune deficiencies [2]. However, several issues exist when considering flow cytometric intracellular stainings (ICS), especially in the context of a daily routine use and in clinical research protocols including large cohorts of patients for whom samples need to be processed immediately [3]. More specifically, this technique is time-consuming due to permeabilisation and multiple washing steps. In addition, results are usually poorly reproducible and hardly standardisable. This rendered intracellular flow cytometry barely usable on a routine basis. Novel protocols have been recently developed to perform faster and more convenient ICS protocols in order to meet criteria of improved standardization. In particular, a promising domain of application for ICS is functional testing which remains, immunologically speaking, a gold standard approach.

Here we extend our previous report on standardized flow cytometry cell surface markers for critically ill patients monitoring (HLA-DR on circulating monocytes, percentage of CD4+CD25+ regulatory T cells and CD64 expression on neutrophils in ICU patients [4]). In the current chapter, we will describe novel ICS protocols (including functional testing) and will provide clinical examples in septic patients illustrating their potential as stratification tools in immunostimulating clinical trials.

1.2 Sepsis Pathophysiology

Septic syndromes are still associated with a high risk of death in ICU. Indeed, a recent epidemiological study including more than 25,000 patients in the USA and in Europe showed that overall hospital mortality from severe sepsis or septic shock is still over 30 % [5]. In particular, over the past 30 years, the prognosis for septic patients has improved substantially, due to advances in the supportive care delivered to critically ill patients. Immune response after septic shock associates a major inflammatory response leading to organ dysfunction and shock and the development of immune dysfunctions affecting both innate and adaptive immune responses. Sepsis directly or indirectly impairs the function of almost all types of immune cells. Importantly, the intensity and duration of sepsis-induced immune alterations have been associated with increased risk of deleterious events in patients [6, 7].

There is a recognized need for markers that can rapidly 1) identify the immunological status of the patient and 2) the immune response to therapy [8]. As an example, many studies have described altered monocyte phenotype and functions in sepsis. In particular, decreased expression of HLA-DR (mHLA-DR) on circulating monocytes has been proposed as a surrogate marker of immune failure [8, 9] and is now used for patient stratification in clinical trial (NCT02361528 [10]. Likewise, T lymphocyte anergy has been shown to be a hallmark of sepsis-induced immune dysfunctions and leads the way for future IL-7 trials to rejuvenate T cells [11, 12].

This new chapter will focus on biomarkers measurable by intracellular flow cytometry: the expressions of myeloperoxidase and lactoferrin in neutrophils' granules, FOXP3 lymphocyte expression and STAT5 phosphorylation in various lymphocyte subsets.

1.3 Marked Neutrophil Alterations in Sepsis

Neutrophils (PNN) are crucial components of the innate immune response and the first line of defense against infection. They also play a central role in initiation of adaptive immune

responses by secreting cytokines [13]. Interestingly, an immunosuppressive neutrophil subset has recently been reported in the blood of volunteers challenged with LPS [14]. Furthermore, Guérin *et al.* described a CD10⁺CD16⁻ subset of immature neutrophils associated with mortality in septic patients, and presenting some immunosuppressive properties [15]. In agreement, we recently observed that circulating neutrophils present with phenotypic, functional, and morphologic alterations a few days after sepsis onset [16]. Indeed, activation capacities (in response to fMLP, IL-8 and GM-CSF), chemotaxis (functional test and chemokine receptor expressions), phagocytosis, oxidative burst were found to be altered. In addition, we reported a decrease in myeloperoxidase and lactoferrin intracellular expressions a few days after sepsis onset. Most importantly, of these parameters, we observed that a diminished myeloperoxidase (MPO) expression appeared as the best predictor to identify a group of patients at higher risk of death [16].

Myeloperoxidase and lactoferrin, both contained respectively in azurophilic and secondary neutrophil granules are essential components of PNN function. Lactoferrin possess anti-microbial properties with the potential to prevent infections in young children. Several clinical trials involving lactoferrin for prevention of neonatal sepsis have been carried out [17]. MPO is a major player in oxidant metabolism as it reacts with hydrogen peroxide and chloride ions to generate hypochlorous acid, the most potent antimicrobial oxidant [18]. MPO activity is also a plausible mechanism for neutrophil extracellular traps (NETs) – a fibrous network released from neutrophils that can trap micro-organisms [19] – antimicrobial activity and could be detrimental by generating reactive oxidants in severe inflammatory conditions, where NETs are produced [20]. Myeloperoxidase measurement is usually performed using activity assay kits, assessing peroxidase activity in a sample, or ELISA kits, in order to measure MPO expression in plasma and tissue samples. Another approach relies on ICS and flow cytometry and novel protocols have been developed to perform ICS in whole blood and in one step (including permeabilisation, intra and surface stainings).

1.4 Regulatory T Cells – FOXP3 Expression

Regulatory T cells are an important CD4⁺ T cell subset involved in immune regulation. Treg percentages have been shown to differ in numerous disease states. Indeed, accumulated evidence suggests the essential functions of Treg in the pathophysiology of many clinical conditions such as autoimmune diseases [21], transplantations [22], severe septic shock [23], cancer [24], HIV infection [25], and in the development and maintenance of immunologic tolerance [26]. More specifically, regulatory T lymphocytes may play a role in the control of immune responses and are affected by injury and sepsis [27]. This may be related to their capacity to interact with components of the innate and adaptive immune systems. The analysis of regulatory T cells is also becoming an increasingly important consideration in the development of novel immunotherapeutic strategies. Accurate quantification of Treg during treatment protocols is crucial, particularly where the therapeutic strategy is targeting Treg. However, very few studies have been conducted in large prospective clinical cohorts. This could be partly explained as Treg can only be precisely identified by ICS flow cytometry using forkhead box protein 3 (FOXP3) staining, the key transcriptional factor for Treg [28]. The requirement for permeabilisation is not only time-consuming; it is also highly susceptible to cell loss, reduced fluorescence of antibody conjugates included in the staining mix, and therefore inaccurate quantification. Even if other phenotypes (such as CD4⁺CD25⁺ or CD4⁺CD25⁺CD127⁻) are known to be good surrogate identification strategies for Treg [29], FOXP3 remains to date, the only marker to appropriately identify those cells. We recently assessed the robustness of a new protocol allowing permeabilisation and staining in one-step in daily routine conditions in clinical samples with FOXP3 [30]. By comparing a one-step ICS procedure with a reference protocol, we obtained a strong correlation between percentages of FOXP3⁺ Treg according to difference phenotypic identification strategies. Moreover, with a better staining quality, a shorter realization time and no isotype control

requirement, this one-step procedure appears adequate for a daily routine use and in whole blood prospective clinical studies.

1.5 STAT5 Phosphorylation

Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) family is composed of seven related proteins. STATs are latent transcription factors that mainly reside in the cytoplasm in an inactive state. STATs become activated by phosphorylation on a critical tyrosine residue. Many upstream kinases can activate STATs, though the most common is the Jak family of kinases. Additional receptor and non-receptor tyrosine kinases also have the ability to phosphorylate STATs. Tyrosine phosphorylation allows for STATs to form active dimers [31], which can be homodimers or heterodimers with another STAT family member [32]. This dimer conformation triggers translocation to the nucleus. STATs then recruit additional cofactors to modulate expression of key target genes involved in growth, survival, and differentiation. Assaying these phosphorylation networks within the cellular context could therefore contribute to the mechanistic understanding of kinase activities in normal and disease states as well as assessing the efficacy of targeted agents. But the expansion of phospho-specific intracellular detection requires the improvement of reagents and tailored protocols. The development of phospho-specific antibodies against unique epitopes of individual proteins has been a key step that enabled intracellular phosphorylation analysis by flow cytometry to become useful for functional studies. Multiparametric staining, using both surface and intracellular stains, allows for the study of discrete biochemical events in readily discernible subsets [33]. However, again, the need of permeabilisation is time-consuming and results are usually poorly reproducible and hardly standardisable. By using a novel flow cytometry procedure of intracellular signaling pathway staining, we were able to detect STAT5 phosphorylation with a one-step whole blood method (simultaneous permeabilisation and staining) [34]. As an example, we combined intracellular FOXP3 staining [30] to

specifically measure STAT5 phosphorylation in Treg (CD4⁺FOXP3⁺) and CD4⁺FOXP3⁻ cells in response to cytokines. Interleukin(IL)-2 and IL-7 are two cytokines indispensable for growth, proliferation, and differentiation of CD4⁺ T cells [35]. Recombinant (r)IL-2 is particularly assessed in auto-immune diseases [36]. In this context, low doses of IL-2 are administered so as to increase the number of Treg. In contrast, IL-7 is currently assessed in various clinical conditions with the objective of stimulating/rejuvenating CD4⁺FOXP3⁻ lymphocytes [11]. We used increasing doses of human (h)IL-2 versus recombinant human (rh)IL-7 to investigate STAT5 phosphorylation. This novel functional testing in fresh whole blood was completed in about 70min [34]. To our knowledge, we confirm for the first time, in human whole blood, that low dose of hIL-2 preferentially activated Treg whereas low dose of rhIL-7 preferentially induced CD4⁺FOXP3⁻ activation (**Fig. 20.1**). This work also illustrated the interest of this flow cytometry approach for monitoring pharmacological responses to drugs in daily clinical practice. In another study, we then assessed the *ex vivo* responses of septic shock patients' T cell subsets to increasing doses of rhIL-7 by measuring intracellular pSTAT5 by flow cytometry [37]. We have reported a differential rhIL-7-induced response of T cells between surviving and non-surviving patients. In lieu of validation in a larger cohort of patients, this report indicated that such results, obtained in 70 min, may serve to stratify and monitor rhIL-7 therapy efficacy in future clinical studies.

1.6 Using Intracellular flow Cytometry in Larger Clinical Studies

Based on these new protocols for ICS, standardization of intracellular flow cytometry seems already well underway. By shortening the realization time (less than 90 minutes) and guaranteeing staining quality, these one-step procedures available on fresh whole blood may represent, upon validation in large cohort of patients, a major improvement in study of intracellular molecules by flow cytometry in clinical studies. Furthermore, these improved protocols open various perspectives. Functional tests with phospho-epitopes have

demonstrated an undeniable interest. They pave the way to other fields, in particular, intracellular cytokine staining. More generally, beyond ICU patients, various clinical contexts such as cancer therapy or immunotherapy should benefit from these new protocols for stratifying and monitoring patients.

2. Materials

2.1 Solutions

1. PerFix-nc (no centrifuge assay kit – Beckman Coulter, Brea, CA) is composed of three reagents: Buffer 1 (fixative reagent containing formaldehyde), Buffer 2 (permeabilising reagent containing proclin 300), and Buffer 3 (final 10X solution, to be diluted to 1X solution in distilled water, containing formaldehyde).
2. PerFix EXPOSE (Phospho-Epitopes Exposure kit – Beckman Coulter) is composed of four reagents: Buffer 1 (fixative reagent containing formaldehyde), Buffer 2 (permeabilising reagent containing proclin 300, sodium perchlorate and detergent), Buffer 3 (staining reagent containing proclin 300, sodium perchlorate and sodium azide) and Buffer 4 (final 20X solution, to be diluted to 1X solution in distilled water, containing formaldehyde and detergent).
3. PBS: dissolve 8.0g of NaCl, 0.2g of KCl, 1.15g of Na₂HPO₄, and 0.2g of KH₂PO₄ in 1l of distilled water (with adjusted pH at 7.4). This solution may be stored at 4°C up to a month.

2.2 Cytokines

1. Human IL-2 (hIL-2 - Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) from 0.01 U/ml to 100 U/ml.
2. Recombinant human IL-7 (rhIL-7 - R&D systems, Minneapolis, MN) from 0.001 ng/ml to 10 ng/ml.

2.3 Antibodies

1. Fluorescein isothiocyanate (FITC)-Phycoerythrin (PE)-labeled anti-myeloperoxidase (MPO – clone CLB-MPO-1) and anti-lactoferrin (clone CLB 13.17) (Beckman Coulter)
2. PE-Texas Red (ECD)-labeled anti-CD62L (clone DREG56) (Beckman Coulter)
3. PE-Cyanine 7 (PC7)-labeled anti-CD10 (clone ALB1) (Beckman Coulter)
4. Allophycocyanin-Alexa fluor 750 (AA750)-labeled anti-CD11b (clone Bearl) (Beckman Coulter)
5. Pacific Blue (PB)-labeled anti-CD16 (clone 3G8) (Beckman Coulter)
6. Krome Orange (KrO)-labeled anti-CD14 (clone RMO52) (Beckman Coulter)
7. PE-labeled anti-CD25 (clone B1.49.9) (Beckman Coulter)
8. PC7-labeled anti-CD127 (clone R34.34) (Beckman Coulter)
9. Alexa Fluor 647 (AF647)-labeled anti-FOXP3 (clone 259D) (BioLegend, San Diego, CA)
10. PB-labeled anti-CD4 (clone 13B8.2) (Beckman Coulter)
11. PE-labeled anti-phosphorylated STAT5 (Beckman Coulter)

3. Methods

3.1 Neutrophils – MPO and Lactoferrin Expressions

1. Collect samples of peripheral blood in EDTA anticoagulant tubes.
2. Mix 50µl of whole blood with 5µl of ECD-labeled anti CD62L, vortex and incubate 2 min at room temperature.
3. Add 20µl of PerFix-nc Buffer 1 (fixative reagent).
4. Vortex immediately and incubate at room temperature for 15 min in the dark.
5. During these 15 min, mix in a new tube 300µl of PerFix-nc Buffer 2 (permeabilising reagent) with 10µl of FITC-PE-labeled anti-myeloperoxidase and lactoferrin, 2.5µl of

PC7-labeled anti-CD10, 2.5µl of AA750-labeled anti-CD11b, 5µl of PB-labeled anti-CD16, and 5µl of KrO-labeled anti-CD14. Vortex and keep it at room temperature, in the dark.

6. At the end of the 15 min, mix 325µl of the second tube with the tube containing the blood.
7. Vortex and incubate at room temperature for 35 min in the dark.
8. Add 3ml of PerFix-nc Buffer 3 1X (previously dilute PerFix-nc Buffer 3 10X to 1X in distilled water), vortex.
9. Flow cytometry gating strategy: Neutrophils are identified on a FSC/SSC histogram and a CD14/SSC dot-plot is used to exclude monocytes (**Fig. 20.2**). MPO, lactoferrin, CD62L, CD11b, CD10 and CD16 are then measured on the surface of neutrophils. Results are expressed as mean fluorescence intensity (MFI) related to the entire neutrophil population. Percentages of cells' subsets are also reported regarding CD10 and CD16 expressions.

3.2 Regulatory T cells – FOXP3 Expression

1. Collect samples of peripheral blood in EDTA anticoagulant tubes.
2. Mix 50µl of whole blood with 5µl of PerFix-nc Buffer 1 (fixative reagent).
3. Vortex immediately and incubate at room temperature for 15 min in the dark.
4. During these 15 min, mix in a new tube 300µl of PerFix-nc Buffer 2 (permeabilising reagent) with 10µl of PE-labeled anti-CD25, 10µl of PC7-labeled anti-CD127, 10µl of AF647-labeled anti-FOXP3 and 5µl of PB-labeled anti-CD4. Vortex and keep it at room temperature, in the dark.
5. At the end of the 15 min, mix 335µl of the second tube with the tube containing the blood.
6. Vortex and incubate at room temperature for 60 min in the dark.

