



HAL
open science

Cellules suppressives d'origine myéloïde au cours du sepsis

Fabrice Uhel

► **To cite this version:**

Fabrice Uhel. Cellules suppressives d'origine myéloïde au cours du sepsis. Médecine humaine et pathologie. Université de Rennes, 2016. Français. NNT : 2016REN1B002 . tel-01480279

HAL Id: tel-01480279

<https://theses.hal.science/tel-01480279>

Submitted on 1 Mar 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.



THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne

pour le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention : Biologie et Science de la Santé

Ecole doctorale Vie-Agro-Santé

présentée par

Fabrice UHEL

Préparée à l'unité de recherche INSERM U917, Rennes
Unité Mixte de Recherche U917 Microenvironnement et Cancer
CIC INSERM 1414
UFR Sciences de la Vie et de l'Environnement

**Cellules
suppressives
d'origine myéloïde
au cours du sepsis**

**Thèse soutenue à Rennes
le 19 mai 2016**

devant le jury composé de :

Eric TARTOUR

PU-PH – Université Paris Descartes / *rapporteur*

Frédéric PÈNE

PU-PH – Université Paris Descartes / *rapporteur*

Hafid AIT-OUFELLA

PU-PH – Université Paris Descartes / *examineur*

Reynald GILLET

PU - Université de Rennes 1 / *examineur*

Yves LE TULZO

PU-PH – Université de Rennes 1 / *directeur de thèse*

Karin TARTE

PU-PH – Université de Rennes 1 / *co-directeur de thèse*

Table des matières

Table des matières

Table des matières.....	3
Table des illustrations	7
Liste des figures.....	9
Liste des tableaux.....	11
Liste des abréviations	13
Introduction.....	17
Chapitre I. Réaction immunitaire au cours du sepsis	19
I. Le sepsis : une définition complexe	19
II. Théorie de la réaction inflammatoire exacerbée	23
III. Le concept d'immunodépression du sepsis	33
IV. Approche globale.....	45
Chapitre II. Cellules myéloïdes suppressives	49
I. Cellules dendritiques	51
II. Macrophages.....	55
III. Neutrophiles	59
IV. MDSC	63
V. Place des MDSC parmi les cellules myéloïdes	89
Objectifs	95
Résultats	99
Article 1. L'activité Indoléamine 2,3-dioxygénase est augmentée chez les patients souffrant d'un sepsis sévère ou d'un choc septique.....	101
Article 2. HMGB1 induit une dysfonction des polynucléaires neutrophiles dans un modèle expérimental de sepsis et chez les patients qui survivent au choc septique.....	115
Article 3. L'expansion précoce de cellules suppressives d'origine myéloïde circulantes prédit le développement d'infections nosocomiales chez les patients septiques.....	141
Article 4. La dysfonction lymphocytaire T au cours des lymphomes B diffus à grandes cellules implique l'expansion de cellules suppressives d'origine myéloïde exprimant IL-10, PD-L1, and S100A12	193

Article 5. Dysfonction immunitaire après chirurgie cardiaque avec circulation extracorporelle : Effets bénéfiques du maintien de la ventilation mécanique	235
Discussion et perspectives.....	243
Références bibliographiques.....	253

Table des illustrations

Liste des figures

- Figure 1.** Voies de signalisation des TLR.
- Figure 2.** Rôle du *quorum sensing* dans la pathogénèse et la virulence bactériennes.
- Figure 3.** Localisation anatomique de la ponction-ligature cæcale chez la souris.
- Figure 4.** Taux de survie après ponction ligature caecale chez la souris, selon le niveau de ligature.
- Figure 5.** Impact de l'apoptose sur les fonctions immunitaires.
- Figure 6.** Place des cellules folliculaires dendritiques au sein des ganglions.
- Figure 7.** Réponses immunitaires au cours du sepsis.
- Figure 8.** Différenciation myéloïde physiologique.
- Figure 9.** Développement et trafic des phagocytes mononucléés en conditions physiologiques chez la souris.
- Figure 10.** Mécanismes suppresseurs des DC au sein du microenvironnement tumoral.
- Figure 11.** Hétérogénéité des macrophages.
- Figure 12.** Les cytokines produites par les cellules immunitaires génèrent différents phénotypes de macrophages.
- Figure 13.** Mécanismes suppresseurs des macrophages associés aux tumeurs.
- Figure 14.** Différentes sous-populations de polynucléaires neutrophiles au cours du cancer chez la souris.
- Figure 15.** Description initiale des MDSC.
- Figure 16.** Analyse phénotypique des MDSC par cytométrie en flux chez la souris.
- Figure 17.** Analyse phénotypique des MDSC par cytométrie en flux chez l'homme.
- Figure 18.** Structure d'HMGB1.
- Figure 19.** Voies de signalisation impliquées dans l'expansion et l'activation des MDSC.
- Figure 20.** Mécanismes d'inhibition des fonctions lymphocytaires T par les MDSC.
- Figure 21.** Métabolisme de la L-arginine.
- Figure 22.** Cellules myéloïdes suppressives au cours des états d'agression aigue et chroniques.

Liste des tableaux

Tableau 1. Phénotypes MDSC au cours des cancers chez l'homme.

Tableau 2. Phénotypes MDSC au cours des pathologies non tumorales chez l'homme.

Tableau 3. Comparaison des phénotypes myéloïdes chez la souris.

Tableau 4. Comparaison des phénotypes myéloïdes chez l'homme.

Liste des abréviations

Liste des abréviations

A

ADAM-17 : A disintegrin and metalloproteinase 17

ADN : Acide désoxyribonucléique

AINS : Anti-inflammatoires non-stéroïdiens

ARG1 : Arginase 1

ARN : Acide ribonucléique

ATP : Adénosine triphosphate

B

BCL-2 : B-cell lymphoma 2

BEC : Cellules endothéliales sanguines

C

CARS : Réponse anti-inflammatoire compensatrice

CD : Cluster de différenciation

cDC : Cellules dendritiques conventionnelles

CLP : ponction ligature caecale

CLR : C-type lectin receptors

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CMP : Progéniteurs myéloïdes communs

CMV : Cytomégalovirus

COX-2 : Cyclooxygénase 2

CX3CR1 : CX3C chemokine receptor 1

D

DC : Cellules dendritiques

DAMP : Damage-associated molecular patterns

DLBCL : Lymphome B diffuse à grandes cellules

E

eNOS : NO synthase endothéliale

F

FDC : Cellules folliculaires dendritiques

Fit3L : Fms-related tyrosine kinase 3 ligand

fMLP : N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine

Foxp3 : Forkhead box P3

FRC : Cellules réticulaires fibroblastiques

G

G-CSF : Granulocyte-colony stimulating factors

GM-CSF : Granulocyte-macrophage colony stimulating factors

GMP : Progéniteurs des granulocytes et macrophages

H

HDG : High-density granulocytes

HDN : High-density neutrophils

HMGB1 : High-mobility group box 1 protein

HSC : Cellules souches hématopoïétiques

HSV : Herpes simplex virus

I

IDC : Cellules dendritiques interdigitées

IDO : Indoléamine 2,3-dioxygénase

IFN : Interféron

IL : Interleukine

IL-1Ra : Récepteur soluble antagoniste de l'IL-1

iMC : Immature myeloid cells

iNOS : NO synthase inductible

IRAK : IL-1 receptor-associated kinase

J

JAK : Janus kinase

L

LDG : Low-density granulocytes

LDN : Low-density neutrophils

LPS : Lipopolysaccharide

M

MDSC : Myeloid-derived suppressor cells

Mono-DC : Cellules dendritiques dérivées des monocytes

MMP : Métalloprotéinase matricielle

MPO : Myéloperoxydase

MRC : Cellules réticulaires marginales

MyD88 : Myeloid differentiation primary response gene 88

N

NADPH : Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NET : Neutrophil extracellular traps

NF- κ B : Nuclear factor-kappa B

NGAL : Neutrophil gelatinase-associated lipocalin

NLR : Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors

NO : Oxyde nitrique

P

PAMP : Pathogen-associated molecular patterns

PD-1 : Programmed cell death 1

pDC : Cellules dendritiques plasmacytoïdes

PD-L1 : Programmed cell death ligand 1

PGE-2 : Prostaglandine E2

PRR : Pattern-recognition receptors

R

RAGE : Receptor for advanced-glycation end product

RLR : Retinoic acid inducible gene 1-like receptors

ROS : Espèces réactives de l'oxygène

S

SAA : Protéine sérum amyloïde A

siRNA : Petit ARN interférant

SIRS : Syndrome de réponse inflammatoire systémique

SOFA : Sequential Organ Failure Assessment

STAT : Signal transducer and activator of transcription

T

TAM : Macrophages associés aux tumeurs

TCR : Récepteur T

TGF- β : Transforming growth factor β

TLR : Toll-like Receptors

TNF : Tumor Necrosis Factor

Treg : Lymphocytes T régulateurs

V

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

Introduction

Chapitre I. Réaction immunitaire au cours du sepsis

I. Le sepsis : une définition complexe

Depuis sa description dans l'Antiquité, le sepsis a défié des générations de cliniciens et chercheurs, et fait l'objet de nombreux paradigmes et révolutions scientifiques. S'il est aujourd'hui toujours aussi difficile de définir comment et pourquoi les patients meurent de sepsis, c'est essentiellement parce que notre compréhension de la physiopathologie de cette maladie n'a cessé d'évoluer et que nous commençons tout juste à en apprécier toute la complexité.

1. Aspects généraux et historiques

Le concept de "sepsis" (Σήψις) remonte à l'époque de la médecine hippocratique où il désignait le phénomène de putréfaction des plaies, en opposition au "pepsis" qui désignait la coction ou la fermentation. Dans l'antiquité, Claude Galien (129-200) a remis en question le caractère maléfique du sepsis en considérant – *Pus bonum et laudabile* – que la formation du pus était un mal nécessaire à la cicatrisation. Ce n'est qu'au XIX^{ème} siècle avec la théorie des germes de Pasteur et Semmelweis qu'apparaît la notion d'infection systémique secondaire à un "empoisonnement du sang" par un micro-organisme [1-3]. Un siècle plus tard, il s'est avéré que les antibiotiques, malgré leurs bénéfices spectaculaires sur la mortalité liée aux maladies infectieuses, ne permettaient pas de guérir tous les patients septiques.

C'est dans ce contexte qu'a émergé dans les années 70 la théorie de l'hôte, selon laquelle ce n'est pas tant le pathogène que la réaction inflammatoire exubérante développée par le patient qui occasionne les symptômes de la maladie [4]. Dans le sillage de cette théorie et d'études animales encourageantes, pas moins d'une trentaine d'essais thérapeutiques fondés sur des molécules anti-inflammatoires - corticoïdes, anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), antagonistes des récepteurs de l'interleukine (IL)-1 ou du TNF (*Tumor necrosis factor*) - ont tenté, de contenir l'orage inflammatoire [1]. Les résultats se sont malheureusement avérés

décevants et ont fini par soulever l'idée que les patients atteints de sepsis ne mouraient pas - ou tout du moins pas seulement - d'un excès d'inflammation.

Il est apparu au contraire que le tableau clinique développé par de nombreux patients ayant survécu aux premières heures du sepsis (difficultés à éradiquer le foyer infectieux initial, défaillances d'organe persistantes, fréquence des infections nosocomiales, réactivations virales) s'apparentait à un état d'immunodépression acquise. Un nouveau champ de recherche s'est alors attelé à explorer cet état qualifié de "réaction anti-inflammatoire compensatrice" (CARS) [5], "immunoparalysie", "tolérance à l'endotoxine" ou encore "reprogrammation leucocytaire" [6].

Il semble aujourd'hui que la réalité soit encore plus complexe, et que l'infection déclenche une réponse beaucoup plus polymorphe et prolongée, au cours de laquelle des mécanismes pro- et anti-inflammatoires concomitants contribuent d'une part à la clairance de l'infection et aux lésions d'organe, et d'autre part à la réparation tissulaire et aux infections secondaires [1,7].

2. Définition

Depuis 1992, le sepsis était défini par un consensus international comme un syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS) en rapport avec une infection [8]. Les critères de SIRS avaient alors été décrits comme étant l'expression clinique et biologique du syndrome inflammatoire, permettant de reconnaître la réponse de l'hôte à l'infection. Le sepsis était ensuite défini par l'association de deux critères de SIRS et d'une infection présumée ou confirmée, le sepsis sévère par l'apparition de défaillances d'organes et le choc septique comme la persistance d'une défaillance hémodynamique nécessitant la mise en route d'un traitement vasopresseur malgré une expansion volémique adéquate. Néanmoins les critères de SIRS ont été beaucoup critiqués pour leur manque de sensibilité et de spécificité vis-à-vis de l'infection [9]. Une large étude rétrospective a récemment confirmé que parmi les patients présentant une infection et une défaillance d'organe, 1 sur 8 avait moins de 2 critères de SIRS et n'était donc pas recensé comme patient septique par les critères habituels [10].

Un groupe de travail international a donc élaboré en 2016 de nouveaux critères diagnostiques [11]. Le sepsis est désormais défini comme une dysfonction d'organe menaçant le pronostic vital, faisant suite à une réponse dérégulée de l'hôte à l'infection. En pratique, il correspond à une augmentation d'au moins deux points du score SOFA (*Sequential Organ Failure Assessment*) chez un patient pour qui une infection est suspectée ou documentée. Le concept de sepsis sévère est par ailleurs abandonné pour ne retenir que le choc septique, défini comme un sepsis au cours duquel les anomalies circulatoires, métaboliques et cellulaires sont suffisamment graves pour entraîner une augmentation substantielle de la mortalité. La nouvelle définition nécessite donc la présence d'une hyperlactatémie supérieure à 2 mmol/L.

3. Aspects épidémiologiques

La diffusion de recommandations internationales prônant une prise en charge rapide du foyer infectieux et des défaillances d'organes a permis une diminution de près de 50% de la mortalité au cours des deux dernières décennies [12-14]. Néanmoins, l'incidence croissante du sepsis, en rapport avec le vieillissement de la population et la généralisation de thérapeutiques plus invasives et immunosuppressives, fait qu'aujourd'hui cette pathologie engendre trois fois plus de victimes qu'il y a trente ans [13,15]. Des données récentes montrent que le sepsis, majoritairement d'origine communautaire, est responsable d'un tiers à la moitié des décès intra-hospitaliers aux Etats-Unis [16].

L'amélioration du pronostic fait essentiellement suite à une baisse de la mortalité précoce. Une étude rétrospective française confirme en effet qu'actuellement près de 70% des décès surviennent au-delà du 3^{ème} jour d'hospitalisation en réanimation et font suite à des mesures de limitation des thérapeutiques actives ou des complications acquises en réanimation, au premier plan desquelles figurent les infections nosocomiales [17]. Une large étude prospective observationnelle vient également de confirmer que le sepsis, a fortiori les formes graves, était un facteur de risque majeur de développer une infection nosocomiale en réanimation. L'étude de la réponse transcriptomique était par ailleurs

en faveur d'un état d'immunosuppression au moment de la survenue de l'infection nosocomiale [18].

Il apparait par ailleurs que les patients qui survivent à la phase initiale du sepsis conservent des séquelles tardives sur le plan cognitif, neuromusculaire et immunologiques responsables d'une surmortalité pouvant atteindre 75% à 5 ans [19-21]. En outre, le risque accru de développer un cancer ou des maladies cardiovasculaires au décours [22], ainsi que la fréquence des réadmissions à l'hôpital [23], font que le sepsis demeure plus que jamais un enjeu majeur de santé publique.

II. Théorie de la réaction inflammatoire exacerbée

Le groupe d'experts internationaux qui s'est réuni afin de redéfinir le cadre nosologique du sepsis a souligné le caractère clinique polymorphe de ce syndrome, et la nécessité d'en améliorer le diagnostic [24]. Dans un grand nombre de cas, les signes cliniques initiaux sont l'expression d'un intense syndrome inflammatoire systémique. Ces manifestations ont été à l'origine de la théorie de la réaction inflammatoire exacerbée.

1. Les origines de la réponse inflammatoire

Les cellules de l'immunité innée sont capables de reconnaître les agents infectieux ou des dommages tissulaires par l'intermédiaire d'un nombre limité de récepteurs appelés *Pattern-recognition receptors* (PRR). Ces récepteurs reconnaissent des motifs conservés au sein des espèces bactériennes appelés *Pathogen-associated molecular patterns* (PAMP). Les PAMP peuvent être des molécules de surface (lipopolysaccharide (LPS), lipoprotéines, flagelline, peptidoglycane...) ou bien des motifs internes libérés lors de la lyse bactérienne (fragments d'ADN, protéines de choc thermique) [25]. Quatre grandes classes de récepteurs PRR ont été décrites à ce jour : Les TLR (*Toll-like Receptors*), les CLR (*C-type lectin receptors*), les RLR (*Retinoic acid inducible gene 1-like receptors*) et les NLR (*Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors*) appartenant aux complexes protéiques de l'inflammasome. Parmi les PRR, le TLR4 a été particulièrement étudié. Il permet de lier le lipopolysaccharide (LPS, encore appelé endotoxine), constituant essentiel de la paroi des bactéries à gram négatif. Le TLR4 forme un complexe avec les protéines MD2 et CD14.

Les PRR peuvent également avertir l'hôte de l'existence d'un danger en détectant des médiateurs endogènes libérés au cours des lésions tissulaires telles que les traumatismes, l'ischémie ou la nécrose. Ces médiateurs endogènes, tels que les protéines HMGB1 (*High-mobility group box 1 protein*) ou S100, l'ARN et l'ADN extracellulaires ou encore les histones sont appelées alarmines ou *Damage-associated molecular patterns* (DAMP) [26,27]. Ils sont impliqués dans les réactions inflammatoires stériles telles que les polytraumatismes, laissant apparaître le fait que

les défaillances d'organes observées au cours du sepsis ne sont pas fondamentalement différentes de celles observées dans d'autres pathologies non infectieuses de réanimation [28].

PAMPs et DAMPs constituent de véritables signaux de danger qui, au-delà des concepts de soi et non-soi, possèdent la capacité de déclencher rapidement une réaction immunitaire. La liaison de ces molécules à leurs récepteurs active des voies de signalisation qui conduisent à l'activation du facteur de transcription NF- κ B (*Nuclear factor-kappa B*), à la transcription de gènes de l'inflammation, à la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1, IL-6, ...) et de molécules antimicrobiennes (oxyde nitrique (NO), défensines), et initie la maturation des cellules dendritiques [29]. Les cytokines augmentent l'activité bactéricide des cellules phagocytaires, contribuent au recrutement des leucocytes au site de l'infection, favorisent l'hématopoïèse et induisent la fièvre.

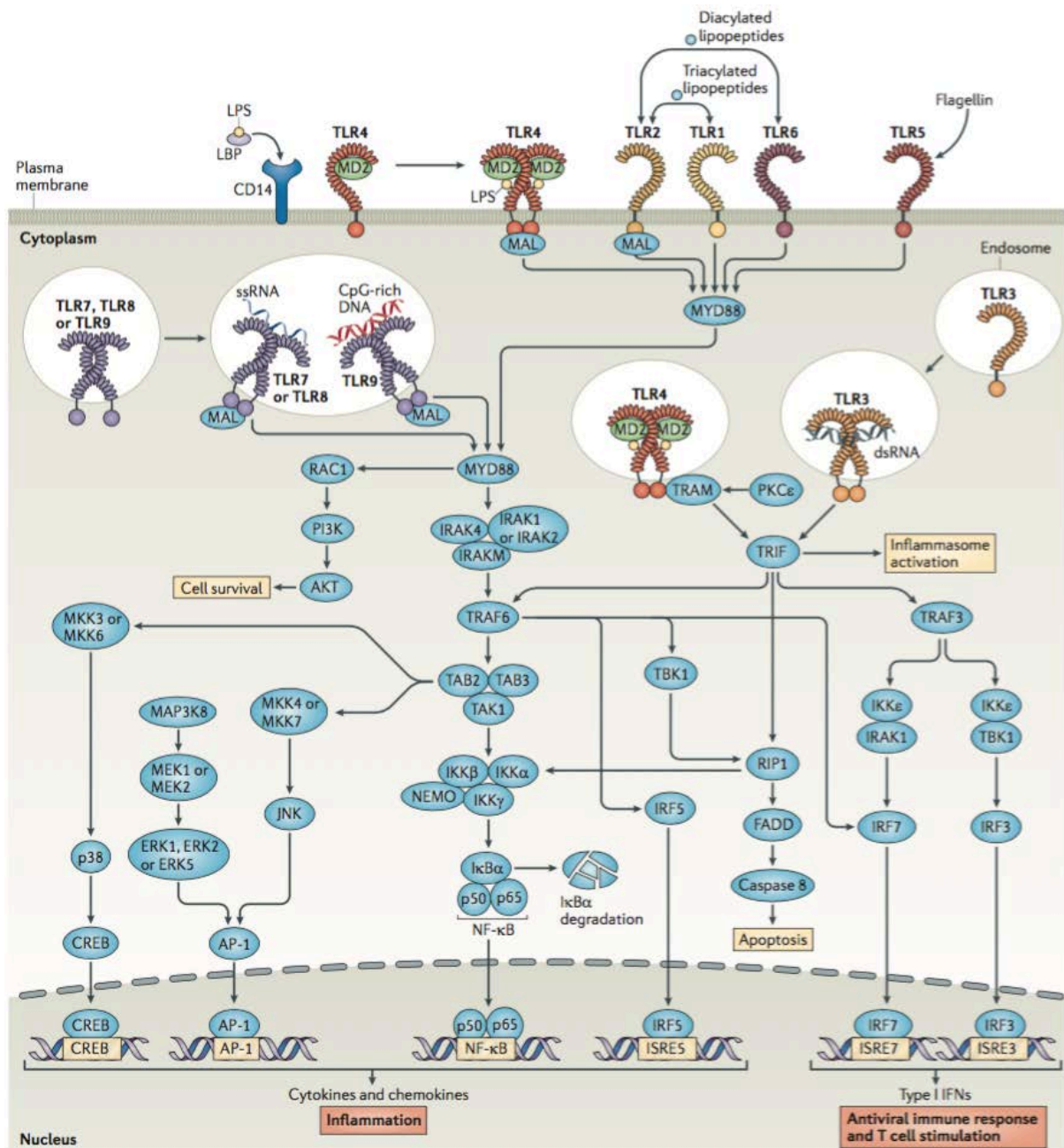


Figure 1. Voies de signalisation des TLR. Les TLR sont présents à la surface des cellules et à l'intérieur des endosomes, où ils détectent des composants de la paroi des agents infectieux, des acides nucléiques exogènes ou des molécules de danger libérées par les cellules du soi. Après stimulation, les TLR mettent en jeu deux types de voies de signalisation qui impliquent les protéines MYD88 (*myeloid differentiation primary response protein 88*) et/ou TRIF (*TIR-domain containing adaptor protein inducing IFN β*). Les voies de signalisation aboutissent à l'expression de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires et d'interférons de type I. D'après [30]

Des densités importantes de PAMPs et DAMPs en rapport avec l'inoculum bactérien et les lésions tissulaires peuvent ainsi induire une activation généralisée de la réponse immunitaire et un véritable "orage cytokinique" qui fait qu'une réaction anti-infectieuse initialement favorable à l'hôte peut finir par devenir excessive et néfaste [2].

Le système du complément est également capable de reconnaître des PAMPs. Trois voies distinctes permettent d'activer la cascade du complément : la voie classique activée par les complexes immuns, la voie alterne par la surface des pathogènes et la voie des lectines par des oligosaccharides bactériens. L'activation du complément permet la formation d'opsonines qui, en se fixant à la surface des pathogènes, vont favoriser leur phagocytose. Elle aboutit également à la formation du complexe d'attaque membranaire C5b-C6-7-8-9 qui induit la lyse des pathogènes, et la formation d'anaphylatoxines C3a et C5a, possédant un fort potentiel pro-inflammatoire [31]. La fraction C5a est en particulier un puissant activateur des polynucléaires neutrophiles et entraîne une hyperperméabilité capillaire [32].

2. Facteurs de virulence bactériens

Les facteurs de virulence bactériens vont avoir un rôle déterminant sur l'intensité de la réponse inflammatoire et le pronostic des infections graves [7]. Ils sont portés par des fragments de génome organisés en îlots de pathogénicité et vont distinguer les souches pathogènes des souches commensales. Le phénomène de *quorum sensing* va permettre l'expression simultanée des facteurs de virulence dès que l'inoculum bactérien atteint une densité suffisante.

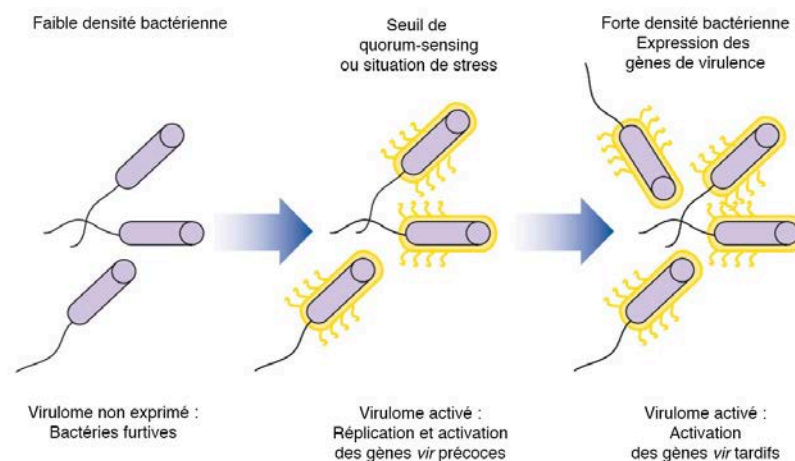


Figure 2. Rôle du *quorum sensing* dans la pathogénèse et la virulence bactériennes. Régulation du virulome bactérien par le *quorum sensing*. Les gènes de virulence (*vir*) précoce codent pour les adhésines, les molécules d'invasion et les systèmes dirigés contre le complément et la phagocytose. Les gènes *vir* tardifs codent pour les endotoxines, superantigènes, cytotoxines, systèmes d'activation de la réplication, d'échange génétique et de résistance aux antibiotiques. Modifié d'après [7]

Parmi ces facteurs, les superantigènes ou toxines de type I jouent par exemple un rôle essentiel dans la pathogénie des syndromes de choc toxique streptococciques ou staphylococciques. Ils ont la capacité de se lier directement et de façon non spécifique aux molécules du CMH de classe II exprimées à la surface des cellules présentatrices d'antigènes, et d'activer un grand nombre de lymphocytes T, provoquant la production de grandes quantités de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1, IL-2) [33].

3. Facteurs génétiques liés à l'hôte

Le rôle de facteurs génétiques dans le risque infectieux a été illustré par une étude menée au Danemark portant sur 924 enfants adoptés et leurs familles biologiques et adoptives. Si l'un des parents biologiques était décédé avant 50 ans d'un événement infectieux, le risque relatif (RR) de décès chez les enfants était de 5,8 (intervalle de confiance (IC) 95% = 2,47 – 13,7) contre 0,73 (IC95% = 0,10 – 5,36) s'il s'agissait d'un des parents adoptifs. Ce risque élevé persistait si le décès chez l'un des parents biologiques survenait avant 70 ans (RR = 5,0; IC95% = 1,73 – 14,4) [34].

De nombreuses études ont ensuite décrit une association entre la gravité de certaines infections et des variations portant sur des gènes codant pour des protéines de l'immunité innée. Ces études vont dans le sens d'une théorie génétique du sepsis, développée par *Jean-Laurent Casanova*, qui au-delà des déficits immunitaires congénitaux, a montré que certaines mutations mendéliennes prédisposaient à certaines formes graves de maladies infectieuses [35]. Ainsi, des déficits en properdine liés à l'X, ou des déficits autosomiques récessifs en fractions terminales du complément (C5-C9) nécessaires à la formation du complexe d'attaque membranaire, ont pu être mis en évidence chez des patients ayant présenté une infection invasive à méningocoque [36]. De même, les patients ayant un déficit en *IRAK-4* (*IL-1 receptor-associated kinase 4*) ou en MyD88 sont prédisposés à développer une forme grave d'infection invasive à pneumocoque [37,38]. Chez des patients hospitalisés en réanimation pour un choc septique, l'existence d'un variant du gène codant pour *IRAK1*, kinase impliquée dans la

signalisation de nombreux TLR, était associé à une durée de ventilation mécanique plus longue et une mortalité plus élevée parmi les patients les plus graves [39]. Ces polymorphismes peuvent ainsi expliquer la survenue de réactions inflammatoires fulminantes au cours de certaines infections chez des patients auparavant indemnes de comorbidités.

4. Les modèles murins

Afin d'appréhender la physiopathologie du sepsis et de développer de nouvelles approches thérapeutiques, il a été nécessaire de développer des modèles animaux. Les biais inhérents à chacun d'entre eux ont conduit à de nombreuses erreurs d'appréciation et des essais cliniques peu fructueux. Un regard rétrospectif sur ces modèles permet toutefois de faire ressortir toute la complexité du sepsis chez l'homme et de mieux définir les futurs modèles expérimentaux. Différentes procédures ont été mises en œuvre : l'administration de toxines exogènes telles que le zymosan ou le lipopolysaccharide ou encore l'administration d'agents pathogènes viables. Actuellement, le modèle de ponction ligature caecale (CLP) chez la souris demeure le gold-standard. Malgré les réserves inhérentes à la transposition de l'animal à l'homme, ces modèles demeurent essentiels au développement de futures approches thérapeutiques.

a. Modèle de l'endotoxémie

L'administration intraveineuse ou intra-péritonéale d'endotoxine entraîne l'apparition rapide de symptômes et anomalies biologiques comparables à ceux observés lors du sepsis chez l'homme [40]. Les souris présentent en particulier une neutrophilie, une lymphopénie et un infiltrat pulmonaire semblable au syndrome de détresse respiratoire aiguë. Il se caractérise par l'apparition précoce et transitoire de fortes concentrations plasmatiques de cytokines pro-inflammatoires, en particulier de TNF- α , d'IL-1 β et d'IL-6.

Les travaux de *Bruce Beutler* et *Charles Dinarello* ont été les premiers à mettre en avant le rôle des cytokines dans les manifestations cliniques du sepsis. En effet, l'administration intraveineuse d'IL-1 ou de TNF- α recombinants induisait de façon

synergique une défaillance hémodynamique et une nécrose des organes [41,42]. L'injection préalable de dexaméthasone, d'anticorps anti-TNF ou de récepteur soluble antagoniste de l'IL-1 (IL-1Ra) empêchait l'apparition des symptômes cliniques et biologiques du choc [43-46]. Ce modèle illustre parfaitement la théorie de l'hôte, soulignant le fait que le sepsis se développe dans le sillage de l'intense réponse inflammatoire de l'organisme, plutôt que par la présence de l'agent pathogène lui-même.

S'il présente l'avantage d'être simple et reproductible, ce modèle présente néanmoins un certain nombre d'inconvénients. A commencer par le fait qu'il ne reflète qu'une seule voie d'activation engagée par l'intermédiaire du récepteur TLR4. L'injection d'endotoxine provoque un pic cytokinique intense, beaucoup plus précoce et prononcé que lors du choc infectieux chez l'homme, ce qui explique en partie l'efficacité des thérapeutiques anti-inflammatoires [29]. Le modèle de l'endotoxémie a donc permis de comprendre certains aspects de la réponse immune anti-infectieuse, mais ne reflète sans doute que partiellement la complexité de la physiopathologie du sepsis.

b. Modèle de la ponction-ligature caecale

Mis au point il y a plus de 30 ans par l'équipe d'*Irshad Chaudry* [47], le modèle de CLP est beaucoup plus proche de la réalité physiopathologique de l'infection que l'administration systémique d'agents pathogènes. Il combine simultanément trois agressions : le traumatisme tissulaire lié à la laparotomie, la nécrose provoquée par la ligature du cæcum et l'infection secondaire à la fuite de la flore bactérienne intestinale dans le péritoine. Suite à la procédure, les souris développent sous 12 à 24h les symptômes de sepsis, avec une gravité variable selon le niveau de ligature [48].

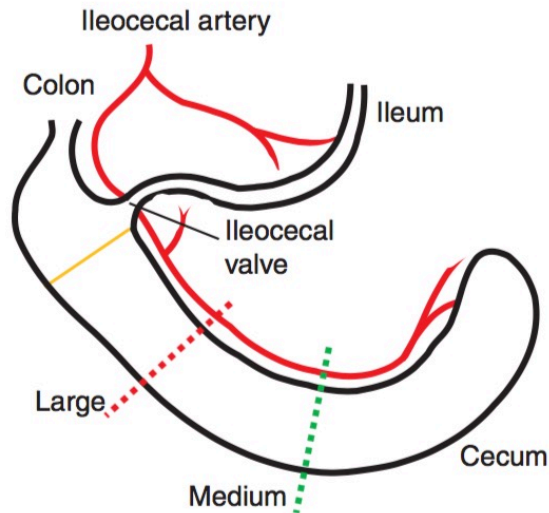


Figure 3. Localisation anatomique de la ponction-ligature cœcale chez la souris. Le niveau de la ponction influence la gravité du sepsis. Une ligature courte (ligne pointillée verte) entraîne un sepsis de gravité modérée. Une ponction large (ligne pointillée rouge) entraîne un sepsis grave et rapidement mortel. La ligne jaune représente la base du cœcum, située immédiatement sous la valvule iléo-cœcale. D'après [49]

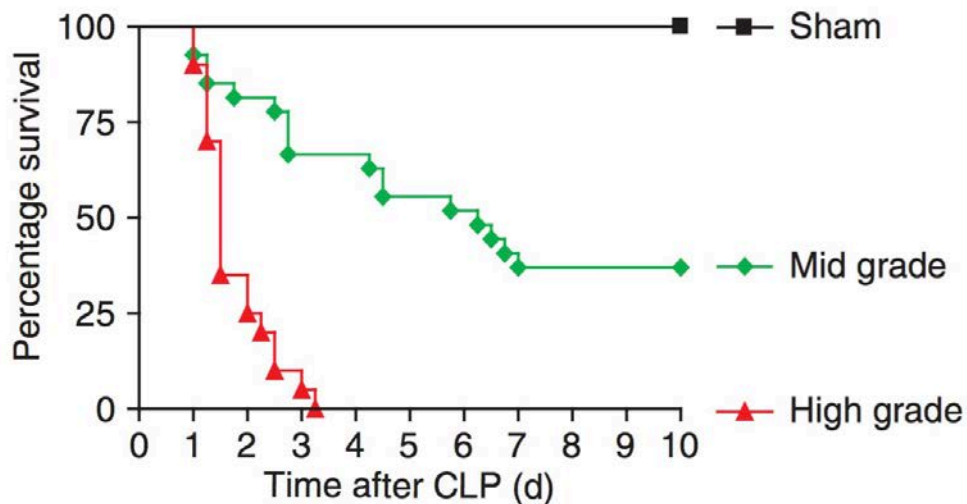


Figure 4. Taux de survie après ponction ligature caecale chez la souris, selon le niveau de ligature. Les souris sham ont été anesthésiées et ont subi une laparotomie sans manipulation du cœcum. D'après [49].