7. Add 3ml of PBS. Vortex and incubate at room temperature for 5 min in the dark.
8. Centrifuge for 5 min at 500xg at 10°C.
9. Discard the supernatant and resuspend the pellet in 3ml of PerFix-nc Buffer 3 1X (previously dilute PerFix-nc Buffer 3 10X to 1X in distilled water), vortex, and centrifuge for 5 min at 500xg at 10°C.
10. Discard the supernatant and resuspend the pellet in 500µl of PerFix-nc Buffer 3 1X.
11. Flow cytometry gating strategy: CD4⁺ T cells are first gated on a SSC/CD4 bi-parametric dot-plot. The CD25⁺CD127^{low} gate is then set in order to encompass an obviously distinct population among CD4⁺. CD4⁺FOXP3⁺ lymphocytes are also selected on a FOXP3/CD4 histogram (**Fig. 20.3**). Results are expressed as percentages of CD25⁺CD127^{low} and CD4⁺FOXP3⁺ cells among CD4⁺.

3.3 Lymphocytes – STAT5 Phosphorylation

1. Collect samples of peripheral blood in EDTA anticoagulant tubes.
2. First, stimulate blood samples (100µl of whole blood) with increasing hIL-2 or rhIL-7 concentrations (vortex immediately after adding the cytokine) at 37°C in a water bath for 10 min. Incubate an unstimulated blood sample at the same time.
3. Add 5µl of PB-labeled anti-CD4, vortex and incubate at 37°C in a water bath for 5 min.
4. Mix 50µl of PerFix EXPOSE Buffer 1 (fixative reagent) in each tube, vortex and incubate at room temperature for 10 min in the dark.
5. Add 1ml of PerFix EXPOSE Buffer 2 (permeabilising reagent), vortex and incubate at 37°C in a water bath for 5 min.
6. Centrifuge for 5 min at 300xg at 10°C and discard carefully the supernatant.

7. Resuspend the pellet in a mix of 100µl of PerFix EXPOSE Buffer 2 (staining reagent), 5µl of PE-labeled anti-STAT5 and 5µl of AF647-labeled anti-FOXP3 that can be previously reconstituted.
8. Vortex and incubate at room temperature for 30 min in the dark.
9. Add 3ml of PerFix-nc Buffer 4 1X (previously dilute PerFix-nc Buffer 4 20X to 1X in distilled water), vortex.
10. Centrifuge for 5 min at 300xg at 10°C and discard the supernatant. Resuspend the pellet in 500µl of PerFix-nc Buffer 4 1X.
11. Flow cytometry gating strategy: CD4⁺ lymphocytes are first gated based on SSC/CD4 biparametric histogram. Regulatory T lymphocytes (Treg) and CD4⁺FOXP3⁺ T cells are then identified among selected CD4⁺ cells depending on FOXP3 expression. The mean fluorescence intensity of phosphorylated STAT5 is reported for each population (**Fig. 20.1**).

4. Notes

1. There is a whole-blood protocol given by the manufacturer with PerFix-nc reagents, as follows:
 - Mix 50µl of whole blood with 5µl of PerFix-nc Buffer 1 (fixative reagent).
 - Vortex immediately and incubate at room temperature for 15 min in the dark.
 - Vortex again the fixed blood and add 300µl of PerFix-nc Buffer 2 (permeabilising reagent) to each tube. Vortex immediately.
 - Add immediately to each tube the fluorochromes-conjugated antibodies against intracellular epitopes and surface molecules (alternatively, the antibodies can be pre-mixed into the PerFix-nc Buffer 2 and added altogether at the end of the fixation step)

- Vortex immediately and incubate at room temperature for 15-30 min in the dark.
- Add 3ml of PerFix-nc Buffer 3 1X (prepared from the 10X concentrated PerFix-nc Buffer 3 in distilled water) to each tube, vortex immediately.
- The sample is now ready for analysis on a flow cytometer.

This protocol should be optimized according to the type of cells analyzed and the antibodies used (extracellular and intracellular staining). That is what we have performed for MPO and lactoferrin expressions in neutrophils and FOXP3 in Treg. Feel free to adapt at your convenience times of incubation or volumes of reagents to optimize your experiment.

2. Be careful about the different volumes of PerFix-nc Buffer 1 (fixative reagent) between the procedure for measuring MPO and lactoferrin expression in neutrophils, which is 20µl, and the protocol for intracellular staining of FOXP3 (i.e., 5µl).
3. Red blood cell lysis can be problematic with PerFix-nc reagents. Therefore, the usual discriminant threshold used for the analyses, based on Forward Scatter Characteristics, might not exclude all these cells. Thus, in such cases, it can be settled on a fluorochrome channel.
4. Surprisingly, to study STAT5 phosphorylation with PerFix EXPOSE method and reagents, peripheral blood can be collected in sampling tubes containing EDTA.
5. In PerFix EXPOSE protocol to explore STAT5 phosphorylation in T lymphocytes subsets, in order to obtain a better staining quality, it is preferable to add CD4-PB antibody before the one-step of intracellular/extracellular staining and permeabilisation. We chose to split the stimulation with hIL-2 and rhIL-7 and add this antibody 5min before the end of the stimulation.

6. In PerFix EXPOSE protocol, it is very important to discard carefully the supernatant after incubation with PerFix EXPOSE Buffer 2 in order to stop red blood cell lysis that can continue insidiously otherwise.

References

1. Maecker HT, McCoy JP, Nussenblatt R (2012) Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nat Rev Immunol* 12:191-200
2. Robinson JP, Roederer M (2015) HISTORY OF SCIENCE. Flow cytometry strikes gold. *Science* 350:739-40
3. Perez OD, Mitchell D, Campos R, Gao GJ, Li L, Nolan GP (2005) Multiparameter analysis of intracellular phosphoepitopes in immunophenotyped cell populations by flow cytometry. *Curr Protoc Cytom* Chapter 6:Unit 6 20
4. Venet F, Guignant C, Monneret G (2011) Flow cytometry developments and perspectives in clinical studies: examples in ICU patients. *Methods Mol Biol* 761:261-75
5. Levy MM, Artigas A, Phillips GS, Rhodes A, Beale R, Osborn T, Vincent JL, Townsend S, Lemeshow S, Dellinger RP (2012) Outcomes of the Surviving Sepsis Campaign in intensive care units in the USA and Europe: a prospective cohort study. *Lancet Infect Dis* 12:919-24
6. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D (2013) Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect Dis* 13:260-8
7. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D (2013) Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 13:862-74

8. Venet F, Lukaszewicz AC, Payen D, Hotchkiss R, Monneret G (2013) Monitoring the immune response in sepsis: a rational approach to administration of immunoadjuvant therapies. *Curr Opin Immunol* 25:477-83
9. Monneret G, Venet F, Pachot A, Lepape A (2008) Monitoring immune dysfunctions in the septic patient: a new skin for the old ceremony. *Mol Med* 14:64-78
10. Meisel C, Schefold JC, Pschowski R, Baumann T, Hetzger K, Gregor J, Weber-Carstens S, Hasper D, Keh D, Zuckermann H, Reinke P, Volk HD (2009) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to reverse sepsis-associated immunosuppression: a double-blind, randomized, placebo-controlled multicenter trial. *Am J Respir Crit Care Med* 180:640-8
11. Mackall CL, Fry TJ, Gress RE (2011) Harnessing the biology of IL-7 for therapeutic application. *Nat Rev Immunol* 11:330-42
12. Venet F, Foray AP, Villars-Mechin A, Malcus C, Poitevin-Later F, Lepape A, Monneret G (2012) IL-7 restores lymphocyte functions in septic patients. *J Immunol* 189:5073-81
13. Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, Metzler KD, Zychlinsky A (2012) Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu Rev Immunol* 30:459-89
14. Pillay J, Kamp VM, van Hoffen E, Visser T, Tak T, Lammers JW, Ulfman LH, Leenen LP, Pickkers P, Koenderman L (2012) A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *J Clin Invest* 122:327-36
15. Guerin E, Orabona M, Raquil MA, Giraudeau B, Bellier R, Gibot S, Bene MC, Lacombe F, Droin N, Solary E, Vignon P, Feuillard J, Francois B (2014) Circulating immature granulocytes with T-cell killing functions predict sepsis deterioration*. *Crit Care Med* 42:2007-18

16. Demaret J, Venet F, Friggeri A, Cazalis MA, Plassais J, Jallades L, Malcus C, Poitevin-Later F, Textoris J, Lepape A, Monneret G (2015) Marked alterations of neutrophil functions during sepsis-induced immunosuppression. *J Leukoc Biol*
17. Turin CG, Zea-Vera A, Pezo A, Cruz K, Zegarra J, Bellomo S, Cam L, Llanos R, Castaneda A, Tucto L, Ochoa TJ (2014) Lactoferrin for prevention of neonatal sepsis. *Biometals* 27:1007-16
18. Klebanoff SJ (2005) Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol* 77:598-625
19. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303:1532-5
20. Parker H, Albrett AM, Kettle AJ, Winterbourn CC (2013) Myeloperoxidase associated with neutrophil extracellular traps is active and mediates bacterial killing in the presence of hydrogen peroxide. *J Leukoc Biol* 91:369-76
21. Baecher-Allan C, Hafler DA (2006) Human regulatory T cells and their role in autoimmune disease. *Immunol Rev* 212:203-16
22. Wood KJ, Bushell A, Hester J (2012) Regulatory immune cells in transplantation. *Nat Rev Immunol* 12:417-30
23. Monneret G, Venet F (2010) Additional bad news from regulatory T cells in sepsis. *Crit Care* 14:453
24. Erfani N, Mehrabadi SM, Ghayumi MA, Haghshenas MR, Mojtahedi Z, Ghaderi A, Amani D (2012) Increase of regulatory T cells in metastatic stage and CTLA-4 over expression in lymphocytes of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). *Lung Cancer* 77:306-11
25. Elahi S, Dinges WL, Lejarcegui N, Laing KJ, Collier AC, Koelle DM, McElrath MJ, Horton H (2011) Protective HIV-specific CD8+ T cells evade Treg cell suppression. *Nat Med* 17:989-95

26. Fukaya T, Takagi H, Sato Y, Sato K, Eizumi K, Taya H, Shin T, Chen L, Dong C, Azuma M, Yagita H, Malissen B (2010) Crucial roles of B7-H1 and B7-DC expressed on mesenteric lymph node dendritic cells in the generation of antigen-specific CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells in the establishment of oral tolerance. *Blood* 116:2266-76
27. Venet F, Chung CS, Kherouf H, Geeraert A, Malcus C, Poitevin F, Bohe J, Lepape A, Ayala A, Monneret G (2009) Increased circulating regulatory T cells (CD4⁺)CD25⁺CD127⁻ contribute to lymphocyte anergy in septic shock patients. *Intensive Care Med* 35:678-86
28. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA (2010) FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol* 10:490-500
29. Saison J, Demaret J, Venet F, Chidiac C, Malcus C, Poitevin-Later F, Tardy JC, Ferry T, Monneret G (2012) CD4⁺CD25⁺CD127⁻ assessment as a surrogate phenotype for FOXP3⁺ regulatory T cells in HIV-1 infected viremic and aviremic subjects. *Cytometry B Clin Cytom*
30. Demaret J, Saison J, Venet F, Malcus C, Poitevin-Later F, Lepape A, Ferry T, Monneret G (2013) Assessment of a novel flow cytometry technique of one-step intracellular staining: example of FOXP3 in clinical samples. *Cytometry B Clin Cytom* 84:187-93
31. Kretzschmar AK, Dinger MC, Henze C, Brocke-Heidrich K, Horn F (2004) Analysis of Stat3 (signal transducer and activator of transcription 3) dimerization by fluorescence resonance energy transfer in living cells. *Biochem J* 377:289-97
32. Cella N, Groner B, Hynes NE (1998) Characterization of Stat5a and Stat5b homodimers and heterodimers and their association with the glucocorticoid receptor in mammary cells. *Mol Cell Biol* 18:1783-92

33. Perez OD, Nolan GP (2006) Phospho-proteomic immune analysis by flow cytometry: from mechanism to translational medicine at the single-cell level. *Immunol Rev* 210:208-28
34. Dupont G, Demaret J, Venet F, Malergue F, Malcus C, Poitevin-Later F, Morel J, Monneret G (2014) Comparative dose-responses of recombinant human IL-2 and IL-7 on STAT5 phosphorylation in CD4⁺FOXP3⁻ cells versus regulatory T cells: a whole blood perspective. *Cytokine* 69:146-9
35. Rochman Y, Spolski R, Leonard WJ (2009) New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines. *Nat Rev Immunol* 9:480-90
36. Atkins MB (2002) Interleukin-2: clinical applications. *Semin Oncol* 29:12-7
37. Demaret J, Dupont G, Venet F, Friggeri A, Lepape A, Rimmele T, Morel J, Monneret G (2015) STAT5 phosphorylation in T cell subsets from septic patients in response to recombinant human interleukin-7: a pilot study. *J Leukoc Biol* 97:791-6

Figure legends

Fig. 20.1. Gating strategy for STAT5 phosphorylation on different T cell subsets and response to low dose of cytokines. CD4⁺ were first gated based on SSC versus CD4 expression on a biparametric histogram **(A)**. Regulatory T cells (Treg) and CD4⁺FOXP3⁻ were then identified among selected CD4⁺ cells depending on FOXP3 expression **(B)**. The mean fluorescence intensity (MFI) of phosphorylated STAT5 (pSTAT5) was reported for each population **(C and D)**. Box plots representing MFI of pSTAT5 after stimulation with low dose of IL-7 **(E)** and low dose of IL-2 **(F)** for Treg (light grey) and CD4⁺FOXP3⁻ lymphocytes (dark grey) for 8 healthy controls. As expected, low dose of IL-7 preferentially activates effector T lymphocytes whereas low dose IL-2 preferentially activates Treg. The nonparametric Mann-Whitney U test was used to compare the results between subsets.

Fig. 20.2. Gating strategy for neutrophils. Neutrophils (PNN) are first identified on a FSC/SSC histogram (**A**) and a CD14/SSC dot-plot is used to exclude monocytes (**B**). (**C**) represents an overlay of myeloperoxidase expression for an Intensive Care Unit (ICU) patient and a healthy control gated on [PNN AND NOT (Monocytes)].

Fig. 20.3. Treg measurement by flow cytometry. SSC versus CD4 dot plots allow the gating of CD4⁺ lymphocytes for representative examples of healthy volunteer and ICU patient (**A** and **D**). Gated on CD4⁺ lymphocytes, regulatory T cells are measured as CD4⁺FOXP3⁺ cells (**B** and **E**). On **C** and **F** (gated on CD4⁺), red colored cells represent CD4⁺FOXP3⁺ cells among CD25⁺CD127⁻ lymphocytes.