Les manifestations cliniques s'accompagnent d'une élévation modérée et retardée des concentrations plasmatiques de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β et IL-6) et de l'anaphylatoxine C5a du complément [50]. Les concentrations en IL-6 étaient significativement plus élevées chez les souris qui décédaient des suites de la CLP. De façon intéressante, l'administration d'un traitement antibiotique

améliorait le pronostic des souris, à l'exception de celles chez qui les concentrations plasmatiques d'IL-6 étaient les plus élevées, soulignant d'une part l'importance de la réponse systémique dans le pronostic du sepsis, et d'autre part la nécessité de développer des thérapeutiques adjuvantes ciblant la réponse de l'hôte [51]. A l'instar des modèles d'endotoxémie, l'administration d'anticorps bloquant l'IL-6, le C5a ou son récepteur empêchait le développement de défaillances d'organes, en particulier myocardique, et améliorait la survie des souris après CLP [52-55].

Les premiers modèles de CLP sont probablement plus proches de la réalité clinique que les injections de fragments bactériens, mais présentent également un certain nombre de biais d'interprétation. Tout d'abord, comme nous l'avons vu plus haut, le niveau de la ligature, la taille de l'aiguille et le caractère simple ou transfixiant de la ponction ont des conséquences importantes sur la pathologie développée par la souris et le pronostic, soulevant la question de la reproductibilité de certaines études. Cette donnée a motivé la publication d'une procédure standardisée [49]. Par ailleurs, la chronologie de l'infection est parfaitement connue, ce qui permet de contrôler le délai d'administration des thérapeutiques adjuvantes. Ce n'est pas le cas chez l'homme, chez qui la durée d'évolution des symptômes avant la prise en charge hospitalière est variable et souvent inconnue. Enfin, dans un grand nombre d'études, les souris ne recevaient ni antibiothérapie ni mesure de réanimation hémodynamique. Ces données sont désormais prises en compte dans les études animales actuelles [50].

c. Essais de thérapeutiques anti-inflammatoires chez l'homme

Les données issues des premières études animales relatives aux puissants effets des cytokines inflammatoires étaient en accord avec un certain nombre d'observations cliniques chez l'homme, au cours desquelles l'administration d'IL-1 ou de TNF à visée anti-cancéreuse provoquait l'apparition de symptômes comparables à ceux du choc septique, à savoir de la fièvre, des frissons, une hyperleucocytose et une hypotension dose-dépendante [56,57]. Le corolaire de ces études était que l'inhibition de ces médiateurs devait permettre de diminuer la mortalité au cours du choc septique.

Les effets prometteurs des thérapeutiques anti-inflammatoires dans les modèles d'endotoxémie chez la souris n'ont cependant pas été confirmés par les études cliniques chez l'homme.

Les essais d'inhibiteurs du TNF, portés par les résultats encourageants chez l'animal, n'ont individuellement pas montré d'effet bénéfique chez l'homme. Une méta-analyse portant sur près de 5000 patients provenant de 15 études retrouve un effet bénéfique mais très modeste sur la mortalité [58]. Cet effet n'a pas été confirmé par une nouvelle étude multicentrique [59]. De même, l'inhibition de l'IL-1 par l'IL-1-Ra recombinant n'a pas montré de bénéfice sur la survie des patients septiques [60], pas plus que les antagonistes du LPS sur les récepteurs MD2-TLR4 [61].

Plusieurs théories ont été avancées afin d'expliquer ces échecs successifs, de la possible absence d'efficacité des produits testés, à un problème de schéma expérimental ou de puissance des études, d'hétérogénéité des patients sélectionnés ou bien de conception erronée du problème [62]. Actuellement, la mise en route précoce d'une antibiothérapie adaptée et le contrôle du foyer infectieux constituent la seule façon de limiter l'extension du stimulus inflammatoire. La sensibilisation des praticiens à cette nécessité fait que les situations où les patients immunocompétents meurent d'un excès d'inflammation sont devenues aujourd'hui relativement rares, en dehors de susceptibilités génétiques particulières chez l'hôte ou de facteurs de virulence exacerbés chez l'agent pathogène.

III. Le concept d'immunodépression du sepsis

L'échec des thérapeutiques adjuvantes anti-inflammatoires a remis en question la théorie de l'hôte et mis à jour un nouveau niveau de complexité dans la physiopathologie du sepsis : Il est apparu que des patients considérés comme immunocompétents présentaient des signes patents d'immunodépression.

1. Fondements cliniques du concept

À la fin des années 70, un phénomène d'anergie cutanée à des antigènes communs avait été mis en évidence dans les suites de procédures chirurgicales. Cette perte de l'hypersensibilité retardée était associée à une mortalité élevée et un risque accru d'infection nosocomiale [63]. Plusieurs études ont ensuite montré que le sepsis constituait en lui-même un facteur de risque d'acquisition d'infection nosocomiale [18,64], celles-ci étant fréquemment en rapport avec des germes opportunistes ou habituellement peu virulents (*Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus Spp*, *Stenotrophomonas Spp*, *Acinetobacter Spp*, *Candida Spp*) [65].

La réactivation de virus latents du groupe herpès est particulièrement fréquente chez les patients septiques. On observe ainsi une virémie à cytomégalovirus (CMV) chez 33% des patients primo-infectés, survenant à une médiane de 12 jours après le début de l'hospitalisation. L'existence d'une réactivation CMV est par ailleurs associée de façon indépendante à la mortalité à J30 [66]. Une autre étude a montré également que la survenue d'une virémie CMV était associée à un risque accru de développer des infections nosocomiales fongiques ou bactériennes [67]. De même, une étude réalisée chez des patients intubés a montré que 21% d'entre eux développaient une bronchopneumonie à herpes simplex virus (HSV) au bout de 14 ± 6 jours de ventilation mécanique. L'évolution de ces patients était marquée par une durée d'hospitalisation et de séjour en réanimation allongées [67,68].

De façon intéressante, une série autopsique a révélé que près de 80% des patients qui décédaient dans les suites d'un choc septique présentaient, malgré une

antibiothérapie adaptée, de multiples foyers infectieux non résolus, soulignant l'incapacité du système immunitaire à éradiquer l'infection initiale [69].

De nouveaux axes de recherche ont ainsi mis à jour un système complexe de manifestations immunologiques systémiques opposées à la réaction inflammatoire et en grande partie responsables de la morbi-mortalité tardive du sepsis.

2. Stigmates plasmatiques d'une immunodépression systémique

Des études plus complètes du profil d'expression cytokinique au cours du sepsis chez l'animal ont montré que le pic précoce (2-6h) et intense de cytokines pro-inflammatoires était suivi d'une production retardée (12-24h) et prolongée de médiateurs anti-inflammatoires, responsable d'une mortalité plus tardive [70].

Alors que la théorie de l'hôte reposait en partie sur la présence de cytokines pro-inflammatoires dans le plasma de patients septiques, il a été peu à peu mis en évidence que ce même plasma pouvait également constituer un environnement immunosuppresseur pour les cellules immunitaires. Il a ainsi été démontré dans les années 90 que le plasma de patients septiques empêchait les monocytes de volontaires sains de produire du TNF- α en présence d'*Escherichia coli* [71]. A la même période, on a découvert que les enfants atteints de méningococcémie présentaient non seulement des concentrations plasmatiques élevées de TNF- α mais également de son inhibiteur naturel, le récepteur soluble du TNF, et que les taux plasmatiques élevés de ce dernier étaient tout autant associés à un mauvais pronostic [72].

L'IL-10 est une cytokine possédant de puissantes propriétés anti-inflammatoires. Elle inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires, la présentation antigénique et la prolifération cellulaire. Elle inhibe en particulier l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II et la production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules présentatrices d'antigènes, en particulier cellules dendritiques et macrophages [73]. Elle est présente précocement à de fortes concentrations dans le plasma de patients septiques, ce d'autant que le sepsis est grave. Elle joue un rôle essentiel dans les phénomènes de tolérance monocyttaire à l'endotoxine [74,75]. Les études qui

suiront montreront qu'un certain nombre de facteurs solubles véhiculés par ce "plasma immunosuppresseur" exercent un effet tolérogène sur les cellules immunitaires [76].

Les concentrations d'acides aminés plasmatiques reflètent dans certaines situations l'activité systémique d'enzymes immunosuppressives telles que l'indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO) ou l'arginase. Une activité IDO systémique avait ainsi été mise en évidence chez les patients infectés par le virus de l'immunodéficiência humaine (VIH) qui présentaient un catabolisme accru du tryptophane. Le ratio kynurénine / tryptophane était corrélé à la progression de la maladie et participait à la défaillance immunitaire secondaire à l'infection [77,78]. L'activité IDO est également augmentée et prédit la mortalité au cours des pneumonies communautaires [79]. Le sepsis est également caractérisé par un déficit en arginine [80,81], cet acide aminé devenant essentiel en condition de stress. L'hypoargininémie au cours du sepsis peut être attribuée, au moins en partie, à une activité augmentée de l'arginase et de la NO synthase inductible (iNOS, NOS2) [82]. Le déficit en arginine conduit à une diminution de l'expression de la chaîne ζ du récepteur T (TCR) et une altération des fonctions lymphocytaires T [83,84].

3. Dysfonctions lymphocytaires

Tout d'abord, des travaux ont montré qu'à l'étage médullaire, la stimulation des TLR et de leurs co-récepteurs sur les cellules souches multipotentes induisait une différenciation préférentielle vers la voie myéloïde, au détriment de la lignée lymphoïde, soulignant la balance initiale en faveur des cellules de l'immunité innée [85].

Les travaux de *Richard Hotchkiss* au début des années 2000 ont par ailleurs mis en évidence une raréfaction des follicules lymphoïdes dans la rate des patients décédés d'un choc septique [86]. Des marquages immunohistochimiques des caspases 3 et 9 ont suggéré que cette déplétion massive, intéressant les lymphocytes B et CD4⁺, était due à un phénomène d'apoptose [87].

L'apoptose lymphocytaire a ensuite été mise en évidence dans le sang par cytométrie en flux chez des patients atteints de choc septique [88]. Elle intéresse les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ et les lymphocytes B et explique vraisemblablement en grande partie la lymphopénie observée chez ces patients. L'importance et la persistance de cette apoptose lymphocytaire sont associées à la gravité de la maladie, aux défaillances d'organes et à la mortalité [88,89]. La conséquence directe de ce phénomène est la disparition massive de cellules effectrices essentielles au développement d'une réponse immunitaire adaptative.

Une étude de la diversité du répertoire de la chaîne β du TCR par biologie moléculaire a montré que celle-ci était sévèrement amputée et associée à une mortalité et un risque d'infection nosocomiale accrus [90]. De façon intéressante, les patients qui évoluaient favorablement recouvraient sous 7 jours une bonne diversité du répertoire T. La rapidité de cette récupération suggère la mobilisation de lymphocytes retenus dans des compartiments périphériques plutôt que la génération de nouveaux lymphocytes à partir du thymus. Cette hypothèse est cohérente avec la description d'une diminution de la proportion de lymphocytes T naïfs CD45RA⁺ mais pas des lymphocytes T mémoire CD45 RO⁺ [91,92].

Il est intéressant de noter que la proportion de lymphocytes T régulateurs (Treg) CD4⁺CD25⁺ est quant à elle augmentée dans le sang de patients septiques [91]. Cette proportion demeure élevée chez les patients qui décèderont du sepsis. Les Treg expriment la molécule CD25 (chaîne α du récepteur à l'IL-2) et le facteur de transcription Foxp3 (*Forkhead box P3*) et possèdent de fortes capacités suppressives affectant les lymphocytes et les cellules présentatrices d'antigènes. On distingue majoritairement les Treg naturels qui constituent une sous-population distincte de lymphocytes T produits dans le thymus, et une faible proportion de Treg induits en périphérie à partir des lymphocytes T naïfs après exposition à l'antigène [93]. L'augmentation de la proportion de Treg au cours du sepsis est surtout liée à une plus grande résistance de ces cellules à l'apoptose par rapport aux lymphocytes T effecteurs CD4⁺CD25⁻, leur nombre absolu n'étant que faiblement diminué (-43% par rapport aux volontaires sains), comparativement à la baisse lymphocytes CD4⁺CD25⁻ (-70% par rapport aux volontaires sains) [94].

Des travaux réalisés chez la souris suggèrent en particulier que les Treg pourraient, contrairement aux lymphocytes CD4⁺CD25⁻, être résistants à l'apoptose induite par les glucocorticoïdes [95].

Chez les patients atteints de choc septique, la proportion de lymphocytes T régulateurs dans le sang est associée à une diminution des capacités de prolifération des lymphocytes T *in vitro*. Dans un modèle murin de CLP, l'inhibition de l'expression de Foxp3 par un petit ARN interférant (siRNA) diminue la proportion de Treg et restaure les capacités de prolifération des lymphocytes *in vitro* [96], suggérant un rôle des Treg dans le phénomène d'anergie lymphocytaire.

Une autre conséquence importante du phénomène d'apoptose lymphocytaire est l'induction d'une anergie et d'une polarisation Th2 des réponses immunes assurées par les cellules ayant survécu à l'apoptose. La phagocytose de cellules apoptotiques par les macrophages et cellules dendritiques stimule la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et le TGF- β (*Transforming growth factor β*) et inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires [97,98]. De façon intéressante, le transfert adoptif de splénocytes apoptotiques (irradiés) à des souris septiques aggrave leur mortalité, alors que le transfert de cellules nécrotiques (congelées puis décongelées) améliore le pronostic. Ce phénomène s'accompagne d'une diminution dans le premier cas et d'une augmentation dans le second de la capacité de production d'interféron (IFN)- γ par les splénocytes des souris receveuses, confirmant l'immunodépression systémique induite par les cellules apoptotiques [99].

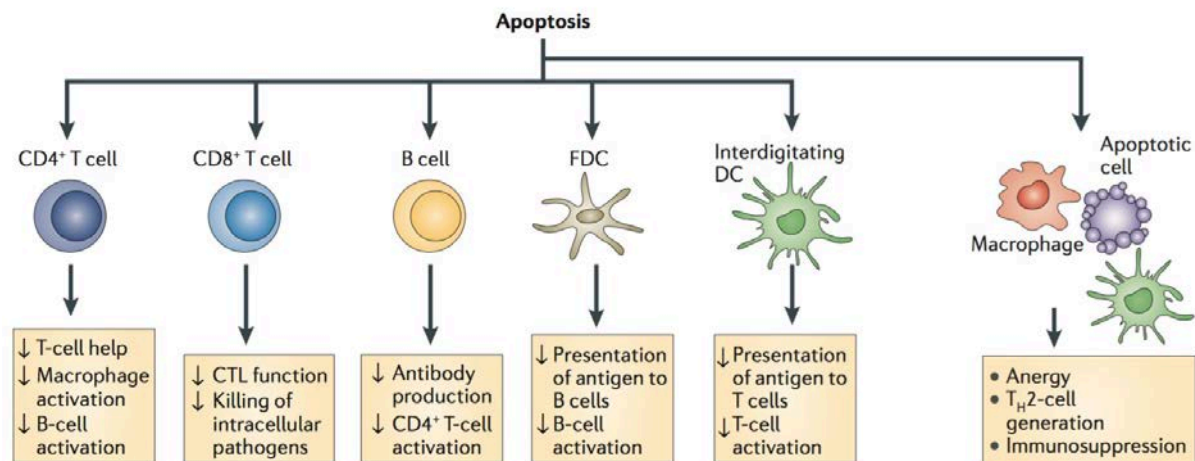


Figure 5. Impact de l'apoptose sur les fonctions immunitaires. L'apoptose induit une immunodépression systémique par deux mécanismes. Premièrement par la déplétion de cellules immunitaires essentielles dans la défense anti-infectieuse. Également par un effet immunosuppresseur sur les cellules vivantes. Les macrophages et cellules dendritiques qui phagocytent des cellules apoptotiques sont polarisés vers un profil Th2 ou deviennent anergiques. CTL, lymphocyte T cytotoxique; FDC, cellule dendritique folliculaire. D'après [100].

Cette notion d'immunodépression induite par l'apoptose doit cependant être considérée avec prudence. En effet, le dogme de la non-immunogénicité de l'apoptose a été largement débattu dans le domaine de la cancérologie. Il a été démontré en effet que la libération de DAMP par la cellule avant l'apoptose, et en particulier d'adénosine triphosphate (ATP) ou d'HMGB1, conduisait au développement d'une mort cellulaire immunogénique. La détection des DAMP par les PRR des cellules dendritiques stimule la phagocytose, la production d'IL-1 β et le développement d'une réponse immunitaire [101]. Une étude réalisée sur un modèle de double infection chez la souris a ainsi montré que le clivage d'HMGB1 par la caspase 1 conduisait à la libération de la boîte A et que la liaison de ce peptide sur les récepteurs RAGE (*receptor for advanced glycation end products*) des cellules dendritiques annulait l'effet tolérogène de l'apoptose. Le transfert adoptif de cellules dendritiques préalablement exposées à HMGB1 à des souris après un premier sepsis prévenait la mortalité liée à une seconde infection [102].

Des stratégies visant à inhiber l'apoptose lymphocytaire dans des modèles murins de sepsis polymicrobien ont toutefois permis d'observer une diminution de la mortalité. Ces stratégies reposaient entre autres sur la surexpression de protéines anti-apoptotiques (BCL-2, *B-cell lymphoma 2*) ou l'inhibition de protéines pro-

apoptotiques (CD95, caspases), l'administration de cytokines favorisant la survie cellulaire telles que l'IL-7 ou l'IL-15 [100,103].

Les cellules folliculaires dendritiques (FDC) sont des cellules d'origine stromale dérivées de précurseurs périvasculaires. Elles sont localisées au sein des follicules B dans les organes lymphoïdes secondaires. Leur maturation nécessite la présence de lymphocytes B producteurs de lymphotoxine α et de TNF. Elles font partie, avec les cellules réticulaires fibroblastiques (FRC), les cellules réticulaires marginales (MRC), les cellules endothéliales lymphatiques et les cellules endothéliales sanguines (BEC) d'un vaste réseau de cellules stromales au sein des organes lymphoïdes secondaires. Les FDC jouent un rôle essentiel dans la formation du centre germinatif et la production d'anticorps de haute affinité. Elles ont également la particularité de conserver des antigènes intacts pendant des périodes prolongées, permettant ainsi de diversifier le répertoire B grâce au processus d'hypermutation somatique et d'entretenir une mémoire immunologique à long terme. Elles ont à ce titre un rôle essentiel dans l'organisation, le développement et le maintien de l'immunité humorale [104].

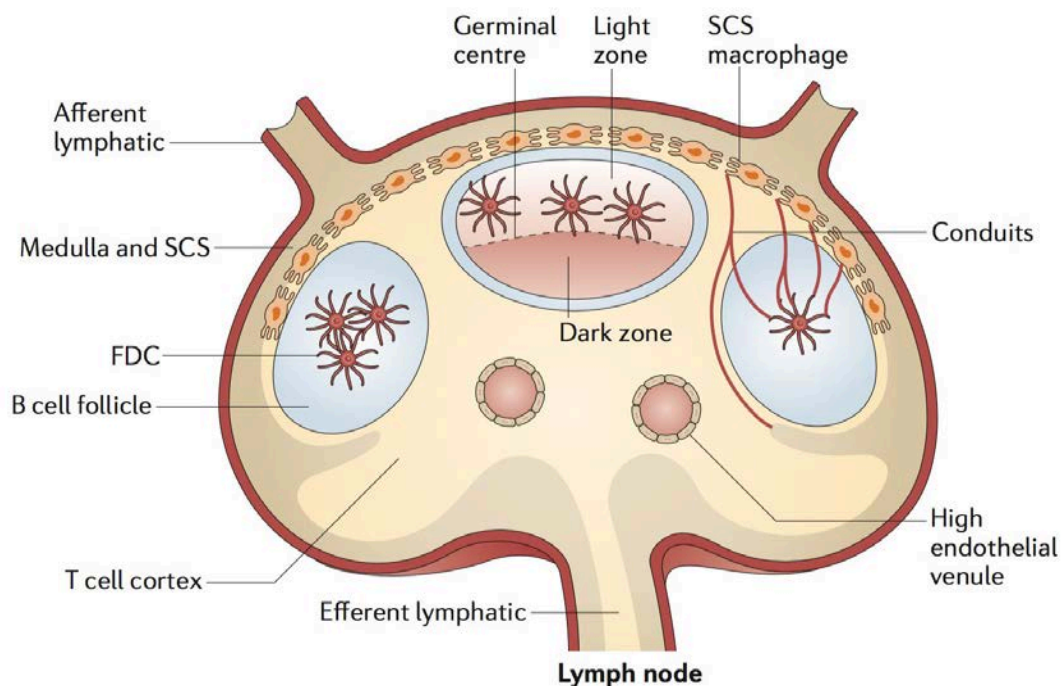


Figure 6. Place des cellules folliculaires dendritiques au sein des ganglions. Représentation schématique de l'histologie ganglionnaire, indiquant la position des cellules folliculaires dendritiques (FDC) au sein des follicules B et dans la zone claire des centres germinatifs. D'après [104].

Le sepsis polymicrobien chez la souris induit dans un premier temps une expansion transitoire des FDC de la rate, suivie d'une apoptose massive caspase 3-dépendante à partir de la 36^{ème} heure [105]. Chez l'homme, une étude anatomopathologique a montré également une disparition des follicules lymphoïdes en rapport avec une déplétion massive des FDC de la rate chez les patients décédés d'un choc septique, comparativement à des rates de sujets sains retirées dans les suites d'un traumatisme [106].

4. Apoptose des cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (DC) forment un ensemble varié de cellules présentatrices d'antigènes professionnelles capables de réguler la fonction et la survie des lymphocytes B et T. Elles sont essentiellement présentes dans les organes lymphoïdes secondaires et la plupart des tissus du système réticulo-endothélial. Elles ont été initialement décrites par l'équipe de *Ralph Steinman* comme des cellules de forme étoilée identifiées dans des préparations de splénocytes adhérents [107].

Les cellules dendritiques d'origine myéloïde, qualifiées dans certaines études de cellules dendritiques interdigitées (IDC) proviennent de précurseurs médullaires de la lignée myéloïde. Elles ont la capacité de capturer et apprêter les antigènes en périphérie et de migrer dans la région paracorticale des organes lymphoïdes secondaires où elles interagissent avec les lymphocytes T. Quatre sous-types cellulaires sont actuellement décrits : les cellules dendritiques conventionnelles (cDC), les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC), les cellules de Langerhans et les cellules dendritiques dérivées des monocytes (Mono-DC). Leurs caractéristiques seront plus longuement développées dans le chapitre II.

Les cDC, aussi bien matures qu'immatures, sont également victimes d'un phénomène d'apoptose massive et précoce dans la rate, les ganglions locaux et distaux ainsi que dans les tissus infectés [108-110]. Les PRR pourraient jouer un rôle important dans l'apoptose des cellules dendritiques de la rate. En effet, alors qu'une ponction-ligature cœcale entraîne une déplétion sévère des cellules dendritiques

spléniques CD11b⁺CD8a⁻ et CD11b⁺CD8a⁺, elle n'est pas observée chez les souris TLR2^{-/-} et TLR4^{-/-} [111].

Une étude réalisée sur des DC différenciées à partir de progéniteurs médullaires chez la souris a montré que les agents pathogènes, en particulier *Streptococcus pneumoniae* pouvait induire directement l'apoptose par différents mécanismes. Tout d'abord, une apoptose précoce indépendante des caspases, secondaire à la formation de pores dans la membrane cellulaire par la pneumolysine libérée par le pneumocoque. Le pneumocoque induit également une apoptose retardée (> 24h) dépendante des TLR et des récepteurs de mort [109].

Les DC résiduelles chez les souris ayant survécu au sepsis conservent une fonction altérée, caractérisée par une baisse prolongée (> 6 semaines) des capacités à produire de l'IL-12. Il a été montré que cette dysfonction persistante reposait sur des mécanismes épigénétiques de méthylation des histones situés sur les promoteurs des gènes codant pour l'IL-12 [112].

Chez l'homme, l'étude des DC est difficile du fait de leur localisation essentielle dans les organes lymphoïdes. Des études de cytométrie en flux ont néanmoins permis d'étudier la faible proportion de DC circulantes et de constater que l'effectif de ces dernières était également très réduit [113]. L'absence de restauration du nombre de cellules dendritiques à J7 est associée au développement d'infections nosocomiales. Elles sont également caractérisées par une diminution de l'expression d'HLA-DR et une baisse de leurs capacités à produire des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , IL-6) en réponse à une stimulation par des agonistes des récepteurs Toll. Il est intéressant de noter que ces altérations étaient toujours présentes 28 jours après le début du sepsis [114].

5. Dysfonctions monocytaires

Les monocytes sont issus de progéniteurs médullaires, circulent dans le sang et ont la capacité de se différencier en macrophages et cellules dendritiques au sein des tissus [115]. Chez la souris, on distingue deux sous-populations [116]. Les monocytes Ly6C^{low}CX3CR1^{high}CCR2^{low}, dits monocytes "patrouilleurs", se déplacent

à la surface de l'endothélium vasculaire [117]. Leur proximité des vaisseaux leur permet de migrer rapidement dans les tissus au cours des infections, où ils participent dans un premier temps à la réponse pro-inflammatoire, puis dans un second temps se différencient en macrophages "alternatifs" destinés à initier la réparation tissulaire [115]. La seconde population est représentée par les monocytes $Ly6C^{high}CX3CR1^{low}CCR2^{high}$, dits "inflammatoires". Ils sont également recrutés au niveau des sites inflammatoires, mais de façon plus retardée, et se différencient en "Tip-DC" (*tumor-necrosis factor- and inducible nitric oxide synthase-producing inflammatory DCs*) [118].

Chez l'homme, on distingue 3 sous-populations de monocytes :

- Les monocytes $CD14^{+}CD16^{-}$, représentant 80-90% des monocytes circulants. Ils expriment fortement CCR2 et faiblement CX3CR1, ils produisent peu de cytokines mais ont en revanche des capacités de phagocytose accrues. Ce sont les homologues des monocytes $Ly6C^{+}$ murins.
- Les monocytes $CD14^{dim}CD16^{+}$, exprimant fortement CX3CR1 et faiblement CCR2, ils patrouillent le long de l'endothélium vasculaire, à l'instar des monocytes $Ly6C^{low}$ chez la souris [119].
- Les monocytes $CD14^{+}CD16^{+}$ forment, malgré leur phénotype "intermédiaire", une entité à part entière. Ils ont en particulier la capacité de produire de fortes quantités d'IL-1 β et de TNF α en réponse à une stimulation par le LPS [120].

Les monocytes au cours du sepsis deviennent "tolérants", autrement dit incapables de réagir au LPS et autres PAMP ou alarmines. Ils deviennent ainsi inaptes à produire des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12) mais conservent la capacité de produire des cytokines anti-inflammatoires (IL-10, IL-1Ra) [121,122]. Les mécanismes responsables de cet état de "désactivation" ou "reprogrammation" sont encore mal connus. Ils mettent en jeu une diminution de l'expression de TLR4, une altération de la signalisation NF- κ B et la différenciation des monocytes-macrophages vers un phénotype tolérogène de type M2 [123]

L'une des caractéristiques les plus communément reconnues de la défaillance immunitaire du sepsis est la perte de l'expression des molécules de présentation de l'antigène HLA-DR. Elle est en partie induite par le cortisol qui inhibe sa transcription

et l'IL-10 qui induit sa séquestration dans le cytoplasme des monocytes [124,125]. La diminution de l'expression d'HLA-DR est associée à une évolution défavorable, et participe vraisemblablement à l'incapacité du système immunitaire à développer une réponse adaptative. De la même façon, il a été mis en évidence une diminution post-transcriptionnelle de l'expression du récepteur au GM-CSF, également associée à la gravité du sepsis, aux défaillances d'organes et à un risque accru de décès [126].

L'expression de CX3CR1, le récepteur de la fractalkine est également diminuée. Ce récepteur, préférentiellement exprimé par les monocytes CD16⁺ permet de recruter les cellules au sein des foyers inflammatoires par l'intermédiaire de la fractalkine (CX3CL1). La baisse de l'expression de CX3CR1 peut être reproduite *in vitro* sur des monocytes de volontaires sains après incubation avec du LPS ou des bactéries entières (*Escherichia coli* ou *Staphylococcus aureus*), suggérant une régulation par l'intermédiaire de la voie de signalisation NF-κB.

Les monocytes ont par ailleurs une responsabilité importante dans l'anergie des lymphocytes ayant survécu à l'apoptose, en particulier via l'expression de PD-L1 (*Programmed cell death ligand 1*) qui, en se liant sur le récepteur PD-1 (*Programmed cell death 1*) sur les lymphocytes induit un phénomène d'épuisement ("*exhaustion*") bien décrit au cours des infections virales chroniques ou du cancer [127,128].

6. Dysfonction des polynucléaires neutrophiles

Les polynucléaires neutrophiles, classiquement considérés comme les principales cellules effectrices de l'immunité innée, subissent également des altérations fonctionnelles qui participent à la défaillance immunitaire acquise chez les patients infectés [129]. L'hématopoïèse d'urgence liée au processus infectieux s'accompagne tout d'abord d'une augmentation du nombre de cellules granuleuses immatures circulantes dont les capacités de phagocytose et de bactéricidie se révèlent moins efficaces que celles des cellules matures [130]. Il a été montré qu'au décours des états infectieux sévères, les polynucléaires neutrophiles présentent des altérations majeures de leurs fonctions essentielles de phagocytose, bactéricidie et de production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), jouant un rôle important dans l'acquisition d'infections nosocomiales [131].

Leurs capacités de migrations tissulaires sont par ailleurs amoindries en raison de la diminution de l'expression membranaire de la molécule d'adhérence CD11b (intégrine α -M) et du récepteur de chimiokines CXCR2 [132]. L'altération de leurs capacités de migration *in vitro* en réponse à l'IL-8, au peptide chimiotactique f-MLP (N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine) ou au leucotriène B4 est associée à la mortalité des patients.

IV. Approche globale

La somme des travaux réalisés au cours des trente dernières années aussi bien chez l'animal que chez l'homme amène à un constat univoque : La réaction inflammatoire exacerbée, et l'apparition de mécanismes anti-inflammatoires aboutissant à un état de défaillance immunitaire prolongé sont deux réalités qui coexistent et sont aujourd'hui bien établies. La complexité de ces phénomènes a été illustrée par une étude transcriptomique réalisée sur les leucocytes sanguins : l'injection d'endotoxine à des volontaires sains provoque, à l'instar du polytraumatisme ou des brûlures, un "orage génomique" responsable en quelques heures d'une modulation de près de 80% du transcriptome [133]. Celle-ci peut se prolonger pendant plusieurs jours à plusieurs semaines et intéresse de façon concomitante des gènes à la fois pro- et anti-inflammatoires.

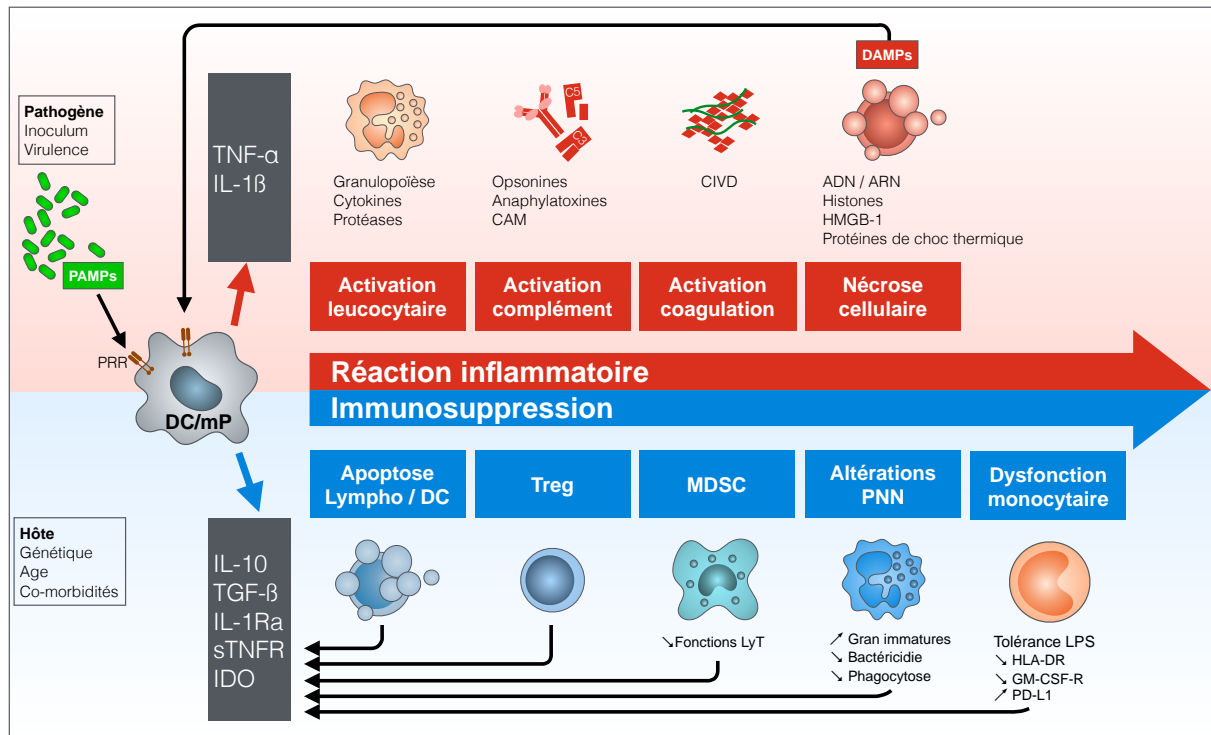


Figure 7. Réponses immunitaires au cours du sepsis. La reconnaissance des PAMP à la surface des pathogènes par les PRR des phagocytes mononucléés (DC : cellules dendritiques ; mP : macrophages) induit l'activation du facteur de transcription NF- κ B et l'expression de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β). La réaction inflammatoire nécessaire à l'éradication de l'agent infectieux va provoquer des lésions tissulaires responsables de la libération d'alarmines ou DAMP qui vont aggraver l'inflammation. Le retard à l'antibiothérapie, la virulence du pathogène ou la susceptibilité de l'hôte peuvent entraîner des décès précoces par excès d'inflammation. Une réaction anti-inflammatoire systémique destinée à favoriser la réparation tissulaire se développe de façon concomitante. Elle est caractérisée par l'expression de molécules anti-inflammatoires (IL-10, TGF- β), une apoptose des lymphocytes et cellules dendritiques, des dysfonctions monocytaires et granulocytaires et le développement de MDSC. Elle entraîne une immunodépression profonde et prolongée responsable d'infections nosocomiales et d'une mortalité tardive. D'après [134].