Figure 20.1

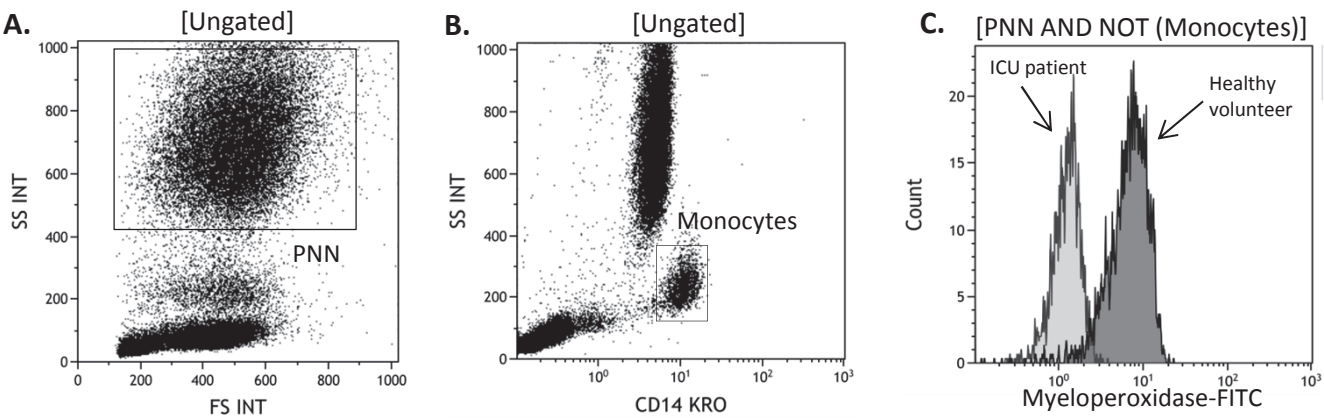


Figure 20.2

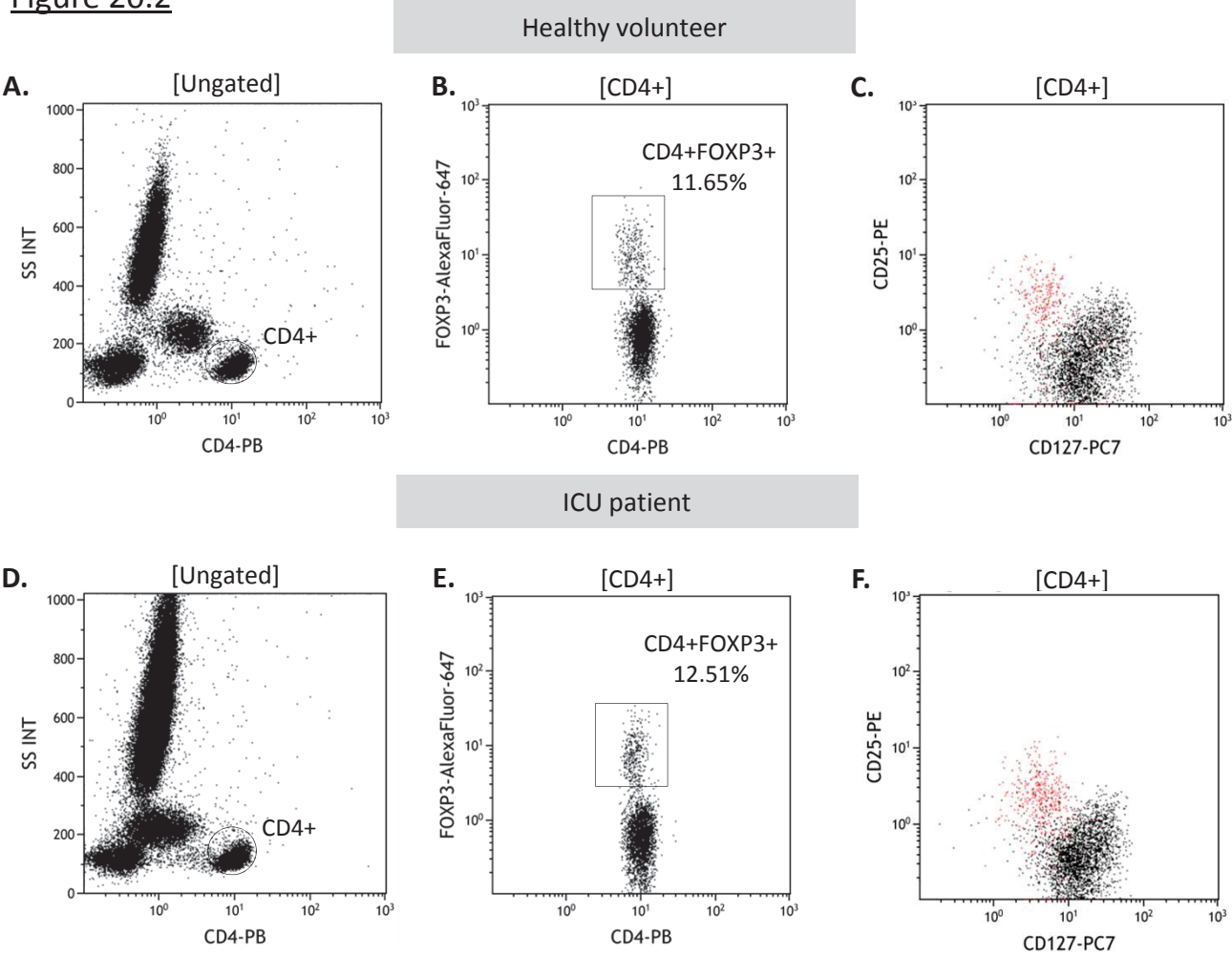
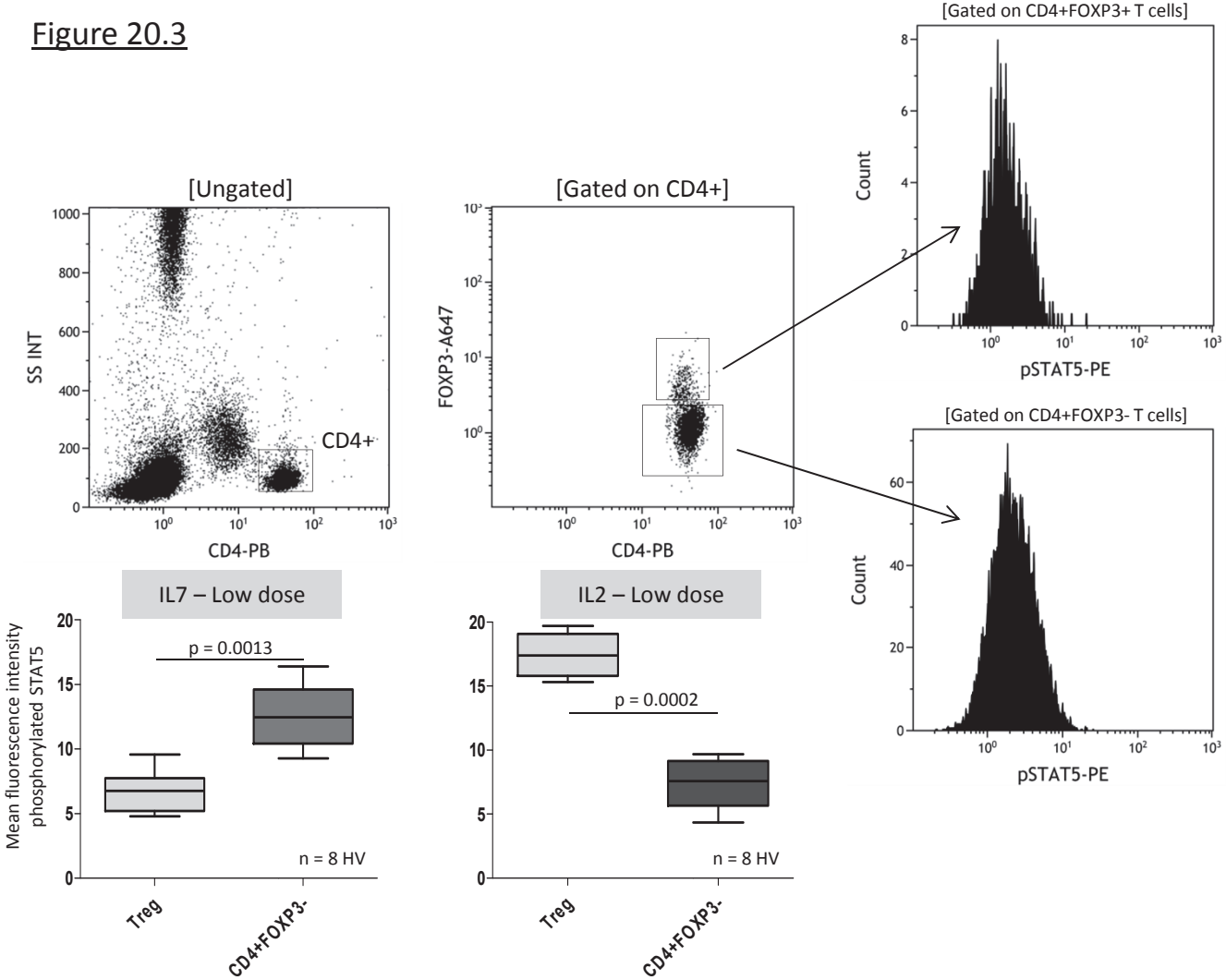


Figure 20.3



BIBLIOGRAPHIE

1. Levy MM, Artigas A, Phillips GS, Rhodes A, Beale R, Osborn T, et al. Outcomes of the Surviving Sepsis Campaign in intensive care units in the USA and Europe: a prospective cohort study. *Lancet Infect Dis.* 2012;12(12):919-24.
2. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Crit Care Med.* 2013;41(2):580-637.
3. Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med.* 2013;369(9):840-51.
4. Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, Metzler KD, Zychlinsky A. Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu Rev Immunol.* 2012;30:459-89.
5. Pillay J, Kamp VM, van Hoffen E, Visser T, Tak T, Lammers JW, et al. A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *J Clin Invest.* 2012;122(1):327-36.
6. Gresnigt MS, Joosten LA, Verschueren I, van der Meer JW, Netea MG, Dinarello CA, et al. Neutrophil-mediated inhibition of proinflammatory cytokine responses. *J Immunol.* 2012;189(10):4806-15.
7. Darcy CJ, Minigo G, Piera KA, Davis JS, McNeil YR, Chen Y, et al. Neutrophils with myeloid derived suppressor function deplete arginine and constrain T cell function in septic shock patients. *Crit Care.* 2014;18(4):R163.
8. Guerin E, Orabona M, Raquil MA, Giraudeau B, Bellier R, Gibot S, et al. Circulating immature granulocytes with T-cell killing functions predict sepsis deterioration*. *Crit Care Med.* 2014;42(9):2007-18.
9. Pene F, Pickkers P, Hotchkiss RS. Is this critically ill patient immunocompromised? *Intensive Care Med.* 2015.
10. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest.* 1992;101(6):1644-55.
11. Vincent JL, Opal SM, Marshall JC, Tracey KJ. Sepsis definitions: time for change. *Lancet.* 2013;381(9868):774-5.
12. Vincent JL. Dear SIRS, I'm sorry to say that I don't like you. *Crit Care Med.* 1997;25(2):372-4.
13. Kaukonen KM, Bailey M, Pilcher D, Cooper DJ, Bellomo R. Systemic inflammatory response syndrome criteria in defining severe sepsis. *N Engl J Med.* 2015;372(17):1629-38.
14. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med.* 2003;31(4):1250-6.
15. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(12):862-74.

16. Shankar-Hari M, Bertolini G, Brunkhorst FM, Bellomo R, Annane D, Deutschman CS, et al. Judging quality of current septic shock definitions and criteria. *Crit Care*. 2015;19(1):445.
17. Shankar-Hari M, Deutschman CS, Singer M. Do we need a new definition of sepsis? *Intensive Care Med*. 2015;41(5):909-11.
18. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016;315(8):801-10.
19. Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonca A, Bruining H, et al. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med*. 1996;22(7):707-10.
20. Stoller J, Halpin L, Weis M, Aplin B, Qu W, Georgescu C, et al. Epidemiology of severe sepsis: 2008-2012. *J Crit Care*. 2016;31(1):58-62.
21. Gaieski DF, Edwards JM, Kallan MJ, Carr BG. Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the United States. *Crit Care Med*. 2013;41(5):1167-74.
22. Angus DC, Wax RS. Epidemiology of sepsis: an update. *Crit Care Med*. 2001;29(7 Suppl):S109-16.
23. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*. 2003;348(16):1546-54.
24. Dombrovskiy VY, Martin AA, Sunderram J, Paz HL. Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: a trend analysis from 1993 to 2003. *Crit Care Med*. 2007;35(5):1244-50.
25. Rhee C, Gohil S, Klompas M. Regulatory mandates for sepsis care--reasons for caution. *N Engl J Med*. 2014;370(18):1673-6.
26. Mayr FB, Yende S, Angus DC. Epidemiology of severe sepsis. *Virulence*. 2014;5(1):4-11.
27. .
28. Kaukonen KM, 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*. 2014;311(13):1308-16.
29. Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, Ranieri VM, Reinhart K, Gerlach H, et al. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit Care Med*. 2006;34(2):344-53.
30. Quenot JP, Biquet C, Kara F, Martinet O, Ganster F, Navellou JC, et al. The epidemiology of septic shock in French intensive care units: the prospective multicenter cohort EPISS study. *Crit Care*. 2013;17(2):R65.
31. Brun-Buisson C. The epidemiology of the systemic inflammatory response. *Intensive Care Med*. 2000;26 Suppl 1:S64-74.
32. Wang HE, Szychowski JM, Griffin R, Safford MM, Shapiro NI, Howard G. Long-term mortality after community-acquired sepsis: a longitudinal population-based cohort study. *BMJ Open*. 2014;4(1):e004283.
33. Bahl R, Martinez J, Ali N, Bhan MK, Carlo W, Chan KY, et al. Research priorities to reduce global mortality from newborn infections by 2015. *Pediatr Infect Dis J*. 2009;28(1 Suppl):S43-8.