Classiquement, les réactions pro-inflammatoires, destinées à éliminer le pathogène, sont tenues pour responsables des dommages tissulaires collatéraux, alors que les réponses anti-inflammatoires (importantes pour limiter l'extension locale et systémique des lésions) sont impliquées dans la susceptibilité accrue aux infections secondaires [1].

Ces réactions sont rendues encore plus complexes par le fait que les agents infectieux eux-mêmes sont capables de moduler les réponses immunitaires et inflammatoires de l'hôte, en modifiant de façon qualitative et quantitative l'expression de facteurs de virulence, selon l'importance de la charge bactérienne (*quorum sensing*), le microenvironnement et le site de l'infection [135]. Il a par ailleurs été suggéré que la réactivation des herpès virus observée chez les patients de réanimation pourrait avoir un effet direct sur le pronostic défavorable [136].

Il est donc évident qu'une multitude de facteurs entre en compte dans les mécanismes du décès au cours du choc septique. Un certain nombre de décès précoces pourraient être liés à un excès d'inflammation. La diminution de près de 50% de la mortalité au cours des deux dernières décennies semble liée en grande partie à l'effet bénéfique d'une antibiothérapie précoce sur le syndrome inflammatoire lié au sepsis. Des facteurs de susceptibilité génétique et la virulence accrue de certains pathogènes pourraient encore néanmoins induire chez certaines personnes une réaction inflammatoire massive à l'origine de défaillances d'organes et d'un décès en quelques heures. L'âge et les comorbidités du patient jouent sans doute également un rôle majeur, d'une part en raisons de phénomènes naturels d'immunosénescence, et d'autre part parce que le sepsis peut induire la décompensation d'un certain nombre de pathologies sous-jacentes (cirrhose, BPCO, insuffisance cardiaque...) [14,15]. Au delà des éventuels déficits immunitaires préexistants, le sepsis induit par lui-même une défaillance immunologique profonde et prolongée, responsable d'une incapacité à éradiquer le foyer infectieux initial, de réactivations virales et d'une susceptibilité accrue aux infections nosocomiales. Les infections nosocomiales et réactivations virales secondaires à la défaillance immunologique pourraient enfin par elles-mêmes aggraver le pronostic des patients.

Il est vraisemblable que l'état de défaillance immunologique secondaire au sepsis, surajouté à d'éventuelles comorbidités préexistantes, soit aujourd'hui responsable de l'essentiel de la mortalité au cours du sepsis. [17,65]. Au vu des données précédentes, il nous a semblé intéressant d'étudier le rôle du compartiment myéloïde dans l'immunodépression observée au cours du sepsis.

Chapitre II. Cellules myéloïdes suppressives

Les cellules myéloïdes sont les cellules hématopoïétiques les plus abondantes de l'organisme. Elles sont classiquement impliquées dans la défense anti-infectieuse innée et adaptative, l'élimination des cellules mortes et le remodelage tissulaire. Elles ont également la capacité de moduler et polariser la réponse immunitaire.

Elles sont issues de cellules souches multipotentes qui se développent en cellules matures à travers différentes étapes de différenciation. Ces progéniteurs ne sont pas organisés de façon hiérarchique mais forment plutôt un réseau de cellules ayant la capacité de se différencier en sous-populations plus ou moins spécialisées.

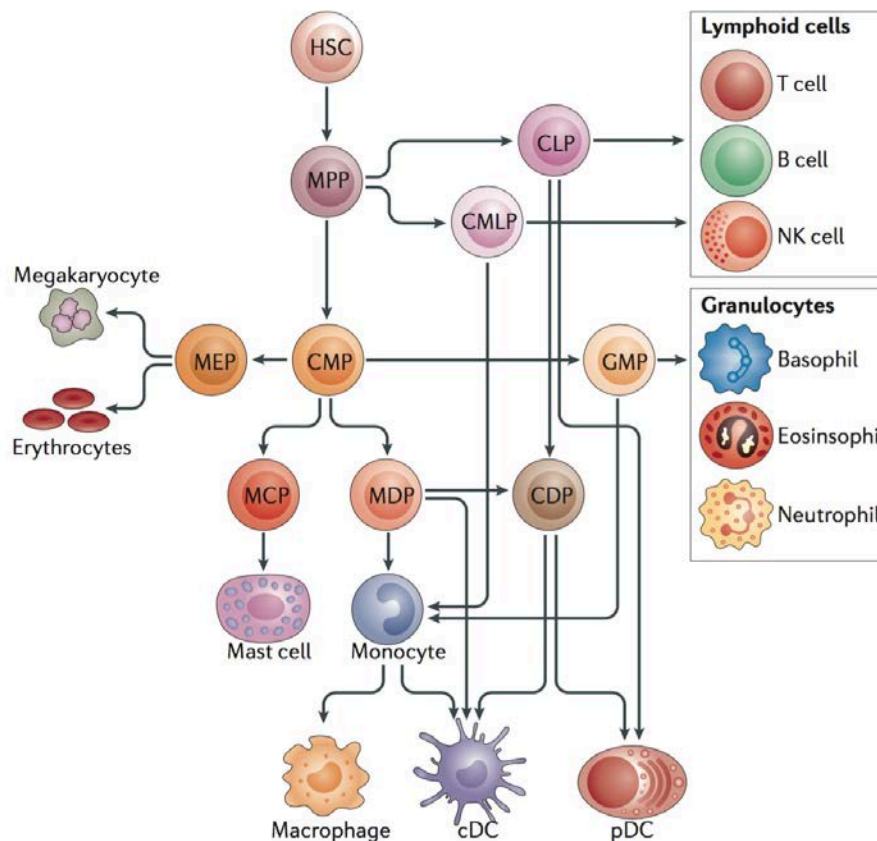


Figure 8. Différenciation myéloïde physiologique. Les cellules myéloïdes proviennent de cellules souches hématopoïétiques (*hematopoietic stem cells*, HSCs) et de cellules progénitrices multipotentes (*multipotent progenitor cells*, MPPs). cDC, cellules dendritiques conventionnelles; CMP, progéniteur dendritique commun; CLP, progéniteur lymphoïde commun; CMLP, progéniteur myélo-lymphoïde commun; CMP, progéniteur myéloïde commun; MCP, progéniteur mastocytaire; MDP, progéniteur des macrophages et cellules dendritiques; MEP, progéniteur mégacaryocytaire et érythrocytaire; NK, natural killer; pDC, cellules dendritiques plasmacytoïdes. D'après [137].

Dans un certain nombre de processus pathologiques, elles acquièrent des propriétés immunorégulatrices ou suppressives. C'est particulièrement au cours des cancers qu'ont été décrites des sous-populations de cellules dendritiques, macrophages et polynucléaires neutrophiles capables d'inhiber la réponse immunitaire anti-tumorale, voire de promouvoir la croissance des tumeurs et la diffusion métastatique [138].

Chez l'homme, elles ont été essentiellement décrites comme marqueurs pronostiques. En revanche, de nombreuses études chez la souris permettent de mieux appréhender leur rôle dans le développement tumoral.

Il y a une dizaine d'années, *Dmitry Gabrilovich* a posé les fondements d'une nouvelle entité cellulaire appelée MDSC (*Myeloid-derived suppressor cells*) [139]. Définies comme étant une population hétérogène de cellules qui se développent au cours des cancers et des états inflammatoires chroniques. Elles sont caractérisées par leur origine myéloïde, leur caractère immature et leur capacité à inhiber les réponses lymphocytaires T par l'expression de facteurs immunosuppresseurs tels que l'arginase 1 ou iNOS, ou encore la production d'espèces réactives de l'oxygène. Malgré l'abondante littérature dont elles ont fait l'objet, leur caractérisation phénotypique s'avère néanmoins difficile dans la mesure où elles n'expriment aucun marqueur spécifique.

Avant d'entrer dans le détail des caractéristiques des MDSC et d'étudier leur rôle au cours du sepsis, nous rappellerons brièvement les grandes caractéristiques des sous-populations myéloïdes suppressives, particulièrement décrites au cours des cancers, et tenterons de situer leur position respective. Les mécanismes immunosuppresseurs étant pour la plupart redondants, ils seront détaillés parmi les mécanismes d'action des MDSC.

I. Cellules dendritiques

1. Caractéristiques générales

Les cellules dendritiques (DC) sont des cellules myéloïdes spécialisées dans l'apprêtement et la présentation d'antigènes. Elles occupent ainsi une position stratégique, à l'interface entre la réponse immunitaire innée et la réponse adaptative, et permettent l'activation et la polarisation de la réponse lymphocytaire T [140]. Elles se différencient dans la moelle osseuse à partir de progéniteurs myéloïdes ou en périphérie à partir des monocytes [141]. On distingue aujourd'hui quatre sous-populations principales : les cDC, les pDC, les cellules de Langerhans et les Mono-DC [142].

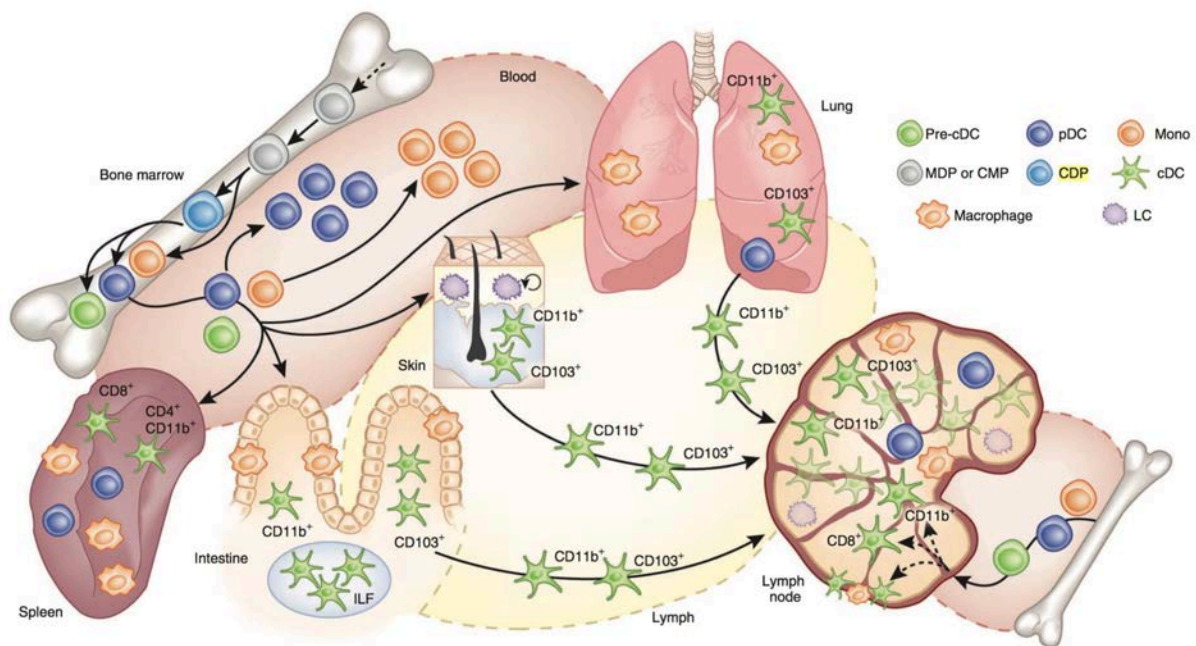


Figure 9. Développement et trafic des phagocytes mononucléés en conditions physiologiques chez la souris. Les cellules dendritiques conventionnelles (cDC), plasmacytoïdes (pDC) et les monocytes (Mono) sont issus de progéniteurs médullaires. Les progéniteurs macrophages-cellules dendritiques (MDP) donnent naissance aux progéniteurs communs des cellules dendritiques (CDP) et aux monocytes. Les CDP se différencient en pDC ou en précurseurs des cDC (pré-cDC). Les pré-cDC, pDC et monocytes transitent par le sang jusqu'aux organes périphériques, où les pré-cDC poursuivent leur différenciation en cDC CD8⁺ (ou CD103⁺) ou CD4⁺ (ou CD11b⁺). Une des particularités des cDC est leur capacité à migrer des tissus vers les organes lymphoïdes secondaires après avoir capturé et apprêté les antigènes, afin d'initier la réponse lymphocytaire T. En revanche, les macrophages restent généralement au sein des tissus dans lesquels ils se sont différenciés. D'après [142].

Les cDC sont remarquables par leurs capacités avancées de phagocytose et leur faculté à apprêter et présenter les antigènes. En raison d'une demi-vie courte, elles sont constamment renouvelées à partir de précurseurs médullaires sous l'influence de la cytokine Flt3L (*Fms-related tyrosine kinase 3 ligand*). Elles ont la capacité de capturer les antigènes dans les tissus périphériques et de migrer, via les vaisseaux lymphatiques afférents, vers les zones T des organes lymphoïdes secondaires afin d'initier la réponse immunitaire adaptative. Les cDC peuvent se présenter sous deux états fonctionnels. Nouvellement différenciées, les cDC immatures ont une activité d'endocytose prononcée, mais expriment peu à leur surface les molécules du CMH de classe II. Après avoir été en contact avec des antigènes microbiens ou des signaux inflammatoires, les cDC subissent une réorganisation complète cytoplasmique destinée à faciliter le transport des complexes peptide-CMH à leur surface et à exprimer les molécules de co-stimulation. On distingue chez la souris deux sous-types de cDC, selon qu'elles expriment CD8 α ou CD4. Les cDC CD8 α^+ sont particulières par leurs facultés de présentation croisée des antigènes exogènes aux lymphocytes T CD8 $^+$ par l'intermédiaire du CMH de classe I [143]. Les cDC CD4 $^+$ en revanche ont de faibles capacités de présentation croisée mais sont beaucoup plus efficaces pour amorcer la réponse lymphocytaire T CD4 $^+$ via le CMH de classe II [144]. Dans les tissus périphériques, les cDC exprimant CD103 (intégrine $\alpha_E\beta_7$) et CD11b (intégrine α_M) sont les équivalents respectifs de ces deux sous-populations. Chez l'homme, des sous-populations comparables de cDC, encore appelées cellules dendritiques myéloïdes (mDC), ont été décrites. Les mDC CD141 $^+$ (BDCA3, thrombomoduline), également capables de cross-présenter les antigènes, sont les homologues des cDC CD8 α^+ . Les mDC CD1c $^+$ (BDCA1) se rapprochent des cDC CD11c $^+$ murines [145].

Les pDC constituent une entité singulière, de par leur morphologie, leur transcriptome et leur capacité, grâce à l'expression des TLR 7 et 9, à sécréter de grandes quantités d'interférons de type I en présence d'acides nucléiques viraux [146]. Contrairement aux cDC, leur morphologie n'est pas "dendritique" mais se rapproche plutôt de celle des plasmocytes. Les pDC sont caractérisées par l'expression de B220, Siglec-H et Bst-2 chez la souris. Chez l'homme, elles expriment CD303 (BDCA2) et la chaîne α du récepteur à l'IL-3 (CD123). Sur le plan fonctionnel, les pDC n'ont pas de réelle capacité de phagocytose, et le

renouvellement rapide de leurs molécules du CMH de classe II à leur surface les rend peu compétentes pour présenter efficacement les antigènes exogènes aux lymphocytes CD4⁺ [147].

2. Propriétés suppressives

Des cellules dendritiques (DC) ont pu être mises en évidence dans le microenvironnement de nombreux cancers chez la souris et chez l'homme. Il semble que l'impact pronostique de la présence de DC soit plus lié à leur phénotype qu'à l'importance de l'infiltrat. Le microenvironnement tumoral provoque l'accumulation de cellules dendritiques de phénotype suppresseur en recrutant d'une part des DC immatures et en induisant d'autre part un phénotype tolérogène sur les DC matures présentes [148,149].

Les cellules dendritiques recrutées au sein de la tumeur sont bloquées dans leur différenciation par des facteurs produits localement tels que L'IL-6, le M-CSF ou le VEGF (*vascular endothelial growth factor*) [150].

Une étude réalisée dans un modèle de cancer de l'ovaire chez la souris montre que les DC co-expriment PD-1 et PD-L1. Elles inhibent d'une part les lymphocytes exprimant PD-1. Parallèlement, la liaison de PD-L1 exprimé par les cellules tumorales sur les récepteurs PD-1 des DC inhibe l'activation de NF- κ B, la production de cytokines pro-inflammatoires et l'expression de molécules de co-stimulation [151].

Un grand nombre de fonctions suppressives des DC repose par ailleurs sur l'expression d'IDO. La déplétion locale en tryptophane et l'accumulation de métabolites toxiques tels que la kynurénine entraînent une inhibition de la prolifération lymphocytaire T, l'induction et l'activation de Treg et l'induction de l'expression d'IDO par les DC avoisinantes [152].

Les DC sont également capables d'exercer leur activité suppressive à distance au niveau des ganglions drainants par l'induction de Treg via la production de TGF- β et par l'expression d'IDO [153,154].

II. Macrophages

1. Caractéristiques générales

Les macrophages sont des cellules résidentes des tissus dérivées des monocytes circulants. Ils regroupent une grande variété de cellules ayant en commun des capacités de phagocytose et de présentation de l'antigène, mais dont le phénotype et les fonctions dépendent du microenvironnement tissulaire. En conditions normales, ils sont impliqués dans la défense anti-infectieuse, la réparation tissulaire et la régulation de l'immunité adaptative [156].

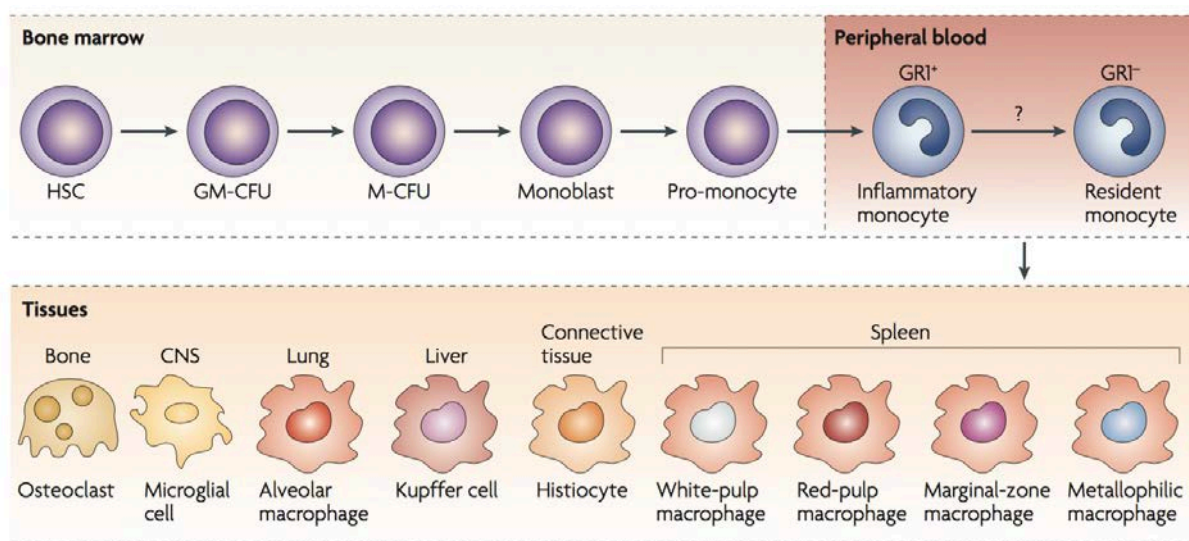


Figure 11. Hétérogénéité des macrophages. Le phénotype et les fonctions des macrophages sont largement influencés par leur environnement tissulaire. D'après [156].

Le concept de polarisation des macrophages a été établi à partir de souches de souris favorisant des réponses immunitaires de type Th1 (C57BL/6) ou Th2 (Balb/c). Ces travaux inauguraux ont permis de montrer que les macrophages issus de souris Th1 métabolisent l'arginine par l'intermédiaire de l'enzyme iNOS pour former du NO, alors que les macrophages issus de souris Th2 vont utiliser préférentiellement l'arginase pour produire de l'ornithine [157]. Les macrophages issus de ces souris ont été baptisés respectivement "M1" ou "M2" selon la voie utilisée préférentiellement pour métaboliser l'arginine. Ces deux types de macrophages ont pu depuis être obtenus *in vitro* à partir de monocytes sanguins de façon "classique" en présence de GM-CSF puis d'IFN- γ pour les premiers, ou de façon "alternative" en présence de M-CSF puis d'IL-4 ou IL-13 et IL-10 pour les seconds [158].

Les macrophages ont ainsi été classés initialement selon une échelle linéaire s'étendant des macrophages M1 produisant préférentiellement l'IL-12 aux macrophages M2 produisant préférentiellement de l'IL-10. Si cette classification dichotomique a le mérite de simplifier la compréhension des rôles ambivalents des macrophages au cours de la réponse anti-tumorale, il s'avère que l'état d'activation des macrophages dessine un spectre beaucoup plus large dépendant des conditions locales [159]. Plus qu'une classification linéaire de type M1-M2, la polarisation des macrophages s'articule ainsi autour de trois fonctions physiologiques fondamentales : la défense de l'hôte, la réparation tissulaire et la régulation de la réponse immunitaire [156].

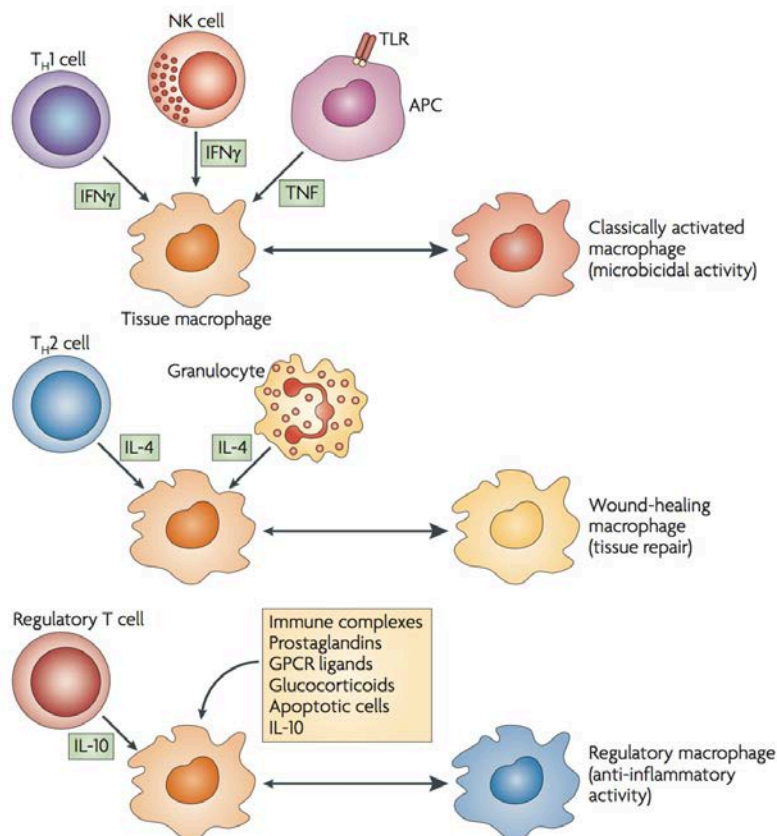


Figure 12. Les cytokines produites par les cellules immunitaires génèrent différents phénotypes de macrophages. Les macrophages activés de façon "classique" en réponse à l'IFN- γ , produit durant la réponse immunitaire adaptative par les cellules de type TH1 ou durant la réponse innée par les cellules NK, ou au TNF- α produit par les cellules présentatrices d'antigènes. Ils ont essentiellement une activité antimicrobienne. Les macrophages impliqués dans la réparation tissulaire sont activés de façon "alternative" par l'IL-4, produite durant la réponse immunitaire adaptative de type TH2 ou durant la réponse immunitaire innée par les granulocytes. Les macrophages régulateurs sont générés en réponse à de nombreux stimuli, incluant les complexes immuns, les prostaglandines, les ligands du récepteur couplé à la protéine G (GPCR), les glucocorticoïdes, les cellules apoptotiques ou l'IL-10. Ils inhibent la réponse immunitaire par la production d'IL-10. D'après [156].

2. Propriétés suppressives

C'est une fois de plus au cours des cancers que les propriétés suppressives des macrophages ont été le plus largement étudiées. Un certain nombre d'études ont décrit les propriétés anti-tumorales des macrophages associés aux tumeurs (TAM), reposant essentiellement sur des mécanismes de cytotoxicité dépendante des anticorps ou des espèces réactives de l'azote [159]. Cependant, il semble qu'une majorité de TAM soient subvertis par le microenvironnement vers un phénotype de type M2, dévolu au développement tumoral [160,161]. Ils proviennent de la différenciation des monocytes, recrutés par la chimiokine CCL2 et le plasminogène produits par la tumeur [162,163]. Une étude réalisée sur un modèle murin d'adénocarcinome pulmonaire a montré qu'elles provenaient également de monocytes CD11b⁺Ly6-C^{hi} issus d'un réservoir extra-médullaire de progéniteurs myéloïdes situé dans la pulpe rouge de la rate [164].

Les TAM inhibent la réponse lymphocytaire T anti-tumorale en régulant la disponibilité des acides aminés du microenvironnement par l'expression d'IDO [165] et d'arginase 1 [166].

Une étude humaine a montré que les macrophages présents dans l'environnement de tumeur de l'ovaire recrutent, via la production de la chimiokine CCL22, des Treg qui inhibent à leur tour la réponse lymphocytaire T [167]. Ils ont également la capacité d'induire localement la différenciation de Treg induits en sécrétant de l'IL-10 et du TGF- β [160].

Les TAM expriment également PD-L1, B7-1 et B7-2, les ligands des récepteurs inhibiteurs PD-1 et CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*), exprimés à la surface des cellules effectrices activées. La liaison de ces ligands inhibe directement la signalisation des récepteurs T et B et les fonctions cytotoxiques des lymphocytes T. Ces mécanismes ont été décrits en particulier au cours du carcinome hépatocellulaire chez l'homme. Cette expression est par ailleurs associée au stade et à la progression tumorale, ainsi qu'à la mortalité [168]. Chez la souris, l'expression de PD-L1 est induite par l'hypoxie qui règne dans certaines régions de la tumeur par l'intermédiaire du facteur de transcription HIF-1 α [169].

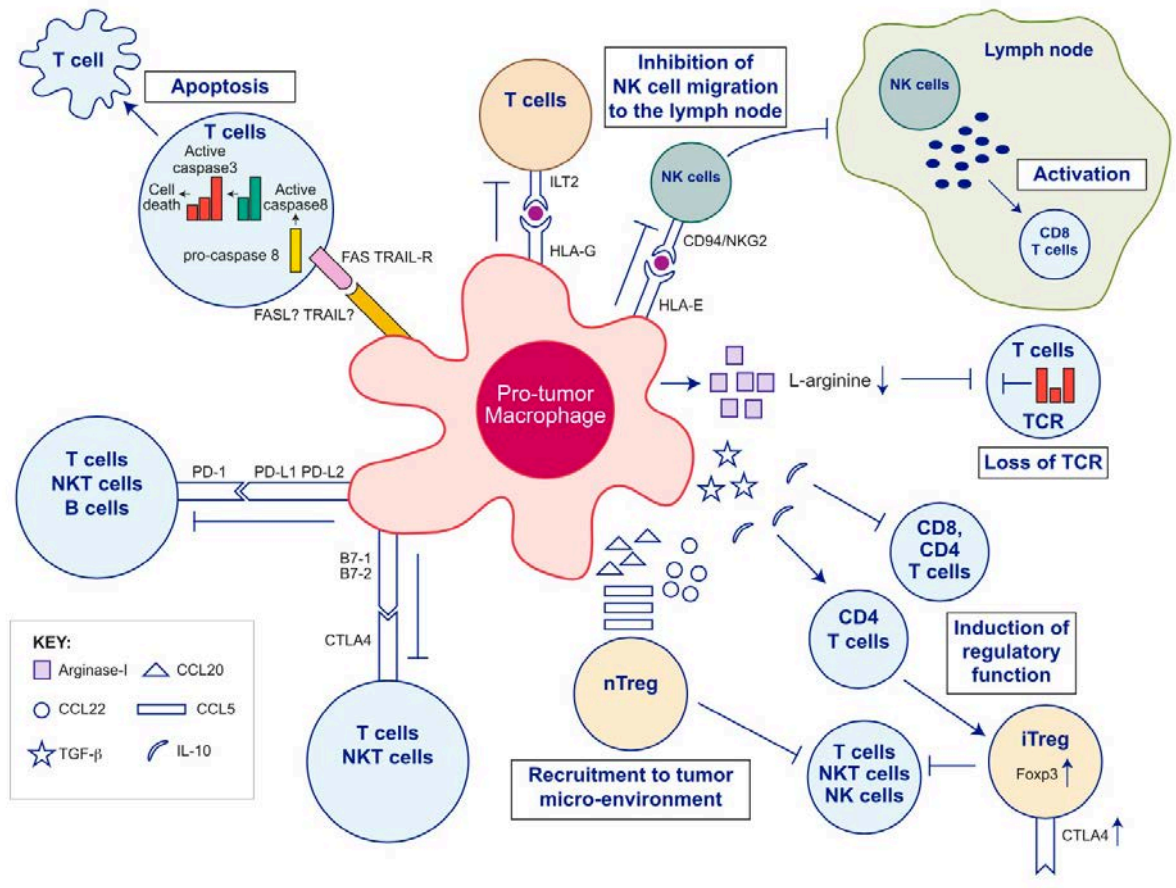


Figure 13. Mécanismes suppresseurs des macrophages associés aux tumeurs. D'après [170].

III. Neutrophiles

1. Caractéristiques générales

Les neutrophiles constituent la principale population de leucocytes circulants (50-70%) [171]. Ils jouent un rôle essentiel dans la réponse inflammatoire innée : phagocytose et bactéricidie médiées par la libération de cytokines, défensines et espèces réactives de l'oxygène. Ils ont également été décrits comme cellules présentatrices d'antigènes [172]. Ils contiennent trois types de granules qui apparaissent de façon séquentielle au long de leur différenciation [173]:

- les granules azurophiles. Elles contiennent essentiellement des protéines destinées à éliminer les micro-organismes phagocytés. Elles possèdent sur leur membrane la molécule CD63 (granulophysine), et contiennent entre autres la myéloperoxydase (MPO) qui participe au "burst" oxydatif, des sérines protéases responsables de la dégradation de composants de la matrice extracellulaire, et l'arginase 1 [174].
- les granules contenant les gélatinases, permettent le stockage des gélatinases matricielles telles que la collagénase (MMP8) ou la gélatinase (MMP9), également capables de dégrader la matrice extracellulaire.
- les granules spécifiques, contenant de la lactoferrine et le lysozyme aux propriétés antibactériennes, ainsi que NGAL (*neutrophil gelatinase-associated lipocalin*).

Les vésicules sécrétoires ont la particularité d'être formées par endocytose. Elles renferment un nombre important de molécules d'adhérence telles que les intégrines $\beta 2$ (CD11b, CD18) qui favorisent leur migration à travers les tissus.

Lors de la réponse immunitaire innée, les polynucléaires neutrophiles ont la capacité d'éliminer les agents pathogènes par dégranulation, phagocytose, production d'anions superoxyde et formation de structures composées d'ADN et protéines appelées NET (*neutrophil extracellular traps*) [172].

Pendant longtemps les polynucléaires neutrophiles ont été considérés comme de simples effecteurs de la réponse immunitaire primaire, qui après avoir accompli leur tâche meurent par apoptose dans les tissus périphériques. Des marquages

isotopiques *in vivo* ont permis de montrer que la demi-vie des polynucléaires neutrophiles était plus proche de 4 jours que des 7-24 heures décrites initialement par des manipulations *ex vivo* [175]. D'autres travaux ont par ailleurs montré qu'ils étaient non seulement capables de revenir dans la circulation sanguine à travers l'endothélium [176] mais également, par l'expression de CCR7 et sous l'influence des chimiokines CCL19 et CCL21, de migrer dans les organes lymphoïdes secondaires pour présenter des antigènes capturés en périphérie [177,178].

2. Propriétés suppressives

Les polynucléaires neutrophiles ne sont pas confinés à l'inflammation et la défense antimicrobienne, et un nombre croissant de données décrivent des fonctions essentielles de régulation de la réponse immunitaire.

Au cours des cancers, ils sont impliqués dans une réaction complexe, comportant des contingents à la fois anti- et pro-tumoraux. D'une part, ils limitent la progression tumorale par cytotoxicité directe, en favorisant la production de médiateurs anti-tumoraux et en prévenant la diffusion métastatique [179-181]. A l'opposé, ils peuvent exercer un effet pro-tumoral en favorisant l'angiogenèse, la dissémination et l'implantation de métastases [182-185]. Les mécanismes par lesquels les tumeurs induisent une neutrophilie ne sont pas encore très bien connus, bien que la production de GM-CSF soit souvent décrite [186]. La neutrophilie et un ratio neutrophiles / lymphocytes élevé sont d'ailleurs associés à un pronostic plus péjoratif au cours de nombreux cancers [187].

Fridlender a ainsi montré que le TGF- β produit par le microenvironnement tumoral était à l'origine d'une polarisation des polynucléaires neutrophiles d'un profil anti-tumoral N1 vers un phénotype de type pro-tumoral N2 [188]. Des travaux récents ont mis à jour l'existence d'une grande plasticité au sein du compartiment granulocytaire. En effet, il existe chez les patients atteints de cancer une population de neutrophiles de faible densité co-purifiés avec les cellules mononucléées après centrifugation sur gradient de densité. Cette population a été nommée *Low density neutrophils/granulocytes* (LDN / LDG) par opposition aux neutrophiles de haute densité (*High density neutrophils/granulocytes*, HDN / HDG) sédimentés dans le

culot. Les LDN sont composés de deux sous-populations : un contingent de neutrophiles immatures proches du phénotype MDSC, et un contingent mature issu des HDN par un mécanisme dépendant du TGF- β . Cette transition de HDN vers LDN s'accompagne d'une perte des capacités anti-tumorales et de l'acquisition de propriétés immunosuppressives [189].