34. Watson RS, Carcillo JA, Linde-Zwirble WT, Clermont G, Lidicker J, Angus DC. The epidemiology of severe sepsis in children in the United States. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167(5):695-701.
35. Martin GS, Mannino DM, Moss M. The effect of age on the development and outcome of adult sepsis. *Crit Care Med*. 2006;34(1):15-21.
36. Yang Y, Yang KS, Hsann YM, Lim V, Ong BC. The effect of comorbidity and age on hospital mortality and length of stay in patients with sepsis. *J Crit Care*. 2010;25(3):398-405.
37. Nachtigall I, Tafelski S, Rothbart A, Kaufner L, Schmidt M, Tamarkin A, et al. Gender-related outcome difference is related to course of sepsis on mixed ICUs: a prospective, observational clinical study. *Crit Care*. 2011;15(3):R151.
38. Schoeneberg C, Kauther MD, Hussmann B, Keitel J, Schmitz D, Lendemann S. Gender-specific differences in severely injured patients between 2002 and 2011: data analysis with matched-pair analysis. *Crit Care*. 2013;17(6):R277.
39. Danai PA, Moss M, Mannino DM, Martin GS. The epidemiology of sepsis in patients with malignancy. *Chest*. 2006;129(6):1432-40.
40. Koh GC, Peacock SJ, van der Poll T, Wiersinga WJ. The impact of diabetes on the pathogenesis of sepsis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31(4):379-88.
41. Dombrovskiy VY, Martin AA, Sunderram J, Paz HL. Occurrence and outcomes of sepsis: influence of race. *Crit Care Med*. 2007;35(3):763-8.
42. Mayr FB, Yende S, Linde-Zwirble WT, Peck-Palmer OM, Barnato AE, Weissfeld LA, et al. Infection rate and acute organ dysfunction risk as explanations for racial differences in severe sepsis. *JAMA*. 2010;303(24):2495-503.
43. Vogel TR. Update and review of racial disparities in sepsis. *Surg Infect (Larchmt)*. 2012;13(4):203-8.
44. von Bernuth H, Picard C, Jin Z, Pankla R, Xiao H, Ku CL, et al. Pyogenic bacterial infections in humans with MyD88 deficiency. *Science*. 2008;321(5889):691-6.
45. Pan W, Zhang AQ, Yue CL, Gao JW, Zeng L, Gu W, et al. Association between interleukin-10 polymorphisms and sepsis: a meta-analysis. *Epidemiol Infect*. 2015;143(2):366-75.
46. Chung LP, Waterer GW. Genetic predisposition to respiratory infection and sepsis. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2011;48(5-6):250-68.
47. Cohen J, Brun-Buisson C, Torres A, Jorgensen J. Diagnosis of infection in sepsis: an evidence-based review. *Crit Care Med*. 2004;32(11 Suppl):S466-94.
48. Rangel-Frausto MS. The epidemiology of bacterial sepsis. *Infect Dis Clin North Am*. 1999;13(2):299-312, vii.
49. Leligowicz A, Dodek PM, Norena M, Wong H, Kumar A. Association between Source of Infection and Hospital Mortality in Patients Who Have Septic Shock. *Am J Respir Crit Care Med*. 189(10):1204-13.
50. Burchardi H, Schneider H. Economic aspects of severe sepsis: a review of intensive care unit costs, cost of illness and cost effectiveness of therapy. *Pharmacoeconomics*. 2004;22(12):793-813.
51. Adrie C, Alberti C, Chaix-Couturier C, Azoulay E, De Lassence A, Cohen Y, et al. Epidemiology and economic evaluation of severe sepsis in France: age, severity, infection site, and place of acquisition (community, hospital, or intensive care unit) as determinants of workload and cost. *J Crit Care*. 2005;20(1):46-58.

52. Brun-Buisson C, Meshaka P, Pinton P, Vallet B. EPISEPSIS: a reappraisal of the epidemiology and outcome of severe sepsis in French intensive care units. *Intensive Care Med.* 2004;30(4):580-8.
53. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med.* 2001;29(7):1303-10.
54. Torio CM, Andrews RM. National Inpatient Hospital Costs: The Most Expensive Conditions by Payer, 2011: Statistical Brief #160. Healthcare Cost and Utilization Project (HCUP) Statistical Briefs. Rockville (MD)2006.
55. Tiru B, DiNino EK, Orenstein A, Mailloux PT, Pesaturo A, Gupta A, et al. The Economic and Humanistic Burden of Severe Sepsis. *Pharmacoeconomics.* 2015;33(9):925-37.
56. Jordana-Lluch E, Carolan HE, Gimenez M, Sampath R, Ecker DJ, Quesada MD, et al. Rapid diagnosis of bloodstream infections with PCR followed by mass spectrometry. *PLoS One.* 2013;8(4):e62108.
57. Schaub N, Boldanova T, Noveanu M, Arenja N, Hermann H, Twerenbold R, et al. Incremental value of multiplex real-time PCR for the early diagnosis of sepsis in the emergency department. *Swiss Med Wkly.* 2014;144:w13911.
58. Schneiderhan W, Grundt A, Worner 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.* 2013;59(11):1649-56.
59. Funk DJ, Kumar A. Antimicrobial therapy for life-threatening infections: speed is life. *Crit Care Clin.* 2011;27(1):53-76.
60. Marshall JC, Reinhart K. Biomarkers of sepsis. *Crit Care Med.* 2009;37(7):2290-8.
61. Samraj RS, Zingarelli B, Wong HR. Role of biomarkers in sepsis care. *Shock.* 2013;40(5):358-65.
62. Pierrakos C, Vincent JL. Sepsis biomarkers: a review. *Crit Care.* 2010;14(1):R15.
63. McDermott JE, Wang J, Mitchell H, Webb-Robertson BJ, Hafen R, Ramey J, et al. Challenges in Biomarker Discovery: Combining Expert Insights with Statistical Analysis of Complex Omics Data. *Expert Opin Med Diagn.* 2013;7(1):37-51.
64. Kofoed K, Andersen O, Kronborg G, Tvede M, Petersen J, Eugen-Olsen J, 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.* 2007;11(2):R38.
65. Gibot S, Bene MC, Noel R, Massin F, Guy J, Cravoisy A, et al. Combination biomarkers to diagnose sepsis in the critically ill patient. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;186(1):65-71.
66. Ward PA, Bosmann M. A historical perspective on sepsis. *Am J Pathol.* 2012;181(1):2-7.
67. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(7):499-511.
68. Liew FY, Xu D, Brint EK, O'Neill LA. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(6):446-58.
69. Broz P, Monack DM. Newly described pattern recognition receptors team up against intracellular pathogens. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(8):551-65.
70. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol.* 2010;11(5):373-84.

71. Kufer TA, Sansonetti PJ. NLR functions beyond pathogen recognition. *Nat Immunol.* 2011;12(2):121-8.
72. Blander JM, Sander LE. Beyond pattern recognition: five immune checkpoints for scaling the microbial threat. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(3):215-25.
73. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell.* 2010;140(6):805-20.
74. Dambuza IM, Brown GD. C-type lectins in immunity: recent developments. *Curr Opin Immunol.* 2015;32:21-7.
75. Brown MA, Jones WK. NF-kappaB action in sepsis: the innate immune system and the heart. *Front Biosci.* 2004;9:1201-17.
76. Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM. Septic shock. *Lancet.* 2005;365(9453):63-78.
77. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature.* 2002;420(6917):885-91.
78. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med.* 2003;348(2):138-50.
79. Stearns-Kurosawa DJ, Osuchowski MF, Valentine C, Kurosawa S, Remick DG. The Pathogenesis of Sepsis. *Annu Rev Pathol.* 2011;6:19-48.
80. Fullerton JN, O'Brien AJ, Gilroy DW. Pathways mediating resolution of inflammation: when enough is too much. *J Pathol.* 2013;231(1):8-20.
81. Iskander KN, Osuchowski MF, Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Stepien D, Valentine C, et al. Sepsis: multiple abnormalities, heterogeneous responses, and evolving understanding. *Physiol Rev.* 2013;93(3):1247-88.
82. Brealey D, Brand M, Hargreaves I, Heales S, Land J, Smolenski R, et al. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet.* 2002;360(9328):219-23.
83. Dellinger RP, Carlet JM, Masur H, Gerlach H, Calandra T, Cohen J, et al. Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med.* 2004;32(3):858-73.
84. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. *Intensive Care Med.* 2013;39(2):165-228.
85. Vincent JL, Serrano EC, Dimoula A. Current management of sepsis in critically ill adult patients. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2011;9(7):847-56.
86. Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med.* 2006;34(6):1589-96.
87. Ferrer R, Martin-Loeches I, Phillips G, Osborn TM, Townsend S, Dellinger RP, et al. Empiric antibiotic treatment reduces mortality in severe sepsis and septic shock from the first hour: results from a guideline-based performance improvement program. *Crit Care Med.* 2014;42(8):1749-55.
88. Textoris J, Wiramus S, Martin C, Leone M. Overview of antimicrobial therapy in intensive care units. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2011;9(1):97-109.
89. Delaney AP, Dan A, McCaffrey J, Finfer S. The role of albumin as a resuscitation fluid for patients with sepsis: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care Med.* 2011;39(2):386-91.

90. Brunkhorst FM, Engel C, Bloos F, Meier-Hellmann A, Ragaller M, Weiler N, et al. Intensive insulin therapy and pentastarch resuscitation in severe sepsis. *N Engl J Med*. 2008;358(2):125-39.
91. Perner A, Haase N, Guttormsen AB, Tenhunen J, Klemenzson G, Aneman A, et al. Hydroxyethyl starch 130/0.42 versus Ringer's acetate in severe sepsis. *N Engl J Med*. 2012;367(2):124-34.
92. Cruz DN, Antonelli M, Fumagalli R, Foltran F, Brienza N, Donati A, et al. Early use of polymyxin B hemoperfusion in abdominal septic shock: the EUPHAS randomized controlled trial. *JAMA*. 2009;301(23):2445-52.
93. Payen D, Mateo J, Cavaillon JM, Fraisse F, Floriot C, Vicaut E. Impact of continuous venovenous hemofiltration on organ failure during the early phase of severe sepsis: a randomized controlled trial. *Crit Care Med*. 2009;37(3):803-10.
94. Cronin L, Cook DJ, Carlet J, Heyland DK, King D, Lansang MA, et al. Corticosteroid treatment for sepsis: a critical appraisal and meta-analysis of the literature. *Crit Care Med*. 1995;23(8):1430-9.
95. Lefering R, Neugebauer EA. Steroid controversy in sepsis and septic shock: a meta-analysis. *Crit Care Med*. 1995;23(7):1294-303.
96. Annane D, Sebille V, Charpentier C, Bollaert PE, Francois B, Korach JM, et al. Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock. *Jama*. 2002;288(7):862-71.
97. Sprung CL, Annane D, Keh D, Moreno R, Singer M, Freivogel K, et al. Hydrocortisone therapy for patients with septic shock. *N Engl J Med*. 2008;358(2):111-24.
98. Volbeda M, Wetterslev J, Gluud C, Zijlstra JG, van der Horst IC, Keus F. Glucocorticosteroids for sepsis: systematic review with meta-analysis and trial sequential analysis. *Intensive Care Med*. 2015;41(7):1220-34.
99. van den Berghe G, Wouters P, Weekers F, Verwaest C, Bruyninckx F, Schetz M, et al. Intensive insulin therapy in the critically ill patients. *N Engl J Med*. 2001;345(19):1359-67.
100. Falciglia M, Freyberg RW, Almenoff PL, D'Alessio DA, Render ML. Hyperglycemia-related mortality in critically ill patients varies with admission diagnosis. *Crit Care Med*. 2009;37(12):3001-9.
101. Investigators N-SS, Finfer S, Chittock DR, Su SY, Blair D, Foster D, et al. Intensive versus conventional glucose control in critically ill patients. *N Engl J Med*. 2009;360(13):1283-97.
102. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, et al. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med*. 2001;344(10):699-709.
103. Abraham E, Laterre PF, Garg R, Levy H, Talwar D, Trzaskoma BL, et al. Drotrecogin alfa (activated) for adults with severe sepsis and a low risk of death. *N Engl J Med*. 2005;353(13):1332-41.
104. Ranieri VM, Thompson BT, Barie PS, Dhainaut JF, Douglas IS, Finfer S, et al. Drotrecogin alfa (activated) in adults with septic shock. *N Engl J Med*. 2012;366(22):2055-64.
105. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Clermont G, Ball DE, Basson BR, Ely EW, et al. Cost-effectiveness of drotrecogin alfa (activated) in the treatment of severe sepsis. *Crit Care Med*. 2003;31(1):1-11.
106. Vincent JL, Sun Q, Dubois MJ. Clinical trials of immunomodulatory therapies in severe sepsis and septic shock. *Clin Infect Dis*. 2002;34(8):1084-93.
107. Ziegler EJ, Fisher CJ, Jr., Sprung CL, Straube RC, Sadoff JC, Foulke GE, et al. Treatment of gram-negative bacteremia and septic shock with HA-1A human monoclonal antibody against endotoxin. A

randomized, double-blind, placebo-controlled trial. The HA-1A Sepsis Study Group. *N Engl J Med*. 1991;324(7):429-36.

108. McCloskey RV, Straube RC, Sanders C, Smith SM, Smith CR. Treatment of septic shock with human monoclonal antibody HA-1A. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. CHESS Trial Study Group. *Ann Intern Med*. 1994;121(1):1-5.

109. Vincent JL, Van Nuffelen M. Septic shock: new pharmacotherapy options or better trial design? *Expert Opin Pharmacother*. 2013;14(5):561-70.

110. Abraham E, Anzueto A, Gutierrez G, Tessler S, San Pedro G, Wunderink R, et al. Double-blind randomised controlled trial of monoclonal antibody to human tumour necrosis factor in treatment of septic shock. NORASEPT II Study Group. *Lancet*. 1998;351(9107):929-33.

111. Abraham E, Glauser MP, Butler T, Garbino J, Gelmont D, Laterre PF, et al. p55 Tumor necrosis factor receptor fusion protein in the treatment of patients with severe sepsis and septic shock. A randomized controlled multicenter trial. Ro 45-2081 Study Group. *JAMA*. 1997;277(19):1531-8.

112. Abraham E, Laterre PF, Garbino J, Pingleton S, Butler T, Dugernier T, et al. Lenercept (p55 tumor necrosis factor receptor fusion protein) in severe sepsis and early septic shock: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter phase III trial with 1,342 patients. *Crit Care Med*. 2001;29(3):503-10.

113. Fisher CJ, Jr., Dhainaut JF, Opal SM, Pribble JP, Balk RA, Slotman GJ, et al. Recombinant human interleukin 1 receptor antagonist in the treatment of patients with sepsis syndrome. Results from a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Phase III rhIL-1ra Sepsis Syndrome Study Group. *JAMA*. 1994;271(23):1836-43.

114. Opal SM, Fisher CJ, Jr., Dhainaut JF, Vincent JL, Brase R, Lowry SF, et al. Confirmatory interleukin-1 receptor antagonist trial in severe sepsis: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. The Interleukin-1 Receptor Antagonist Sepsis Investigator Group. *Crit Care Med*. 1997;25(7):1115-24.

115. Opal SM, Laterre PF, Francois B, LaRosa SP, Angus DC, Mira JP, et al. Effect of eritoran, an antagonist of MD2-TLR4, on mortality in patients with severe sepsis: the ACCESS randomized trial. *JAMA*. 2013;309(11):1154-62.

116. Kruger PS, Venkatesh B. Are there any benefits from statin treatment for the septic patient? *Curr Atheroscler Rep*. 16(1):378.

117. Papazian L, Roch A, Charles PE, Penot-Ragon C, Perrin G, Roullet P, et al. Effect of statin therapy on mortality in patients with ventilator-associated pneumonia: a randomized clinical trial. *JAMA*. 2012;310(16):1692-700.

118. Deshpande A, Pasupuleti V, Rothberg MB. Statin therapy and mortality from sepsis: a meta-analysis of randomized trials. *Am J Med*. 2015;128(4):410-7 e1.

119. Fink MP. Animal models of sepsis. *Virulence*. 5(1):143-53.

120. Hotchkiss RS, Coopersmith CM, McDunn JE, Ferguson TA. The sepsis seesaw: tilting toward immunosuppression. *Nat Med*. 2009;15(5):496-7.