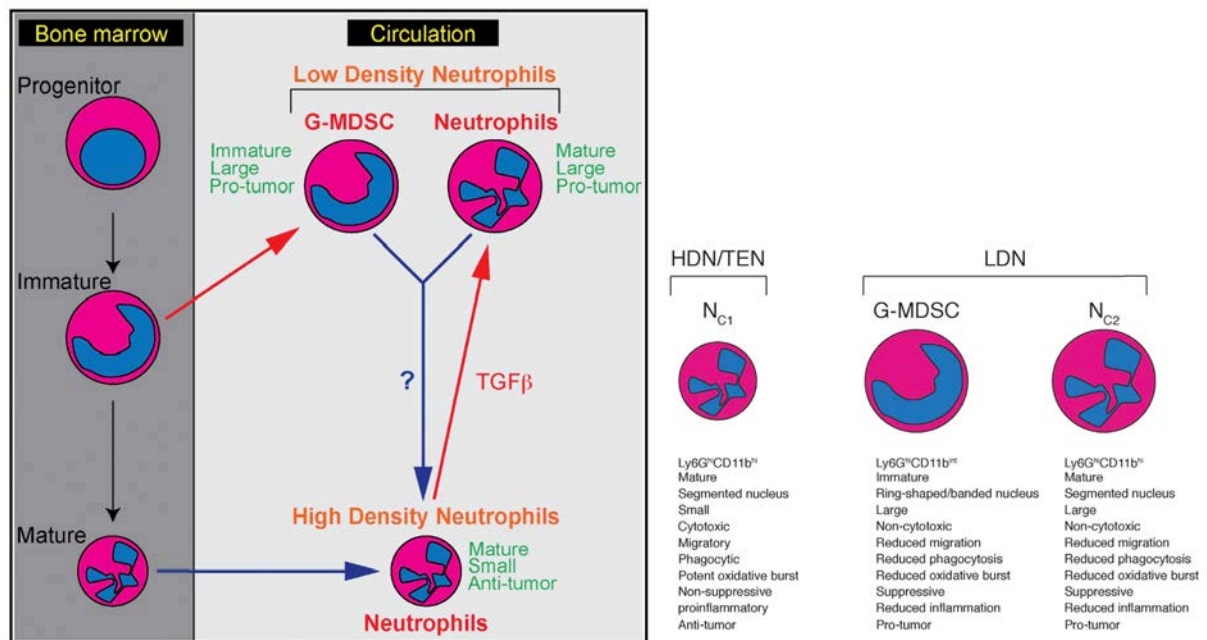


Figure 14. Différentes sous-populations de polynucléaires neutrophiles au cours du cancer chez la souris. Les neutrophiles circulants Ly6G⁺CD11b⁺ peuvent être distingués selon leur densité. Les neutrophiles de haute densité (HDN), sont de type N1 et ont des propriétés anti-tumorales. Les polynucléaires de faible densité (LDN) sont constitués de cellules matures et immatures. Les cellules immatures, comparables aux G-MDSC, ont des propriétés immunosuppressives contribuant au développement tumoral. Les neutrophiles de faible densité matures, de type N2, dérivent des neutrophiles N1 sous l'effet du TGF- β , ont des propriétés inflammatoires et cytotoxiques réduites et acquièrent des fonctions suppressives. D'après [189]

Plusieurs mécanismes sont impliqués dans la régulation de la réponse immunitaire anti-tumorale. La libération de l'arginase 1 contenue dans les granules participe à l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T. Au cours du cancer bronchique non à petites cellules chez l'homme, la dégranulation est en particulier induite par le TNF- α et l'IL-8 produits par les cellules tumorales [190].

Récemment, le rôle tolérogène des polynucléaires neutrophiles a également été décrit au cours de la grossesse. Il est lié à la déplétion en arginine par l'arginase

produite par des polynucléaires de faible densité isolés parmi les cellules mononucléées du sang maternel et du sang de cordon [191,192].

Chez l'homme, les polynucléaires neutrophiles jouent également un rôle dans la régulation des processus inflammatoires aigus ou chroniques. Ainsi, au cours de l'infection VIH, les polynucléaires périphériques expriment fortement PD-L1. Cette expression est induite par le virus directement, les ligands des TLR 7/8, le LPS et l'IFN- α . *In vitro*, les polynucléaires neutrophiles étaient capables d'inhiber la prolifération des lymphocytes T en interagissant avec PD-1 et par la production de ROS. Par ailleurs, l'injection de LPS à des volontaires sains provoque l'apparition d'une sous-population de polynucléaires neutrophiles exprimant fortement CD16 (FC γ RIII, récepteur de faible affinité du fragment Fc des immunoglobulines G), CD11b (intégrine α M) et CD11c (intégrine α X) et faiblement CD62L (L-sélectine). Cette fraction cellulaire était spécifiquement capable d'inhiber la prolifération des lymphocytes T en formant une synapse par l'intermédiaire du CD11b et en libérant du peroxyde d'hydrogène. Cette population cellulaire a également pu être mise en évidence chez des patients polytraumatisés [193].

IV. MDSC

Le concept de MDSC fait référence à un groupe hétérogène de cellules myéloïdes, à divers stades de maturité. Ces cellules ont la particularité d'émerger dans des contextes pathologiques variés, principalement le cancer et les pathologies inflammatoires chroniques. Leur activation conduit à l'expression de facteurs immunosuppresseurs, en particulier l'arginase 1 et iNOS et à la production de NO et de ROS, aboutissant à une puissante inhibition des fonctions lymphocytaires T. L'étude de ce compartiment cellulaire est rendue particulièrement complexe par le fait qu'elles ne possèdent aucun marqueur phénotypique spécifique. Le concept de MDSC semble donc faire référence à un état fonctionnel particulier en contexte pathologique plutôt qu'à une sous-population myéloïde bien définie.

1. Historique et terminologie

L'histoire de la découverte des MDSC débute à la fin des années 60 par la description chez les souris et les patients atteints de cancers d'une augmentation du nombre de polynucléaires neutrophiles circulants [194]. Cette neutrophilie constituée pour une grande partie de cellules immatures et proportionnelle à la taille et l'ancienneté de la tumeur a ainsi été qualifiée de "myélémie associée aux tumeurs" ou encore "réaction leucémoïde" [195].

Des études ont ensuite commencé à rapporter la notion d'une activité suppressive vis-à-vis de la réponse lymphocytaire T, portée par des cellules dépourvues de marqueurs phénotypiques ("non-T, non-B ni macrophages"), qualifiées de cellules suppressives naturelles (*natural suppressor cells*), *Veto cells* ou *Null cells* [196]. Elles seront plus tard caractérisées chez la souris comme étant des progéniteurs myéloïdes exprimant les antigènes CD34, GR1 et CD11b.

Ces cellules progénitrices sont naturellement présentes dans la moelle osseuse des souris saines, mais sont alors dépourvues de toute activité suppressive. C'est seulement lorsqu'elles sont activées en périphérie qu'elles induisent une lymphopénie, une diminution de la prolifération des lymphocytes T, une diminution de l'induction de lymphocytes cytotoxiques et de la réponse immunitaire anti-tumorale [197]. Elles sont induites en particulier par les facteurs de croissance

hématopoïétiques de type *granulocyte-* ou *granulocyte-macrophage colony stimulating factors* (G-CSF ou GM-CSF) produits par la tumeur ou administrés de façon exogène [198,199].

C'est en 1995 que sont décrites pour la première fois, chez des patients atteints de carcinomes épidermoïdes ORL, des cellules myéloïdes immatures CD34⁺ capables d'inhiber la sécrétion d'IL-2 par les lymphocytes intra-tumoraux [198]. Le caractère immature de ces cellules, leurs capacités suppressives des fonctions lymphocytaires T et leur association à la production de GM-CSF par le microenvironnement tumoral ont rapidement suggéré leur homologie avec les MDSC murines. D'autres études ont décrit chez des patients recevant du G-CSF et du GM-CSF dans le cadre d'une autogreffe de moelle osseuse l'apparition de monocytes CD14⁺ capables d'inhiber les fonctions des lymphocytes T, voire d'induire leur apoptose [200-203].

À la même époque, d'autres équipes ont décrit une population de cellules granulocytaires co-purifiées avec les cellules mononucléées après centrifugation en gradient de densité. Ces cellules étaient présentes chez les patients atteints de cancer du pancréas, du côlon ou du sein, mais pas chez les volontaires sains [204,205]. Elles ont été caractérisées plus finement chez un groupe de patients atteints de carcinome rénal métastatique. Elles possèdent la morphologie et le phénotype de polynucléaires neutrophiles (15⁺, CD11b⁺, CD14⁻), exprimant fortement CD66b, CD11b et VEGFR1, mais faiblement CD62L et CD16 [206].

Ces cellules, caractérisées par l'absence d'expression de marqueurs de lignée (CD3, CD14, CD19, CD57), d'HLA-DR et CD33, mais exprimant les marqueurs myéloïdes CD33 et CD13, ont d'abord été appelées *Immature myeloid Cells (iMCs)* ou encore *Myeloid Suppressor Cells (MSCs)* [207-210].

En 2007, *Dmitry Gaborovich* a posé les fondements de la terminologie des MDSC et a proposé d'abandonner les termes IMC ou MSC. En effet, le premier fait référence à des précurseurs myéloïdes normaux, dépourvus d'activité suppressive. Le second est quant à lui trop générique et pourrait prêter à confusion en faisant référence à d'autres types de cellules myéloïdes matures. Il est par ailleurs couramment utilisé pour désigner les cellules souches mésenchymateuses (*Mesenchymal Stem Cells*).

Le concept de "cellules suppressives d'origine myéloïde" (*Myeloid-derived suppressor cells*) a donc été proposé et adopté par un grand nombre d'équipes de recherche [211].

De façon générale, les MDSC ont été décrites comme étant issues d'un progéniteur myéloïde commun qui donne également naissance aux cellules dendritiques, monocyte, macrophages et granulocytes.

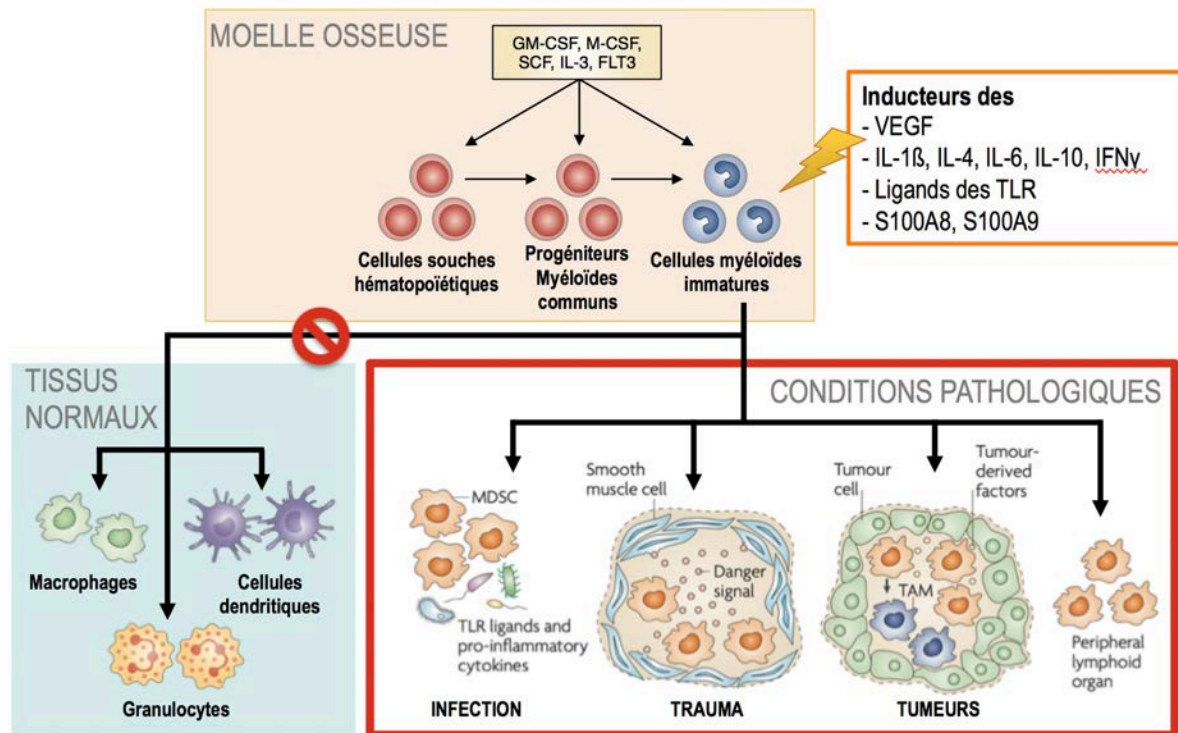


Figure 15. Description initiale des MDSC. Contrairement aux cellules myéloïdes normales bien différenciées, les MDSC sont constituées d'un ensemble hétérogène de cellules à différents stades de la myélopoïèse. Cette hétérogénéité dépend essentiellement du contexte pathologique et en particulier de facteurs libérés par les tumeurs. Ces facteurs contrôlent ainsi le recrutement, l'activation et les propriétés suppressives des MDSC. Adapté de [139].

2. Définitions / Phénotypes

a. Chez la souris

Les MDSC ont pu être identifiées dans la moelle osseuse, le foie, le sang et les tumeurs de souris, à partir de marqueurs phénotypiques et de leurs capacités à inhiber l'activation des lymphocytes T.

Les MDSC murines expriment toutes à leur surface les marqueurs GR1 et CD11b (intégrine α M). L'antigène de différenciation myéloïde Gr1 possède deux isoformes, Ly6C et Ly6G, permettant de distinguer deux sous-populations de MDSC. Les cellules CD11b⁺Ly6C^{high}Ly6G⁻ ont une morphologie de type monocytaire, expriment préférentiellement iNOS (NOS2) et ont été qualifiées de MDSC monocytaires (Mo-MDSC) [212]. Chez les souris naïves, ce phénotype définit les monocytes inflammatoires, possédant des capacités migratoires mais dépourvues de propriétés suppressives [115]. Les cellules CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C^{low} ont quant à elles une morphologie de type granulocytaire, expriment fortement l'arginase 1 (ARG1), produisent des ROS et ont ainsi été appelées MDSC granulocytaires (G-MDSC ou Polymorphonuclear (PMN)-MDSC).

Dans les modèles tumoraux murins, les deux sous-populations de MDSC sont augmentées. Le sous-type granulocytaire est généralement prédominant mais il possède un potentiel suppresseur moins prononcé que le sous-type monocytaire. Seules les M-MDSC ont la capacité de se différencier en cellules dendritiques matures ou macrophages [212]. Plus récemment, il a été montré qu'elles étaient également capables de se différencier en G-MDSC [213]. Par ailleurs, les MDSC situées au sein de la tumeur sont plus suppressives que leurs homologues du sang ou de la rate.

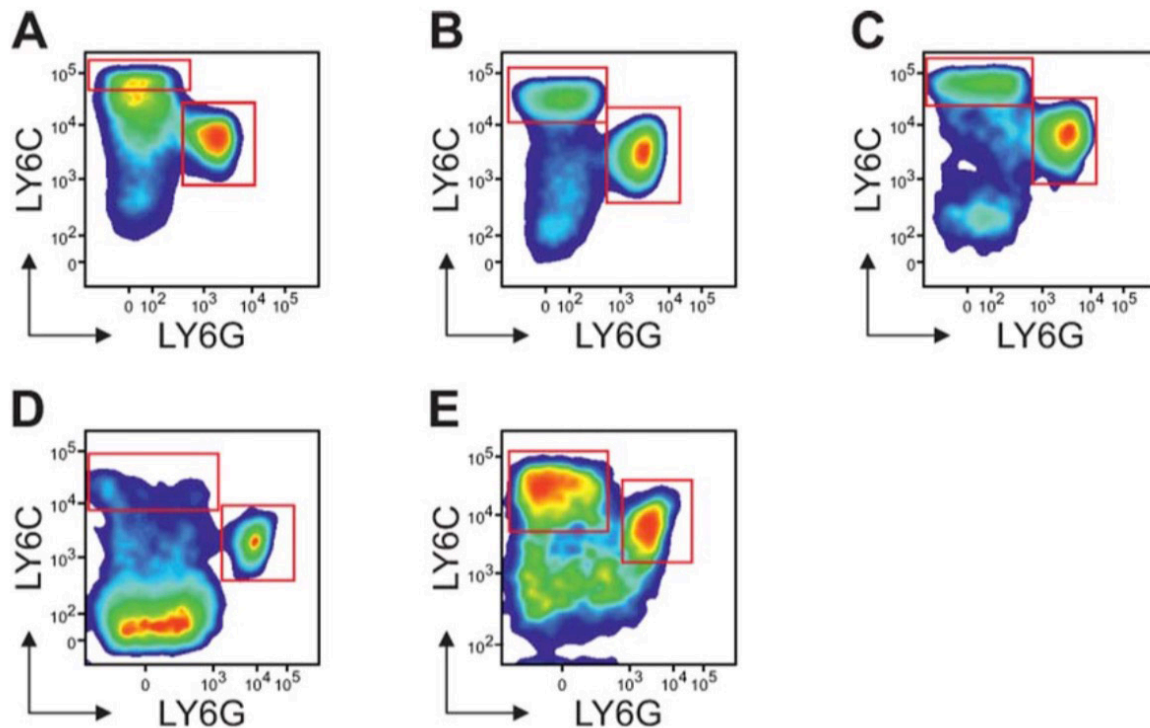


Figure 16. Analyse phénotypique des MDSC par cytométrie en flux chez la souris. Graphes bi-paramétriques montrant la distribution des M-MDSC (Ly6ChighLy6G-) et G-MDSC (Ly6CintLy6G+) dans la moelle osseuse (A), le sang (B), la rate (C), les ganglions (D) et la masse tumorale (E) de souris atteintes de fibrosarcome MCA203. Analyse réalisée sur les cellules CD11b⁺ après exclusion des doublets et des cellules mortes. Adapté d'après [214]

b. Chez l'homme

Les MDSC ont été décrites dans un grand nombre de cancers solides (carcinomes ORL, mélanome malin, cancers colorectaux, de l'œsophage, du poumon, du sein, du rein, de la vessie, adénocarcinome de prostate ou pancréatique...) et hémopathies malignes (myélome multiple, lymphomes non-hodgkiniens) (cf. tableau).