121. van Dissel JT, van Langevelde P, Westendorp RG, Kwappenberg K, Frolich M. Anti-inflammatory cytokine profile and mortality in febrile patients. *Lancet*. 1998;351(9107):950-3.

122. Gogos CA, Drosou E, Bassaris HP, Skoutelis A. Pro- versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options. *J Infect Dis*. 2000;181(1):176-80.

123. Girardin E, Roux-Lombard P, Grau GE, Suter P, Gallati H, Dayer JM. Imbalance between tumour necrosis factor- α and soluble TNF receptor concentrations in severe meningococcaemia. The J5 Study Group. *Immunology*. 1992;76(1):20-3.
124. Howard M, Muchamuel T, Andrade S, Menon S. Interleukin 10 protects mice from lethal endotoxemia. *J Exp Med*. 1993;177(4):1205-8.
125. Biswas SK, Lopez-Collazo E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol*. 2009;30(10):475-87.
126. West MA, Heagy W. Endotoxin tolerance: A review. *Crit Care Med*. 2002;30(1 Supp):S64-S73.
127. Munoz C, Carlet J, Fitting C, Misset B, Bleriot JP, Cavaillon JM. Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. *J Clin Invest*. 1991;88(5):1747-54.
128. Monneret G, Venet F, Pachot A, Lepape A. Monitoring immune dysfunctions in the septic patient: a new skin for the old ceremony. *Mol Med*. 2008;14(1-2):64-78.
129. Venet F, Lukaszewicz AC, Payen D, Hotchkiss R, Monneret G. Monitoring the immune response in sepsis: a rational approach to administration of immunoadjuvant therapies. *Curr Opin Immunol*. 2013;25(4):477-83.
130. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Immunol*. 2013;In press.
131. Hotchkiss RS, Nicholson DW. Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(11):813-22.
132. Fialkow L, Fochesatto Filho L, Bozzetti MC, Milani AR, Rodrigues Filho EM, Ladniuk RM, et al. Neutrophil apoptosis: a marker of disease severity in sepsis and sepsis-induced acute respiratory distress syndrome. *Crit Care*. 2006;10(6):R155.
133. Sternberg EM. Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(4):318-28.
134. Carson WF, Cavassani KA, Dou Y, Kunkel SL. Epigenetic regulation of immune cell functions during post-septic immunosuppression. *Epigenetics*. 2011;6(3):273-83.
135. Drifte G, Dunn-Siegrist I, Tissieres P, Pugin J. Innate immune functions of immature neutrophils in patients with sepsis and severe systemic inflammatory response syndrome*. *Crit Care Med*. 2013;41(3):820-32.
136. Chishti AD, Shenton BK, Kirby JA, Baudouin SV. Neutrophil chemotaxis and receptor expression in clinical septic shock. *Intensive Care Med*. 2004;30(4):605-11.
137. Martins PS, Brunialti MK, Martos LS, Machado FR, Assuncao MS, Blecher S, et al. Expression of cell surface receptors and oxidative metabolism modulation in the clinical continuum of sepsis. *Crit Care*. 2008;12(1):R25.
138. Martins PS, Kallas EG, Neto MC, Dalboni MA, Blecher S, Salomao R. Upregulation of reactive oxygen species generation and phagocytosis, and increased apoptosis in human neutrophils during severe sepsis and septic shock. *Shock*. 2003;20(3):208-12.
139. Brown KA, Brain SD, Pearson JD, Edgeworth JD, Lewis SM, Treacher DF. Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *Lancet*. 2006;368(9530):157-69.
140. Kamp VM, Pillay J, Lammers JW, Pickkers P, Ulfman LH, Koenderman L. Human suppressive neutrophils CD16^{bright}/CD62L^{dim} exhibit decreased adhesion. *J Leukoc Biol*. 2012;92(5):1011-20.

141. Monneret G, Lepape A, Voirin N, Bohe J, Venet F, Debard AL, et al. Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive Care Med.* 2006;32(8):1175-83.
142. Sfeir T, Saha DC, Astiz M, Rackow EC. Role of interleukin-10 in monocyte hyporesponsiveness associated with septic shock. *Crit Care Med.* 2001;29(1):129-33.
143. Muenzer JT, Davis CG, Chang K, Schmidt RE, Dunne WM, Coopersmith CM, et al. Characterization and modulation of the immunosuppressive phase of sepsis. *Infect Immun.* 2010;78(4):1582-92.
144. Guisset O, Dilhuydy MS, Thiebaut R, Lefevre J, Camou F, Sarrat A, et al. Decrease in circulating dendritic cells predicts fatal outcome in septic shock. *Intensive Care Med.* 2007;33(1):148-52.
145. Riccardi F, Della Porta MG, Rovati B, Casazza A, Radolovich D, De Amici M, et al. Flow cytometric analysis of peripheral blood dendritic cells in patients with severe sepsis. *Cytometry B Clin Cytom.* 2011;80(1):14-21.
146. Weber GF, Maier SL, Zonnchen T, Breucha M, Seidlitz T, Kutschick I, et al. Analysis of circulating plasmacytoid dendritic cells during the course of sepsis. *Surgery.* 2015;158(1):248-54.
147. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Grayson MH, Osborne DF, Wagner TH, et al. Depletion of dendritic cells, but not macrophages, in patients with sepsis. *J Immunol.* 2002;168(5):2493-500.
148. Poehlmann H, Schefold JC, Zuckermann-Becker H, Volk HD, Meisel C. Phenotype changes and impaired function of dendritic cell subsets in patients with sepsis: a prospective observational analysis. *Crit Care.* 2009;13(4):R119.
149. Faivre V, Lukaszewicz AC, Alves A, Charron D, Payen D, Haziot A. Human monocytes differentiate into dendritic cells subsets that induce anergic and regulatory T cells in sepsis. *PLoS One.* 2012;7(10):e47209.
150. Forel JM, Chiche L, Thomas G, Mancini J, Farnarier C, Cognet C, et al. Phenotype and functions of natural killer cells in critically-ill septic patients. *PLoS One.* 2012;7(12):e50446.
151. Venet F, Davin F, Guignat C, Larue A, Cazalis MA, Darbon R, et al. Early Assessment of Leukocyte Alterations at Diagnosis of Septic Shock. *Shock.* 2010;34(4):358-63.
152. Hotchkiss RS, Osmon SB, Chang KC, Wagner TH, Coopersmith CM, Karl IE. Accelerated lymphocyte death in sepsis occurs by both the death receptor and mitochondrial pathways. *J Immunol.* 2005;174(8):5110-8.
153. Le Tulzo Y, Pangault C, Gacouin A, Guilloux V, Tribut O, Amiot L, et al. Early circulating lymphocyte apoptosis in human septic shock is associated with poor outcome. *Shock.* 2002;18(6):487-94.
154. Venet F, Filipe-Santos O, Lepape A, Malcus C, Poitevin-Later F, Grives A, et al. Decreased T cell repertoire diversity in sepsis: a preliminary study. *Crit Care Med.* 2013;41:111-9.
155. Monneret G, Debard AL, Venet F, Bohe J, Hequet O, Bienvenu J, et al. Marked elevation of human circulating CD4+CD25+ regulatory T cells in sepsis-induced immunoparalysis. *Crit Care Med.* 2003;31(7):2068-71.
156. Venet F, Chung CS, Monneret G, Huang X, Horner B, Garber M, et al. Regulatory T cell populations in sepsis and trauma. *J Leukoc Biol.* 2008;83(3):523-35.

157. Venet F, Pachot A, Debard AL, Bohe J, Bienvenu J, Lepape A, 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*. 2004;32(11):2329-31.
158. Venet F, Chung CS, 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;35(4):678-86.
159. Venet F, Pachot A, Debard AL, Bohe J, Bienvenu J, Lepape A, et al. Human CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes inhibit lipopolysaccharide-induced monocyte survival through a Fas/Fas ligand-dependent mechanism. *J Immunol*. 2006;177(9):6540-7.
160. Lewkowicz N, Klink M, Mycko MP, Lewkowicz P. Neutrophil - CD4(+)CD25(+) T regulatory cell interactions: A possible new mechanism of infectious tolerance. *Immunobiology*. 2012;218(4):455-64.
161. Lewkowicz P, Lewkowicz N, Sasiak A, Tchorzewski H. Lipopolysaccharide-activated CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit neutrophil function and promote their apoptosis and death. *J Immunol*. 2006;177(10):7155-63.
162. 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;135(2):153-60.
163. 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.
164. Pan T, Liu Z, Yin J, Zhou T, Liu J, Qu H. Notch Signaling Pathway Was Involved in Regulating Programmed Cell Death 1 Expression during Sepsis-Induced Immunosuppression. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:539841.
165. Meakins JL, Pietsch JB, Bubenick O, Kelly R, Rode H, Gordon J, et al. Delayed hypersensitivity: indicator of acquired failure of host defenses in sepsis and trauma. *Ann Surg*. 1977;186(3):241-50.
166. 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;306(23):2594-605.
167. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect Dis*. 2013;13(3):260-8.
168. Docke 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;3(6):678-81.
169. Nakos G, Malamou-Mitsi VD, Lachana A, Karassavoglou A, Kitsioulis E, Agnandi N, et al. Immunoparalysis in patients with severe trauma and the effect of inhaled interferon-gamma. *Crit Care Med*. 2002;30(7):1488-94.
170. Delsing CE, Gresnigt MS, Leentjens J, Preijers F, Frager FA, Kox M, et al. Interferon-gamma as adjunctive immunotherapy for invasive fungal infections: a case series. *BMC Infect Dis*. 2014;14:166.
171. Meisel C, Schefold JC, Pschowski R, Baumann T, Hetzger K, Gregor J, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to reverse sepsis-associated immunosuppression: a double-blind, randomized, placebo-controlled multicenter trial. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;180(7):640-8.

172. Hall MW, Knatz NL, Vetterly C, Tomarello S, Wewers MD, Volk HD, et al. Immunoparalysis and nosocomial infection in children with multiple organ dysfunction syndrome. *Intensive Care Med.* 2011;37(3):525-32.
173. Hutchins NA, Unsinger J, Hotchkiss RS, Ayala A. The new normal: immunomodulatory agents against sepsis immune suppression. *Trends Mol Med.* 2014;20(4):224-33.
174. Lundstrom W, Fewkes NM, Mackall CL. IL-7 in human health and disease. *Semin Immunol.* 2012;24(3):218-24.
175. Mackall CL, Fry TJ, Gress RE. Harnessing the biology of IL-7 for therapeutic application. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(5):330-42.
176. Unsinger J, Burnham CA, McDonough J, Morre M, Prakash PS, Caldwell CC, et al. Interleukin-7 ameliorates immune dysfunction and improves survival in a 2-hit model of fungal sepsis. *J Infect Dis.* 2012;206(4):606-16.
177. Unsinger J, Kazama H, McDonough JS, Griffith TS, Hotchkiss RS, Ferguson TA. Sepsis-induced apoptosis leads to active suppression of delayed-type hypersensitivity by CD8⁺ regulatory T cells through a TRAIL-dependent mechanism. *J Immunol.* 2010;184(12):6766-72.
178. Venet F, Foray AP, Villars-Mechin A, Malcus C, Poitevin-Later F, Lepape A, et al. IL-7 restores lymphocyte functions in septic patients. *J Immunol.* 2012;189(10):5073-81.
179. Kasten KR, Prakash PS, Unsinger J, Goetzman HS, England LG, Cave CM, et al. Interleukin-7 (IL-7) treatment accelerates neutrophil recruitment through gamma delta T-cell IL-17 production in a murine model of sepsis. *Infect Immun.* 2010;78(11):4714-22.
180. Huang X, Venet F, Wang YL, Lepape A, Yuan Z, Chen Y, et al. PD-1 expression by macrophages plays a pathologic role in altering microbial clearance and the innate inflammatory response to sepsis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(15):6303-8.
181. Zhang Y, Zhou Y, Lou J, Li J, Bo L, Zhu K, et al. PD-L1 blockade improves survival in experimental sepsis by inhibiting lymphocyte apoptosis and reversing monocyte dysfunction. *Crit Care.* 2010;14(6):R220.
182. Chang KC, Burnham CA, Compton SM, Rasche DP, Mazuski R, McDonough 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;17(3):R85.
183. Singh A, Mohan A, Dey AB, Mitra DK. Inhibiting the programmed death 1 pathway rescues Mycobacterium tuberculosis-specific interferon gamma-producing T cells from apoptosis in patients with pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis.* 2013;208(4):603-15.
184. Rasi G, DiVirgilio D, Mutchnick MG, Colella F, Sinibaldi-Vallebona P, Pierimarchi P, et al. Combination thymosin alpha 1 and lymphoblastoid interferon treatment in chronic hepatitis C. *Gut.* 1996;39(5):679-83.
185. Rasi G, Mutchnick MG, Di Virgilio D, Sinibaldi-Vallebona P, Pierimarchi P, Colella F, et al. Combination low-dose lymphoblastoid interferon and thymosin alpha 1 therapy in the treatment of chronic hepatitis B. *J Viral Hepat.* 1996;3(4):191-6.
186. Garaci E, Favalli C, Pica F, Sinibaldi Vallebona P, Palamara AT, Matteucci C, et al. Thymosin alpha 1: from bench to bedside. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1112:225-34.
187. Garaci E, Rocchi G, Perroni L, D'Agostini C, Soscia F, Grelli S, et al. Combination treatment with zidovudine, thymosin alpha 1 and interferon-alpha in human immunodeficiency virus infection. *Int J Clin Lab Res.* 1994;24(1):23-8.

188. Payen D, Monneret G, Hotchkiss R. Immunotherapy - a potential new way forward in the treatment of sepsis. *Crit Care*. 2013;17(1):118.
189. Serafino A, Pierimarchi P, Pica F, Andreola F, Gaziano R, Moroni N, et al. Thymosin alpha1 as a stimulatory agent of innate cell-mediated immune response. *Ann N Y Acad Sci*. 2012;1270:13-20.
190. Wu J, Zhou L, Liu J, Ma G, Kou Q, He Z, et al. The efficacy of thymosin alpha 1 for severe sepsis (ETASS): a multicenter, single-blind, randomized and controlled trial. *Crit Care*. 2013;17(1):R8.
191. Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*. 2010;33(5):657-70.
192. Pillay J, den Braber I, Vrisekoop N, Kwast LM, de Boer RJ, Borghans JA, et al. In vivo labeling with ²H₂O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood*. 2010;116(4):625-7.
193. Li KW, Turner SM, Emson CL, Hellerstein MK, Dale DC. Deuterium and neutrophil kinetics. *Blood*. 2011;117(22):6052-3; author reply 3-4.
194. Tofts PS, Chevassut T, Cutajar M, Dowell NG, Peters AM. Doubts concerning the recently reported human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood*. 2011;117(22):6050-2; author reply 3-4.
195. Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM, Chilvers ER. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol*. 2010;31(8):318-24.
196. Colotta F, Re F, Polentarutti N, Sozzani S, Mantovani A. Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood*. 1992;80(8):2012-20.
197. Kruger P, Saffarzadeh M, Weber AN, Rieber N, Radsak M, von Bernuth H, et al. Neutrophils: Between host defence, immune modulation, and tissue injury. *PLoS Pathog*. 2015;11(3):e1004651.
198. Tak T, Tesselaar K, Pillay J, Borghans JA, Koenderman L. What's your age again? Determination of human neutrophil half-lives revisited. *J Leukoc Biol*. 2013;94(4):595-601.
199. Segal AW. How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:197-223.
200. Donadieu J, Fenneteau O, Beaupain B, Mahlaoui N, Chantelot CB. Congenital neutropenia: diagnosis, molecular bases and patient management. *Orphanet J Rare Dis*. 2011;6:26.
201. Segal BH, Leto TL, Gallin JI, Malech HL, Holland SM. Genetic, biochemical, and clinical features of chronic granulomatous disease. *Medicine (Baltimore)*. 2000;79(3):170-200.
202. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(9):678-89.
203. McEver RP, Cummings RD. Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J Clin Invest*. 1997;100(11 Suppl):S97-103.
204. Yago T, Shao B, Miner JJ, Yao L, Klopocki AG, Maeda K, et al. E-selectin engages PSGL-1 and CD44 through a common signaling pathway to induce integrin alphaLbeta2-mediated slow leukocyte rolling. *Blood*. 2010;116(3):485-94.
205. Carman CV, Springer TA. Integrin avidity regulation: are changes in affinity and conformation underemphasized? *Curr Opin Cell Biol*. 2003;15(5):547-56.
206. Bazzoni G, Hemler ME. Are changes in integrin affinity and conformation overemphasized? *Trends Biochem Sci*. 1998;23(1):30-4.
207. Laudanna C, Kim JY, Constantin G, Butcher E. Rapid leukocyte integrin activation by chemokines. *Immunol Rev*. 2002;186:37-46.

208. Constantin G, Majeed M, Giagulli C, Piccio L, Kim JY, Butcher EC, et al. Chemokines trigger immediate beta2 integrin affinity and mobility changes: differential regulation and roles in lymphocyte arrest under flow. *Immunity*. 2000;13(6):759-69.
209. Stillie R, Farooq SM, Gordon JR, Stadnyk AW. The functional significance behind expressing two IL-8 receptor types on PMN. *J Leukoc Biol*. 2009;86(3):529-43.
210. Kinashi T. Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(7):546-59.
211. Phillipson M, Heit B, Colarusso P, Liu L, Ballantyne CM, Kubes P. Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *J Exp Med*. 2006;203(12):2569-75.
212. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(3):159-75.
213. Burns AR, Bowden RA, MacDonell SD, Walker DC, Odebunmi TO, Donnachie EM, et al. Analysis of tight junctions during neutrophil transendothelial migration. *J Cell Sci*. 2000;113 (Pt 1):45-57.
214. Phillipson M, Kaur J, Colarusso P, Ballantyne CM, Kubes P. Endothelial domes encapsulate adherent neutrophils and minimize increases in vascular permeability in paracellular and transcellular emigration. *PLoS One*. 2008;3(2):e1649.
215. Barreiro O, Yanez-Mo M, Serrador JM, Montoya MC, Vicente-Manzanares M, Tejedor R, et al. Dynamic interaction of VCAM-1 and ICAM-1 with moesin and ezrin in a novel endothelial docking structure for adherent leukocytes. *J Cell Biol*. 2002;157(7):1233-45.
216. Wang S, Voisin MB, Larbi KY, Dangerfield J, Scheiermann C, Tran M, et al. Venular basement membranes contain specific matrix protein low expression regions that act as exit points for emigrating neutrophils. *J Exp Med*. 2006;203(6):1519-32.
217. Kuckleburg CJ, Tilkens SB, Santoso S, Newman PJ. Proteinase 3 contributes to transendothelial migration of NB1-positive neutrophils. *J Immunol*. 2012;188(5):2419-26.
218. Buckley CD, Ross EA, McGettrick HM, Osborne CE, Haworth O, Schmutz C, et al. Identification of a phenotypically and functionally distinct population of long-lived neutrophils in a model of reverse endothelial migration. *J Leukoc Biol*. 2006;79(2):303-11.
219. Mathias JR, Perrin BJ, Liu TX, Kanki J, Look AT, Huttenlocher A. Resolution of inflammation by retrograde chemotaxis of neutrophils in transgenic zebrafish. *J Leukoc Biol*. 2006;80(6):1281-8.
220. Woodfin A, Voisin MB, Beyrau M, Colom B, Caille D, Diapouli FM, et al. The junctional adhesion molecule JAM-C regulates polarized transendothelial migration of neutrophils in vivo. *Nat Immunol*. 2011;12(8):761-9.
221. Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest*. 2000;80(5):617-53.
222. Greenberg S, Chang P, Wang DC, Xavier R, Seed B. Clustered syk tyrosine kinase domains trigger phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(3):1103-7.
223. Borregaard N, Cowland JB. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*. 1997;89(10):3503-21.
224. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004;303(5663):1532-5.

225. Wang Y, Wysocka J, Sayegh J, Lee YH, Perlin JR, Leonelli L, et al. Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethylation. *Science*. 2004;306(5694):279-83.
226. Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*. 2010;191(3):677-91.
227. Keshari RS, Jyoti A, Dubey M, Kothari N, Kohli M, Bogra J, et al. Cytokines induced neutrophil extracellular traps formation: implication for the inflammatory disease condition. *PLoS One*. 7(10):e48111.
228. Kaplan MJ, Radic M. Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. *J Immunol*. 2012;189(6):2689-95.
229. Hakkim A, Furnrohr BG, Amann K, Laube B, Abed UA, Brinkmann V, et al. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(21):9813-8.
230. Yipp BG, Petri B, Salina D, Jenne CN, Scott BN, Zbytnuik LD, et al. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat Med*. 2012;18(9):1386-93.
231. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(3):173-82.
232. Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(5):349-61.
233. Schwab JM, Chiang N, Arita M, Serhan CN. Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. *Nature*. 2007;447(7146):869-74.
234. Spite M, Norling LV, Summers L, Yang R, Cooper D, Petasis NA, et al. Resolvin D2 is a potent regulator of leukocytes and controls microbial sepsis. *Nature*. 2009;461(7268):1287-91.
235. McKimmie CS, Fraser AR, Hansell C, Gutierrez L, Philipsen S, Connell L, et al. Hemopoietic cell expression of the chemokine decoy receptor D6 is dynamic and regulated by GATA1. *J Immunol*. 2008;181(11):8171-81.
236. Ariel A, Fredman G, Sun YP, Kantarci A, Van Dyke TE, Luster AD, et al. Apoptotic neutrophils and T cells sequester chemokines during immune response resolution through modulation of CCR5 expression. *Nat Immunol*. 2006;7(11):1209-16.
237. Bazzoni F, Tamassia N, Rossato M, Cassatella MA. Understanding the molecular mechanisms of the multifaceted IL-10-mediated anti-inflammatory response: lessons from neutrophils. *Eur J Immunol*. 2010;40(9):2360-8.
238. Fox S, Leitch AE, Duffin R, Haslett C, Rossi AG. Neutrophil apoptosis: relevance to the innate immune response and inflammatory disease. *J Innate Immun*. 2010;2(3):216-27.
239. Meyer-Hoffert U, Wiedow O. Neutrophil serine proteases: mediators of innate immune responses. *Curr Opin Hematol*. 2011;18(1):19-24.
240. Scapini P, Lapinet-Vera JA, Gasperini S, Calzetti F, Bazzoni F, Cassatella MA. The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol Rev*. 2000;177:195-203.
241. Soehnlein O, Zernecke A, Eriksson EE, Rothfuchs AG, Pham CT, Herwald H, et al. Neutrophil secretion products pave the way for inflammatory monocytes. *Blood*. 2008;112(4):1461-71.
242. Soehnlein O, Weber C, Lindbom L. Neutrophil granule proteins tune monocytic cell function. *Trends Immunol*. 2009;30(11):538-46.

243. Bennouna S, Bliss SK, Curiel TJ, Denkers EY. Cross-talk in the innate immune system: neutrophils instruct recruitment and activation of dendritic cells during microbial infection. *J Immunol.* 2003;171(11):6052-8.
244. Eken C, Gasser O, Zenhausem G, Oehri I, Hess C, Schifferli JA. Polymorphonuclear neutrophil-derived ectosomes interfere with the maturation of monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol.* 2008;180(2):817-24.
245. Costantini C, Cassatella MA. The defensive alliance between neutrophils and NK cells as a novel arm of innate immunity. *J Leukoc Biol.* 2011;89(2):221-33.
246. Oberlies J, Watzl C, Giese T, Luckner C, Kropf P, Muller I, et al. Regulation of NK cell function by human granulocyte arginase. *J Immunol.* 2009;182(9):5259-67.
247. Lindemann RA, Lala A, Miyasaki KT. The in vitro effect of human polymorphonuclear leukocyte azurophil granule components on natural killer cell cytotoxicity. *Oral Microbiol Immunol.* 1994;9(3):186-92.
248. Shau H, Kim A, Golub SH. Modulation of natural killer and lymphokine-activated killer cell cytotoxicity by lactoferrin. *J Leukoc Biol.* 1992;51(4):343-9.
249. Paczesniak J, Tchorzewski H. The effect of polymorphonuclear leucocyte (PMNL) factor on human natural killer (NK) cell activity in vitro. *Acta Physiol Pol.* 1983;34(2):213-26.
250. Mellqvist UH, Hansson M, Brune M, Dahlgren C, Hermodsson S, Hellstrand K. Natural killer cell dysfunction and apoptosis induced by chronic myelogenous leukemia cells: role of reactive oxygen species and regulation by histamine. *Blood.* 2000;96(5):1961-8.
251. Seaman WE, Gindhart TD, Blackman MA, Dalal B, Talal N, Werb Z. Suppression of natural killing in vitro by monocytes and polymorphonuclear leukocytes: requirement for reactive metabolites of oxygen. *J Clin Invest.* 1982;69(4):876-88.
252. el-Hag A, Clark RA. Immunosuppression by activated human neutrophils. Dependence on the myeloperoxidase system. *J Immunol.* 1987;139(7):2406-13.
253. Dallegri F, Patrone F, Frumento G, Ballestrero A, Sacchetti C. Down-regulation of K cell activity by neutrophils. *Blood.* 1985;65(3):571-7.
254. Costantini C, Micheletti A, Calzetti F, Perbellini O, Pizzolo G, Cassatella MA. Neutrophil activation and survival are modulated by interaction with NK cells. *Int Immunol.* 2010;22(10):827-38.
255. Bhatnagar N, Hong HS, Krishnaswamy JK, Haghikia A, Behrens GM, Schmidt RE, et al. Cytokine-activated NK cells inhibit PMN apoptosis and preserve their functional capacity. *Blood.* 2010;116(8):1308-16.
256. Muller I, Munder M, Kropf P, Hansch GM. Polymorphonuclear neutrophils and T lymphocytes: strange bedfellows or brothers in arms? *Trends Immunol.* 2009;30(11):522-30.
257. Beauvillain C, Delneste Y, Scotet M, Peres A, Gascan H, Guernonprez P, et al. Neutrophils efficiently cross-prime naive T cells in vivo. *Blood.* 2007;110(8):2965-73.
258. Gosselin EJ, Wardwell K, Rigby WF, Guyre PM. Induction of MHC class II on human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, IFN-gamma, and IL-3. *J Immunol.* 1993;151(3):1482-90.
259. Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(3):162-74.

260. Rodriguez PC, Quiceno DG, Ochoa AC. L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression. *Blood*. 2007;109(4):1568-73.
261. Makarenkova VP, Bansal V, Matta BM, Perez LA, Ochoa JB. CD11b+/Gr-1+ myeloid suppressor cells cause T cell dysfunction after traumatic stress. *J Immunol*. 2006;176(4):2085-94.
262. Kusmartsev S, Nefedova Y, Yoder D, Gabrilovich DI. Antigen-specific inhibition of CD8+ T cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species. *J Immunol*. 2004;172(2):989-99.
263. Cassatella MA. Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. *Adv Immunol*. 1999;73:369-509.
264. Hofman P. Molecular regulation of neutrophil apoptosis and potential targets for therapeutic strategy against the inflammatory process. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2004;3(1):1-9.
265. Kennedy AD, DeLeo FR. Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. *Immunol Res*. 2009;43(1-3):25-61.
266. Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. Cell death. *N Engl J Med*. 2009;361(16):1570-83.
267. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*. 1997;91(4):479-89.
268. Liles WC, Kiener PA, Ledbetter JA, Aruffo A, Klebanoff SJ. Differential expression of Fas (CD95) and Fas ligand on normal human phagocytes: implications for the regulation of apoptosis in neutrophils. *J Exp Med*. 1996;184(2):429-40.
269. van den Berg JM, Weyer S, Weening JJ, Roos D, Kuijpers TW. Divergent effects of tumor necrosis factor alpha on apoptosis of human neutrophils. *J Leukoc Biol*. 2001;69(3):467-73.
270. Maiani NA, Roos D, Kuijpers TW. Tumor necrosis factor alpha induces a caspase-independent death pathway in human neutrophils. *Blood*. 2003;101(5):1987-95.
271. Lum JJ, Bren G, McClure R, Badley AD. Elimination of senescent neutrophils by TNF-related apoptosis-inducing [corrected] ligand. *J Immunol*. 2005;175(2):1232-8.
272. Watson RW, O'Neill A, Brannigan AE, Coffey R, Marshall JC, Brady HR, et al. Regulation of Fas antibody induced neutrophil apoptosis is both caspase and mitochondrial dependent. *FEBS Lett*. 1999;453(1-2):67-71.
273. Dibbert B, Weber M, Nikolaizik WH, Vogt P, Schoni MH, Blaser K, et al. Cytokine-mediated Bax deficiency and consequent delayed neutrophil apoptosis: a general mechanism to accumulate effector cells in inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(23):13330-5.
274. Cox G. IL-10 enhances resolution of pulmonary inflammation in vivo by promoting apoptosis of neutrophils. *Am J Physiol*. 1996;271(4 Pt 1):L566-71.
275. Fadok VA, Savill JS, Haslett C, Bratton DL, Doherty DE, Campbell PA, et al. Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. *J Immunol*. 1992;149(12):4029-35.
276. Mevorach D, Mascarenhas JO, Gershov D, Elkon KB. Complement-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages. *J Exp Med*. 1998;188(12):2313-20.

277. Hart SP, Dougherty GJ, Haslett C, Dransfield I. CD44 regulates phagocytosis of apoptotic neutrophil granulocytes, but not apoptotic lymphocytes, by human macrophages. *J Immunol.* 1997;159(2):919-25.
278. Dale DC, Person RE, Bolyard AA, Aprikyan AG, Bos C, Bonilla MA, et al. Mutations in the gene encoding neutrophil elastase in congenital and cyclic neutropenia. *Blood.* 2000;96(7):2317-22.
279. Person RE, Li FQ, Duan Z, Benson KF, Wechsler J, Papadaki HA, et al. Mutations in proto-oncogene GFI1 cause human neutropenia and target ELA2. *Nat Genet.* 2003;34(3):308-12.
280. Klein C, Grudzien M, Appaswamy G, Germeshausen M, Sandrock I, Schaffer AA, et al. HAX1 deficiency causes autosomal recessive severe congenital neutropenia (Kostmann disease). *Nat Genet.* 2007;39(1):86-92.
281. Devriendt K, Kim AS, Mathijs G, Frints SG, Schwartz M, Van Den Oord JJ, et al. Constitutively activating mutation in WASP causes X-linked severe congenital neutropenia. *Nat Genet.* 2001;27(3):313-7.
282. van den Berg JM, van Koppen E, Ahlin A, Belohradsky BH, Bernatowska E, Corbeel L, et al. Chronic granulomatous disease: the European experience. *PLoS One.* 2009;4(4):e5234.
283. Koker MY, Camcioglu Y, van Leeuwen K, Kilic SS, Barlan I, Yilmaz M, et al. Clinical, functional, and genetic characterization of chronic granulomatous disease in 89 Turkish patients. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;132(5):1156-63 e5.
284. de Luca A, Smeekens SP, Casagrande A, Iannitti R, Conway KL, Gresnigt MS, et al. IL-1 receptor blockade restores autophagy and reduces inflammation in chronic granulomatous disease in mice and in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(9):3526-31.
285. Harris ES, Weyrich AS, Zimmerman GA. Lessons from rare maladies: leukocyte adhesion deficiency syndromes. *Curr Opin Hematol.* 2013;20(1):16-25.
286. Mathew EC, Shaw JM, Bonilla FA, Law SK, Wright DA. A novel point mutation in CD18 causing the expression of dysfunctional CD11/CD18 leucocyte integrins in a patient with leucocyte adhesion deficiency (LAD). *Clin Exp Immunol.* 2000;121(1):133-8.
287. Luhn K, Wild MK, Eckhardt M, Gerardy-Schahn R, Vestweber D. The gene defective in leukocyte adhesion deficiency II encodes a putative GDP-fucose transporter. *Nat Genet.* 2001;28(1):69-72.
288. Kuijpers TW, Van Lier RA, Hamann D, de Boer M, Thung LY, Weening RS, et al. Leukocyte adhesion deficiency type 1 (LAD-1)/variant. A novel immunodeficiency syndrome characterized by dysfunctional beta2 integrins. *J Clin Invest.* 1997;100(7):1725-33.
289. Gulino AV, Moratto D, Sozzani S, Cavadini P, Otero K, Tassone L, et al. Altered leukocyte response to CXCL12 in patients with warts hypogammaglobulinemia, infections, myelokathexis (WHIM) syndrome. *Blood.* 2004;104(2):444-52.
290. Gombart AF, Shiohara M, Kwok SH, Agematsu K, Komiyama A, Koeffler HP. Neutrophil-specific granule deficiency: homozygous recessive inheritance of a frameshift mutation in the gene encoding transcription factor CCAAT/enhancer binding protein--epsilon. *Blood.* 2001;97(9):2561-7.
291. Klebanoff SJ, Kettle AJ, Rosen H, Winterbourn CC, Nauseef WM. Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. *J Leukoc Biol.* 2013;93(2):185-98.
292. Abraham E. Neutrophils and acute lung injury. *Crit Care Med.* 2003;31(4 Suppl):S195-9.

293. Grommes J, Soehnlein O. Contribution of neutrophils to acute lung injury. *Mol Med*. 2011;17(3-4):293-307.
294. Steinberg KP, Milberg JA, Martin TR, Maunder RJ, Cockrill BA, Hudson LD. Evolution of bronchoalveolar cell populations in the adult respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994;150(1):113-22.
295. Serhan CN. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature*. 2014;510(7503):92-101.
296. Snelgrove RJ, Jackson PL, Hardison MT, Noerager BD, Kinloch A, Gaggar A, et al. A critical role for LTA4H in limiting chronic pulmonary neutrophilic inflammation. *Science*. 2010;330(6000):90-4.
297. Segal BH, Han W, Bushey JJ, Joo M, Bhatti Z, Feminella J, et al. NADPH oxidase limits innate immune responses in the lungs in mice. *PLoS One*. 2010;5(3):e9631.
298. Davidson BA, Vethanayagam RR, Grimm MJ, Mullan BA, Raghavendran K, Blackwell TS, et al. NADPH oxidase and Nrf2 regulate gastric aspiration-induced inflammation and acute lung injury. *J Immunol*. 2013;190(4):1714-24.
299. Chen M, Lam BK, Kanaoka Y, Nigrovic PA, Audoly LP, Austen KF, et al. Neutrophil-derived leukotriene B4 is required for inflammatory arthritis. *J Exp Med*. 2006;203(4):837-42.
300. Kim ND, Chou RC, Seung E, Tager AM, Luster AD. A unique requirement for the leukotriene B4 receptor BLT1 for neutrophil recruitment in inflammatory arthritis. *J Exp Med*. 2006;203(4):829-35.
301. Brouwer E, Huitema MG, Mulder AH, Heeringa P, van Goor H, Tervaert JW, et al. Neutrophil activation in vitro and in vivo in Wegener's granulomatosis. *Kidney Int*. 1994;45(4):1120-31.
302. Bennett L, Palucka AK, Arce E, Cantrell V, Borvak J, Banchereau J, et al. Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *J Exp Med*. 2003;197(6):711-23.
303. Yasutomo K, Horiuchi T, Kagami S, Tsukamoto H, Hashimura C, Urushihara M, et al. Mutation of DNASE1 in people with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet*. 2001;28(4):313-4.
304. Kuang DM, Zhao Q, Wu Y, Peng C, Wang J, Xu Z, et al. Peritumoral neutrophils link inflammatory response to disease progression by fostering angiogenesis in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2011;54(5):948-55.
305. Wislez M, Rabbe N, Marchal J, Milleron B, Crestani B, Mayaud C, et al. Hepatocyte growth factor production by neutrophils infiltrating bronchioloalveolar subtype pulmonary adenocarcinoma: role in tumor progression and death. *Cancer Res*. 2003;63(6):1405-12.
306. Charles KA, Kulbe H, Soper R, Escorcio-Correia M, Lawrence T, Schultheis A, et al. The tumor-promoting actions of TNF-alpha involve TNFR1 and IL-17 in ovarian cancer in mice and humans. *J Clin Invest*. 2009;119(10):3011-23.
307. Keeley EC, Mehrad B, Strieter RM. CXC chemokines in cancer angiogenesis and metastases. *Adv Cancer Res*. 2010;106:91-111.
308. Scapini P, Morini M, Tecchio C, Minghelli S, Di Carlo E, Tanghetti E, et al. CXCL1/macrophage inflammatory protein-2-induced angiogenesis in vivo is mediated by neutrophil-derived vascular endothelial growth factor-A. *J Immunol*. 2004;172(8):5034-40.
309. Ostrand-Rosenberg S, Sinha P. Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *J Immunol*. 2009;182(8):4499-506.

310. Almand B, Clark JI, Nikitina E, van Beynen J, English NR, Knight SC, et al. Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *J Immunol*. 2001;166(1):678-89.
311. Brandau S, Trellakis S, Bruderek K, Schmaltz D, Steller G, Elian M, et al. Myeloid-derived suppressor cells in the peripheral blood of cancer patients contain a subset of immature neutrophils with impaired migratory properties. *J Leukoc Biol*. 2011;89(2):311-7.
312. Kusmartsev S, Cheng F, Yu B, Nefedova Y, Sotomayor E, Lush R, et al. All-trans-retinoic acid eliminates immature myeloid cells from tumor-bearing mice and improves the effect of vaccination. *Cancer Res*. 2003;63(15):4441-9.
313. Kovach MA, Standiford TJ. The function of neutrophils in sepsis. *Curr Opin Infect Dis*. 2012;25(3):321-7.
314. Cavallazzi R, Bennin CL, Hirani A, Gilbert C, Marik PE. Is the band count useful in the diagnosis of infection? An accuracy study in critically ill patients. *J Intensive Care Med*. 2010;25(6):353-7.
315. Mare TA, Treacher DF, Shankar-Hari M, Beale R, Lewis SM, Chambers DJ, et al. The diagnostic and prognostic significance of monitoring blood levels of immature neutrophils in patients with systemic inflammation. *Crit Care*. 2015;19:57.
316. Ha SO, Park SH, Park SH, Park JS, Huh JW, Lim CM, et al. Fraction of immature granulocytes reflects severity but not mortality in sepsis. *Scand J Clin Lab Invest*. 2015;75(1):36-43.
317. Nierhaus A, Klatte S, Linssen J, Eismann NM, Wichmann D, Hedke J, et al. Revisiting the white blood cell count: immature granulocytes count as a diagnostic marker to discriminate between SIRS and sepsis--a prospective, observational study. *BMC Immunol*. 2013;14:8.
318. van der Geest PJ, Mohseni M, Brouwer R, van der Hoven B, Steyerberg EW, Groeneveld AB. Immature granulocytes predict microbial infection and its adverse sequelae in the intensive care unit. *J Crit Care*. 2014;29(4):523-7.
319. Seok Y, Choi JR, Kim J, Kim YK, Lee J, Song J, et al. Delta neutrophil index: a promising diagnostic and prognostic marker for sepsis. *Shock*. 2012;37(3):242-6.
320. Nahm CH, Choi JW, Lee J. Delta neutrophil index in automated immature granulocyte counts for assessing disease severity of patients with sepsis. *Ann Clin Lab Sci*. 2008;38(3):241-6.
321. Bermejo-Martin JF, Tamayo E, Ruiz G, Andaluz-Ojeda D, Herran-Monge R, Muriel-Bombin A, et al. Circulating neutrophil counts and mortality in septic shock. *Crit Care*. 2014;18(1):407.
322. Azab B, Bhatt VR, Phookan J, Murukutla S, Kohn N, Terjanian T, et al. Usefulness of the neutrophil-to-lymphocyte ratio in predicting short- and long-term mortality in breast cancer patients. *Ann Surg Oncol*. 2012;19(1):217-24.
323. Cho H, Hur HW, Kim SW, Kim SH, Kim JH, Kim YT, et al. Pre-treatment neutrophil to lymphocyte ratio is elevated in epithelial ovarian cancer and predicts survival after treatment. *Cancer Immunol Immunother*. 2009;58(1):15-23.
324. Sarraf KM, Belcher E, Raevsky E, Nicholson AG, Goldstraw P, Lim E. Neutrophil/lymphocyte ratio and its association with survival after complete resection in non-small cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2009;137(2):425-8.
325. Walsh SR, Cook EJ, Goulder F, Justin TA, Keeling NJ. Neutrophil-lymphocyte ratio as a prognostic factor in colorectal cancer. *J Surg Oncol*. 2005;91(3):181-4.

326. Zahorec R. Ratio of neutrophil to lymphocyte counts--rapid and simple parameter of systemic inflammation and stress in critically ill. *Bratisl Lek Listy*. 2001;102(1):5-14.
327. Saliccioli JD, Marshall DC, Pimentel MA, Santos MD, Pollard T, Celi LA, et al. The association between the neutrophil-to-lymphocyte ratio and mortality in critical illness: an observational cohort study. *Crit Care*. 2015;19:13.
328. Riche F, Gayat E, Barthelemy R, Le Dorze M, Mateo J, Payen D. Reversal of neutrophil-to-lymphocyte count ratio in early versus late death from septic shock. *Crit Care*. 2015;19:439.
329. Hoffmann JJ. Neutrophil CD64: a diagnostic marker for infection and sepsis. *Clin Chem Lab Med*. 2009;47(8):903-16.
330. Muller Kobold AC, Tulleken JE, Zijlstra JG, Sluiter W, Hermans J, Kallenberg CG, et al. Leukocyte activation in sepsis; correlations with disease state and mortality. *Intensive Care Med*. 2000;26(7):883-92.
331. Groselj-Grenc M, Ihan A, Derganc M. Neutrophil and monocyte CD64 and CD163 expression in critically ill neonates and children with sepsis: comparison of fluorescence intensities and calculated indexes. *Mediators Inflamm*. 2008;2008:202646.
332. Bhandari V. Effective Biomarkers for Diagnosis of Neonatal Sepsis. *J Pediatric Infect Dis Soc*. 2014;3(3):234-45.
333. Streimish I, Bizzarro M, Northrup V, Wang C, Renna S, Koval N, et al. Neutrophil CD64 with hematologic criteria for diagnosis of neonatal sepsis. *Am J Perinatol*. 2014;31(1):21-30.
334. Brach MA, deVos S, Gruss HJ, Herrmann F. Prolongation of survival of human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is caused by inhibition of programmed cell death. *Blood*. 1992;80(11):2920-4.
335. Cox G, Gauldie J, Jordana M. Bronchial epithelial cell-derived cytokines (G-CSF and GM-CSF) promote the survival of peripheral blood neutrophils in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1992;7(5):507-13.
336. Lee A, Whyte MK, Haslett C. Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators. *J Leukoc Biol*. 1993;54(4):283-8.
337. Pericle F, Liu JH, Diaz JI, Blanchard DK, Wei S, Forni G, et al. Interleukin-2 prevention of apoptosis in human neutrophils. *Eur J Immunol*. 1994;24(2):440-4.
338. Keel M, Ungethum U, Steckholzer U, Niederer E, Hartung T, Trentz O, et al. Interleukin-10 counterregulates proinflammatory cytokine-induced inhibition of neutrophil apoptosis during severe sepsis. *Blood*. 1997;90(9):3356-63.
339. Fotouhi-Ardakani N, Kebir DE, Pierre-Charles N, Wang L, Ahern SP, Filep JG, et al. Role for myeloid nuclear differentiation antigen in the regulation of neutrophil apoptosis during sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;182(3):341-50.
340. Milot E, Fotouhi-Ardakani N, Filep JG. Myeloid nuclear differentiation antigen, neutrophil apoptosis and sepsis. *Front Immunol*. 2012;3:397.
341. Harter L, Mica L, Stocker R, Trentz O, Keel M. Mcl-1 correlates with reduced apoptosis in neutrophils from patients with sepsis. *J Am Coll Surg*. 2003;197(6):964-73.
342. Tamayo E, Gomez E, Bustamante J, Gomez-Herreras JI, Fonteriz R, Bobillo F, et al. Evolution of neutrophil apoptosis in septic shock survivors and nonsurvivors. *J Crit Care*. 2011;27(4):415 e1-11.

343. Lefer DJ, Jones SP, Girod WG, Baines A, Grisham MB, Cockrell AS, et al. Leukocyte-endothelial cell interactions in nitric oxide synthase-deficient mice. *Am J Physiol.* 1999;276(6 Pt 2):H1943-50.
344. Cummings CJ, Martin TR, Frevert CW, Quan JM, Wong VA, Mongovin SM, et al. Expression and function of the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 in sepsis. *J Immunol.* 1999;162(4):2341-6.
345. Trevelin SC, Alves-Filho JC, Sonogo F, Turato W, Nascimento DC, Souto FO, et al. Toll-like receptor 9 activation in neutrophils impairs chemotaxis and reduces sepsis outcome. *Crit Care Med.* 2012;40(9):2631-7.
346. Alves-Filho JC, Sonogo F, Souto FO, Freitas A, Verri WA, Jr., Auxiliadora-Martins M, et al. Interleukin-33 attenuates sepsis by enhancing neutrophil influx to the site of infection. *Nat Med.* 2010;16(6):708-12.
347. Lu X, Lv C, Qu Y, Luo Y, Lin B, Zhan L, et al. Sepsis-induced impairment of neutrophil chemotaxis on a microfluidic chip. *Immunol Lett.* 2016;173:55-60.
348. Steinhoff M, Buddenkotte J, Shpacovitch V, Rattenholl A, Moormann C, Vergnolle N, et al. Proteinase-activated receptors: transducers of proteinase-mediated signaling in inflammation and immune response. *Endocr Rev.* 2005;26(1):1-43.
349. Reddy RC, Narala VR, Keshamouni VG, Milam JE, Newstead MW, Standiford TJ. Sepsis-induced inhibition of neutrophil chemotaxis is mediated by activation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *Blood.* 2008;112(10):4250-8.
350. Drost EM, Kassabian G, Meiselman HJ, Gelmont D, Fisher TC. Increased rigidity and priming of polymorphonuclear leukocytes in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;159(6):1696-702.
351. Skoutelis AT, Kaleridis V, Athanassiou GM, Kokkinis KI, Missirlis YF, Bassaris HP. Neutrophil deformability in patients with sepsis, septic shock, and adult respiratory distress syndrome. *Crit Care Med.* 2000;28(7):2355-9.
352. Tavares-Murta BM, Zaparoli M, Ferreira RB, Silva-Vergara ML, Oliveira CH, Murta EF, et al. Failure of neutrophil chemotactic function in septic patients. *Crit Care Med.* 2002;30(5):1056-61.
353. Stephan F, Yang K, Tankovic J, Soussy CJ, Dhonneur G, Duvaldestin P, et al. Impairment of polymorphonuclear neutrophil functions precedes nosocomial infections in critically ill patients. *Crit Care Med.* 2002;30(2):315-22.
354. Taneja R, Sharma AP, Hallett MB, Findlay GP, Morris MR. Immature circulating neutrophils in sepsis have impaired phagocytosis and calcium signaling. *Shock.* 2008;30(6):618-22.
355. Morris AC, Brittan M, Wilkinson TS, McAuley DF, Antonelli J, McCulloch C, et al. C5a-mediated neutrophil dysfunction is RhoA-dependent and predicts infection in critically ill patients. *Blood.* 2011;117(19):5178-88.
356. Bae MH, Park SH, Park CJ, Cho EJ, Lee BR, Kim YJ, et al. Flow cytometric measurement of respiratory burst activity and surface expression of neutrophils for septic patient prognosis. *Cytometry B Clin Cytom.* 2015.
357. Santos SS, Brunialti MK, Rigato O, Machado FR, Silva E, Salomao R. Generation of nitric oxide and reactive oxygen species by neutrophils and monocytes from septic patients and association with outcomes. *Shock.* 2012;38(1):18-23.
358. Camicia G, Pozner R, de Larranaga G. Neutrophil extracellular traps in sepsis. *Shock.* 2014;42(4):286-94.

359. Gupta AK, Joshi MB, Philippova M, Erne P, Hasler P, Hahn S, et al. Activated endothelial cells induce neutrophil extracellular traps and are susceptible to NETosis-mediated cell death. *FEBS Lett.* 2010;584(14):3193-7.
360. Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med.* 2007;13(4):463-9.
361. Hamaguchi S, Akeda Y, Yamamoto N, Seki M, Yamamoto K, Oishi K, et al. Origin of Circulating Free DNA in Sepsis: Analysis of the CLP Mouse Model. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:614518.
362. Xu J, Zhang X, Pelayo R, Monestier M, Ammollo CT, Semeraro F, et al. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat Med.* 2009;15(11):1318-21.
363. Czaikoski PG, Mota JM, Nascimento DC, Sonogo F, Castanheira FV, Melo PH, et al. Neutrophil Extracellular Traps Induce Organ Damage during Experimental and Clinical Sepsis. *PLoS One.* 2016;11(2):e0148142.
364. Hashiba M, Huq A, Tomino A, Hirakawa A, Hattori T, Miyabe H, et al. Neutrophil extracellular traps in patients with sepsis. *J Surg Res.* 2015;194(1):248-54.
365. Meng W, Paunel-Gorgulu A, Flohe S, Hoffmann A, Witte I, Mackenzie C, et al. Depletion of neutrophil extracellular traps in vivo results in hypersusceptibility to polymicrobial sepsis in mice. *Crit Care.* 2012;16(4):R137.
366. Kamp VM, Leentjens J, Pillay J, Langereis JD, de Kleijn S, Kox M, et al. Modulation of granulocyte kinetics by GM-CSF/IFN-gamma in a human LPS rechallenger model. *J Leukoc Biol.* 2013;94(3):513-20.
367. de Kleijn S, Langereis JD, Leentjens J, Kox M, Netea MG, Koenderman L, et al. IFN-gamma-stimulated neutrophils suppress lymphocyte proliferation through expression of PD-L1. *PLoS One.* 2013;8(8):e72249.
368. Saison J, Demaret J, Venet F, Chidiac C, Malcus C, Poitevin-Later F, et al. CD4+CD25+CD127- assessment as a surrogate phenotype for FOXP3+ regulatory T cells in HIV-1 infected viremic and aviremic subjects. *Cytometry B Clin Cytom.* 2012.
369. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(7):490-500.
370. Demaret J, Saison J, Venet F, Malcus C, Poitevin-Later F, Lepape A, et al. Assessment of a novel flow cytometry technique of one-step intracellular staining: example of FOXP3 in clinical samples. *Cytometry B Clin Cytom.* 2013;84(3):187-93.
371. Perez OD, Nolan GP. Phospho-proteomic immune analysis by flow cytometry: from mechanism to translational medicine at the single-cell level. *Immunol Rev.* 2006;210:208-28.
372. Dupont G, Demaret J, Venet F, Malergue F, Malcus C, Poitevin-Later F, et al. Comparative dose-responses of recombinant human IL-2 and IL-7 on STAT5 phosphorylation in CD4+FOXP3- cells versus regulatory T cells: a whole blood perspective. *Cytokine.* 2014;69(1):146-9.
373. Demaret J, Dupont G, Venet F, Friggeri A, Lepape A, Rimmelé T, et al. STAT5 phosphorylation in T cell subsets from septic patients in response to recombinant human interleukin-7: a pilot study. *J Leukoc Biol.* 2015;97(4):791-6.
374. Cavillon JM, Adib-Conquy M. Bench-to-bedside review: endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. *Crit Care.* 2006;10(5):233.

375. Wolk K, Docke WD, von Baehr V, Volk HD, Sabat R. Impaired antigen presentation by human monocytes during endotoxin tolerance. *Blood*. 2000;96(1):218-23.
376. Demaret J, Walencik A, Jacob MC, Timsit JF, Venet F, Lepape A, et al. Inter-laboratory assessment of flow cytometric monocyte HLA-DR expression in clinical samples. *Cytometry B Clin Cytom*. 2013;84(1):59-62.
377. Morre M, Beq S. Interleukin-7 and immune reconstitution in cancer patients: a new paradigm for dramatically increasing overall survival. *Target Oncol*. 2012;7(1):55-68.
378. Pleiman CM, Gimpel SD, Park LS, Harada H, Taniguchi T, Ziegler SF. Organization of the murine and human interleukin-7 receptor genes: two mRNAs generated by differential splicing and presence of a type I-interferon-inducible promoter. *Mol Cell Biol*. 1991;11(6):3052-9.
379. Demaret J, Villars-Mechin A, Lepape A, Plassais J, Vallin H, Malcus C, et al. Elevated plasmatic level of soluble IL-7 receptor is associated with increased mortality in septic shock patients. *Intensive Care Med*. 2014;40(8):1089-96.
380. Takala A, Jousela I, Jansson SE, Olkkola KT, Takkunen O, Orpana A, et al. Markers of systemic inflammation predicting organ failure in community-acquired septic shock. *Clin Sci (Lond)*. 1999;97(5):529-38.
381. Etzioni A. Adhesion molecules--their role in health and disease. *Pediatr Res*. 1996;39(2):191-8.
382. Rogowski O, Sasson Y, Kassirer M, Zeltser D, Maharshak N, Arber N, et al. Down-regulation of the CD62L antigen as a possible mechanism for neutrophilia during inflammation. *Br J Haematol*. 1998;101(4):666-9.
383. Tikhonov I, Doroshenko T, Chaly Y, Smolnikova V, Pauza CD, Voitenok N. Down-regulation of CXCR1 and CXCR2 expression on human neutrophils upon activation of whole blood by *S. aureus* is mediated by TNF-alpha. *Clin Exp Immunol*. 2001;125(3):414-22.
384. Territo MC, Golde DW. Granulocyte function in experimental human endotoxemia. *Blood*. 1976;47(4):539-44.
385. Kutter D, Devaquet P, Vanderstocken G, Paulus JM, Marchal V, Gothot A. Consequences of total and subtotal myeloperoxidase deficiency: risk or benefit ? *Acta Haematol*. 2000;104(1):10-5.
386. Sugitharini V, Prema A, Berla Thangam E. Inflammatory mediators of systemic inflammation in neonatal sepsis. *Inflamm Res*. 2013;62(12):1025-34.
387. Parker H, Albrett AM, Kettle AJ, Winterbourn CC. Myeloperoxidase associated with neutrophil extracellular traps is active and mediates bacterial killing in the presence of hydrogen peroxide. *J Leukoc Biol*. 2013;91(3):369-76.
388. de la Rosa G, Yang D, Tewary P, Varadhachary A, Oppenheim JJ. Lactoferrin acts as an alarmin to promote the recruitment and activation of APCs and antigen-specific immune responses. *J Immunol*. 2008;180(10):6868-76.
389. Legrand D, Ellass E, Carpentier M, Mazurier J. Lactoferrin: a modulator of immune and inflammatory responses. *Cell Mol Life Sci*. 2005;62(22):2549-59.
390. Manzoni P, Rinaldi M, Cattani S, Pugni L, Romeo MG, Messner H, et al. Bovine lactoferrin supplementation for prevention of late-onset sepsis in very low-birth-weight neonates: a randomized trial. *JAMA*. 2009;302(13):1421-8.

391. Manzoni P, Stolfi I, Messner H, Cattani S, Laforgia N, Romeo MG, et al. Bovine lactoferrin prevents invasive fungal infections in very low birth weight infants: a randomized controlled trial. *Pediatrics*. 2012;129(1):116-23.
392. Guntupalli K, Dean N, Morris PE, Bandi V, Margolis B, Rivers E, et al. A phase 2 randomized, double-blind, placebo-controlled study of the safety and efficacy of talactoferrin in patients with severe sepsis. *Crit Care Med*. 2013;41(3):706-16.
393. Pangault C, Le Tulzo Y, Tattevin P, Guilloux V, Bescher N, Drenou B. Down-modulation of granulocyte macrophage-colony stimulating factor receptor on monocytes during human septic shock. *Crit Care Med*. 2006;34(4):1193-201.
394. Orr Y, Taylor JM, Bannon PG, Geczy C, Kritharides L. Circulating CD10-/CD16low neutrophils provide a quantitative index of active bone marrow neutrophil release. *Br J Haematol*. 2005;131(4):508-19.
395. Delano MJ, Scumpia PO, Weinstein JS, Coco D, Nagaraj S, Kelly-Scumpia KM, et al. MyD88-dependent expansion of an immature GR-1(+)CD11b(+) population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis. *J Exp Med*. 2007;204(6):1463-74.
396. Ren D, Bi Q, Li L, Gao Y, Liang Y, Li Y, et al. Myeloid-derived suppressor cells accumulate in the liver site after sepsis to induce immunosuppression. *Cell Immunol*. 2012;279(1):12-20.
397. Cuenca AG, Delano MJ, Kelly-Scumpia KM, Moreno C, Scumpia PO, Laface DM, et al. A paradoxical role for myeloid-derived suppressor cells in sepsis and trauma. *Mol Med*. 2011;17(3-4):281-92.
398. Brudecki L, Ferguson DA, McCall CE, El Gazzar M. Myeloid-derived suppressor cells evolve during sepsis and can enhance or attenuate the systemic inflammatory response. *Infect Immun*. 2012;80(6):2026-34.
399. Derive M, Bouazza Y, Alauzet C, Gibot S. Myeloid-derived suppressor cells control microbial sepsis. *Intensive Care Med*. 2012;38(6):1040-9.
400. Sander LE, Sackett SD, Dierssen U, Beraza N, Linke RP, Muller M, et al. Hepatic acute-phase proteins control innate immune responses during infection by promoting myeloid-derived suppressor cell function. *J Exp Med*. 2010;207(7):1453-64.
401. Leliefeld PH, Wessels CM, Leenen LP, Koenderman L, Pillay J. The role of neutrophils in immune dysfunction during severe inflammation. *Crit Care*. 2016;20(1):73.
402. Jiang J, Guo W, Liang X. Phenotypes, accumulation, and functions of myeloid-derived suppressor cells and associated treatment strategies in cancer patients. *Hum Immunol*. 2014;75(11):1128-37.
403. Maslove DM, Wong HR. Gene expression profiling in sepsis: timing, tissue, and translational considerations. *Trends Mol Med*. 2014;20(4):204-13.
404. Ochoa AC, Zea AH, Hernandez C, Rodriguez PC. Arginase, prostaglandins, and myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2007;13(2 Pt 2):721s-6s.
405. Gohring K, Wolff J, Doppl W, Schmidt KL, Fenchel K, Pralle H, et al. Neutrophil CD177 (NB1 gp, HNA-2a) expression is increased in severe bacterial infections and polycythaemia vera. *Br J Haematol*. 2004;126(2):252-4.
406. Lill M, Koks S, Soomets U, Schalkwyk LC, Fernandes C, Lutsar I, et al. Peripheral blood RNA gene expression profiling in patients with bacterial meningitis. *Front Neurosci*. 2013;7:33.

407. Sachs UJ, Andrei-Selmer CL, Maniar A, Weiss T, Paddock C, Orlova VV, et al. The neutrophil-specific antigen CD177 is a counter-receptor for platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31). *J Biol Chem*. 2007;282(32):23603-12.
408. Passamonti F, Pietra D, Malabarba L, Rumi E, Della Porta MG, Malcovati L, et al. Clinical significance of neutrophil CD177 mRNA expression in Ph-negative chronic myeloproliferative disorders. *Br J Haematol*. 2004;126(5):650-6.
409. Stroncek DF, Jaszcz W, Herr GP, Clay ME, McCullough J. Expression of neutrophil antigens after 10 days of granulocyte-colony-stimulating factor. *Transfusion*. 1998;38(7):663-8.
410. de Kleijn S, Kox M, Sama IE, Pillay J, van Diepen A, Huijnen MA, et al. Transcriptome kinetics of circulating neutrophils during human experimental endotoxemia. *PLoS One*. 2012;7(6):e38255.
411. Hu N, Mora-Jensen H, Theilgaard-Monch K, Doornbos-van der Meer B, Huitema MG, Stegeman CA, et al. Differential expression of granulopoiesis related genes in neutrophil subsets distinguished by membrane expression of CD177. *PLoS One*. 2014;9(6):e99671.