Le marqueur murin Gr1 n'ayant pas d'équivalent chez l'homme, les MDSC humaines sont caractérisées par l'expression des marqueurs myéloïdes communs CD11b et CD33, de l'antigène de différenciation monocytaire CD14, de l'antigène granulocytaire CD15 et expriment peu ou pas les molécules de présentation de l'antigène HLA-DR. Comme chez la souris, elles peuvent être subdivisées en deux contingents : MDSC monocytaires CD14⁺CD11b⁺CD15⁻IL4Rα⁺HLA-DR^{low/-}CD33⁺, et MDSC granulocytaires CD11b⁺CD14⁻CD15⁺HLA-DR⁻CD33⁺ [214]. Dans la mesure où aucun de ces phénotypes n'est spécifique aux MDSC, leur caractérisation définitive nécessite la démonstration de leur activité suppressive.

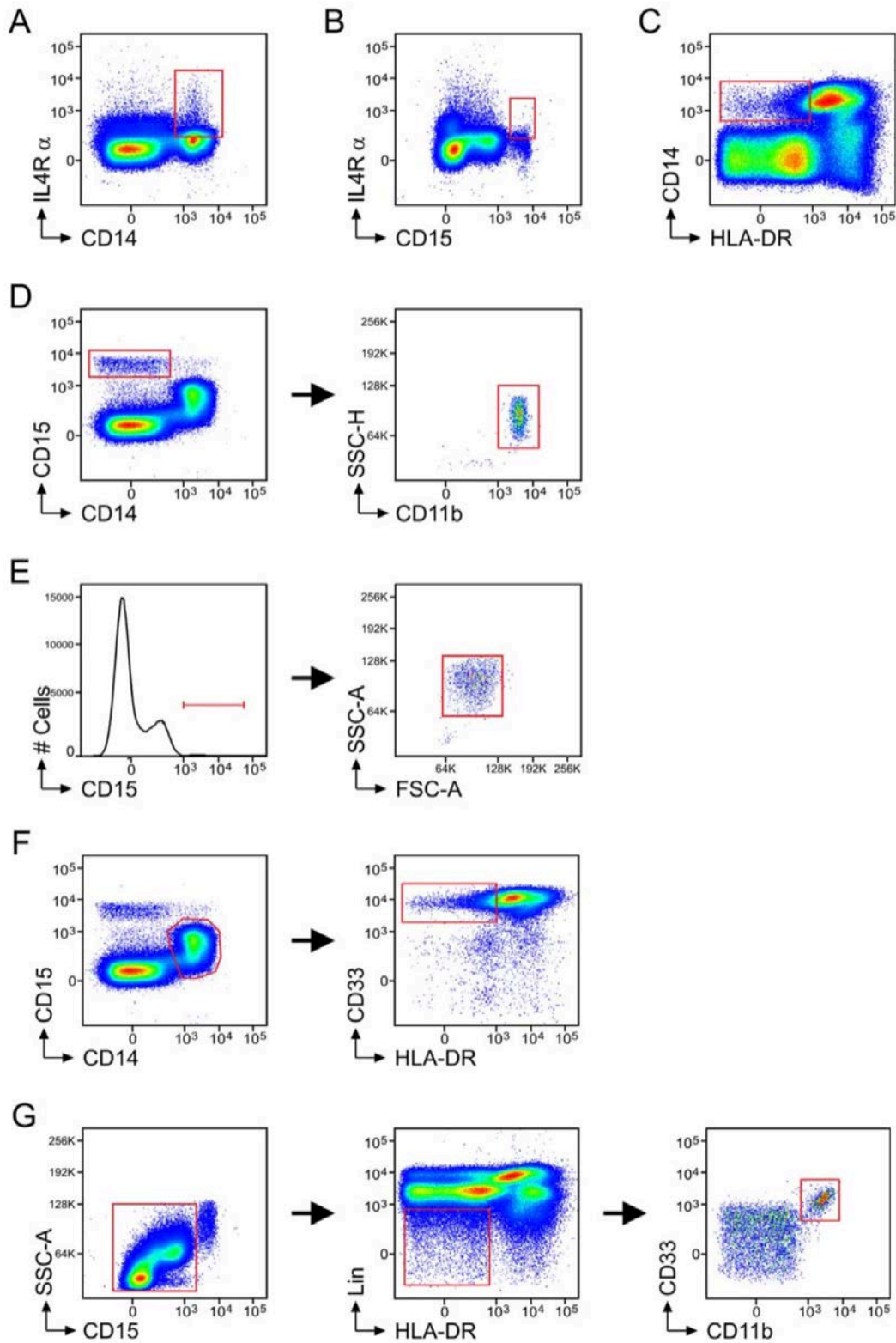


Figure 17. Analyse phénotypique des MDSC par cytométrie en flux chez l'homme. Cellules mononucléées de volontaires sains. Les graphes ont été obtenus après exclusion des doublets et des cellules mortes. Trois populations de M-MDSC : $CD14^+IL4R\alpha^+$ (A), $CD14^+HLA-DR^{low/-}$ (C) et $CD15^-/CD14^+/CD33^{high}/HLA-DR^{low/-}$ (F). Trois populations de G-MDSC : $CD15^+IL4R\alpha^+$ (B), $CD14^-CD15^+CD11b^+$ (D) et $CD15^{high}FSC^{low}SSC^{high}$ (E). Une population de MDSC immatures $Lin^-HLA-DR^-CD33^+CD11b^+$ (G). D'après [214].

Tableau 1. Phénotypes MDSC au cours des cancers chez l'homme

Type	Phénotype	Tumeur	Référence	
MDSC monocytaires	CD14 ⁺ HLA-DR ^{lo/-}	Mélanome malin	[215-219]	
		Carcinomes épidermoïdes ORL	[220]	
		Poumon	[221]	
		Carcinome hépatocellulaire	[222,223]	
		Cancer du rein	[224,225]	
		Carcinome urothélial de vessie	[226]	
		Adénocarcinome de prostate	[227,228]	
		Hémopathies malignes	[229-233]	
		Cancers gastro- intestinaux	[234,235]	
		CD14 ⁺ IL4Rα ⁺	Mélanome malin	[236]
			Adénocarcinome colique	[236]
			Cancer du rein	[224]
		CD14 ⁺ HLA-DR ⁻ IL4Rα ⁺	Glioblastome	[237]
		CD14 ⁺ CD11b ⁺ CD33 ⁺ CD34 ⁺	Cancer de l'ovaire	[238]
		CD14 ⁺ CD11b ⁺ CD33 ⁺	Cancer du poumon	[239]
		CD33 ⁺ HLA-DR ⁻	Cancer du rein	[240]
CD33 ⁺ CD14 ⁺ CD11b ⁺ HLA- DR ^{lo/-}	Cancer du sein	[241]		
MDSC immatures	Lin ⁻ HLA-DR ⁻	Cancer du rein	[225,242]	
		Lin ⁻ HLA-DR ⁻ CD33 ⁺	Mélanome malin [243] Carcinome hépatocellulaire [244] Cancer du rein [210,224] Cancer du poumon [207,245] Carcinomes épidermoïdes ORL [207] Cancer du sein [207,246] Cancer du poumon [246] Cancer de la prostate [246]	
	Lin ⁻ HLA-DR ⁻ CD33 ⁺ CD11b ⁺	Mélanome malin	[217,247]	
		Glioblastome	[248]	
		Cancer du sein	[249]	
		Cancers gastro- intestinaux	[250-252]	
		Cancer du pancréas	[250,253]	
		Cancer du pancréas	[254]	
	MDSC granulocytaires	Lin ⁻ CD33 ⁺ CD11b ⁺ CD15 ⁺	Cancer du pancréas	[254]
		Lin ⁻ HLA-DR ⁻ CD33 ⁺ CD11b ⁺ CD14 ⁻	Lymphome de Hodgkin	[233]
		Lin ⁻ HLA-DR ⁻ CD33 ⁺ CD11b ⁺ CD14 ⁻ CD15 ⁺	Cancers gastro- intestinaux	[255]
		CD11b ⁺ CD14 ⁻ CD33 ⁺	Mélanome malin	[219]
			Carcinomes épidermoïdes ORL	[256,257]
Cancer du poumon	[239,245,258,259]			
	Hémopathies malignes	[230,260]		

Tableau 1 (suite). Phénotypes MDSC au cours des cancers chez l'homme

Type	Phénotype	Tumeur	Référence
MDSC granulocytaires (suite)	CD33 ⁺ CD11b ⁺ CD15 ⁺	Cancer du poumon	[261]
	CD33 ⁺ CD11b ⁺ HLA-DR ⁻	Adénocarcinome colique	[262]
	CD11b ⁺ CD33 ⁺ CD14 ⁻ CD34 ⁺ HLA-DR ⁻	Hémopathies malignes	[233]
	CD11b ⁺ CD14 ⁻ HLA-DR ⁻ CD33 ⁺ CD15 ⁺	Hémopathies malignes	[263]
	CD33 ⁺ HLA-DR ⁻ CD15 ⁺	Cancers gastro- intestinaux	[234]
		Cancer du rein	[240]
	CD15 ⁺ IL4Ra ⁺	Mélanome malin	[236]
		Adénocarcinome colique	[236]
		Cancer du rein	[224]
	CD15 ⁺ FSC ^{lo} SSC ^{hi}	Cancer du rein	[224]
	CD11b ⁺ CD15 ^{hi} CD33 ⁺	Carcinome urothélial de vessie	[264]
	CD14 ⁻ CD15 ⁺	Cancer du pancréas Cancer du côlon Cancer du pancréas	[204]
	CD11b ⁺ CD14 ⁻ CD15 ⁺	Cancer du rein	[205,206,224]
	CD66b ⁺ SSC ^{hi}	Carcinomes épidermoïdes ORL	[265]
		Cancer du poumon	[265]
		Carcinomes urothéliaux	[265]
	CD11b ⁺ CD15 ⁺	Cancer du pancréas	[266]

Tableau 2. Phénotypes MDSC au cours des pathologies non tumorales

Type	Phénotype	Pathologie	Référence
MDSC monocytaires	CD14 ⁺ HLA-DR ^{lo/-}	Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin	[267]
		Pathologie médicale aiguë (hors sepsis)	[268]
		Sepsis	[269]
	CD14 ⁺ HLA-DR ^{lo/-} CD11b ⁺ CD33 ⁺	Infection VHC	[270,271]
	CD14 ⁺ HLA-DR ^{lo/-} CD11b ⁺ CD33 ^{+/hi} CD15 ⁻	Infection VIH	[272]
MDSC granulocytaires	CD15 ⁺	Infection VIH	[273,274]
	CD66b ⁺ CD11b ⁺ CD15 ⁺	Choc septique	[275]
	Lin ⁻ HLA-DR ⁻ CD33 ⁺	Pathologie médicale aiguë (hors sepsis)	[268]
	CD11b ⁺ CD14 ⁻ HLA-DR ⁻ CD33 ⁺ CD15 ⁺	Sepsis	[269]
	CD33 ^{hi} CD66b ^{hi} IL4Rα ^{int} HLA-DR ^{dim}	Mucoviscidose	[276]

3. Expansion des MDSC

Le rôle essentiel de l'inflammation dans l'expansion des MDSC est apparu lorsque des études ont montré que les cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , IL-6 et les prostaglandines E2 (PGE2) induisaient l'accumulation de cellules myéloïdes et déclenchait leur activité suppressive [277-280].

a. Vascular Endothelial Growth Factor

Le VEGF est un facteur de croissance pro-inflammatoire produit par les cellules tumorales qui stimule l'angiogenèse. Il bloque le développement des cellules dendritiques en inhibant l'activation de NF- κ B et induit parallèlement le recrutement des MDSC par chimiotactisme [281]. Les MDSC ayant la capacité de produire elles-mêmes du VEGF, elles peuvent participer à la néoangiogenèse tumorale et entretenir leur recrutement par une boucle autocrine [282].

b. Granulocyte Colony-Stimulating Factor et Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor

Le GM-CSF est un facteur de croissance nécessaire à la différenciation des cellules dendritiques *in vivo* et *in vitro* [283]. Le GM-CSF produit par les cellules tumorales est également capable d'induire le recrutement de MDSC dans les organes lymphoïdes secondaires ainsi que dans le microenvironnement tumoral [198,207]. Dans des études de vaccination anti-tumorale utilisant des lignées adjuvantes productrices de GM-CSF destinées à favoriser la différenciation des cellules dendritiques et la présentation des antigènes tumoraux, il a été montré que de fortes concentrations de GM-CSF induisaient au contraire une forte immunosuppression systémique via l'induction de MDSC [284].

Le G-CSF joue quant à lui un rôle important dans la mobilisation des cellules souches de la moelle osseuse et la différenciation des lignées granuleuses [285]. L'administration de G-CSF à des souris porteuses de cancer favorise la croissance tumorale, l'angiogenèse et la mobilisation de MDSC [286]. La production de G-CSF par l'environnement tumoral lui-même induit le recrutement de G-MDSC et le blocage

de la production de G-CSF inhibe à la fois l'expansion des MDSC et la croissance tumorale [287].

c. Prostaglandine E2 et Cyclooxygénase 2

La prostaglandine E2 est un puissant médiateur inflammatoire généré par la cyclooxygénase 2 (COX-2) à partir de l'acide arachidonique. Elle favorise la croissance tumorale en stimulant l'angiogenèse et la prolifération des cellules tumorales et protège les cellules de l'apoptose. La PGE2 peut ainsi être produite à la fois par les cellules tumorales et les cellules non-tumorales infiltrant les tumeurs.

La PGE2 induit la différenciation des MDSC. Le traitement de souris porteuses de tumeurs par un inhibiteur de la COX-2 bloque la différenciation des MDSC et ralentit la progression tumorale [279].

La PGE2 agit sur les MDSC par l'intermédiaire de récepteurs aux prostanoïdes (EP1 à 4). Chez les souris déficientes en EP2, la progression tumorale est ralentie et la proportion de MDSC réduite au sein du microenvironnement tumoral [279]. De façon similaire, le blocage des PGE2 ou du récepteur EP4 réduit la production d'arginase 1 par les MDSC. Chez l'homme, la PGE2 favorise la différenciation de cellules progénitrices en MDSC exprimant fortement NOS2, ARG1, IL-10 et IL-4R α [238]. Ainsi, chez l'homme et la souris la PGE2 joue un rôle important aussi bien dans la différenciation que dans la régulation des mécanismes suppresseurs des MDSC.

d. Fraction du complément C5a

La fraction C5a, encore appelée anaphylatoxine, est un composant pro-inflammatoire du complément et en particulier de la voie des lectines. La libération de C5a déclenche la dégranulation des mastocytes, augmente la perméabilité vasculaire et stimule la contraction des cellules musculaires lisses. Au sein du microenvironnement tumoral, le C5a recrute les MDSC par chimiotactisme grâce à son récepteur spécifique et induit la production de ROS et ARG1 [288].

e. Protéines S100A8/A9

Les protéines S100A8/A9 sont des alarmines, ou DAMP. Ce sont des protéines liant le calcium situées dans le cytoplasme ou le noyau des cellules myéloïdes, libérées en cas de dommages cellulaires, d'infection ou d'inflammation. La production de S100A8/A9 par le microenvironnement tumoral entretient l'inflammation en recrutant des leucocytes par chimiotactisme. Parmi ces cellules, les MDSC sont recrutées via leur récepteur RAGE (*Receptor for advanced-glycation end product*). Chez les souris porteuses de tumeurs, le blocage de la liaison de S100A8/A9 sur les MDSC *in vivo* réduit le nombre de MDSC dans le sang et les organes lymphoïdes secondaires. Les MDSC ont également la capacité de libérer des protéines S100 et d'amplifier leur accumulation par une boucle autocrine [289].

f. High-Mobility Group Box 1

HMGB1 est quantitativement la deuxième protéine intracellulaire, initialement décrite comme une protéine nucléaire capable de migrer rapidement au cours d'une électrophorèse. Elle est libérée par les cellules myéloïdes dans les contextes d'infection ou d'inflammation stérile tels que les cancers ou les traumatismes, et appartient à ce titre au groupe des alarmines. Elle agit par l'intermédiaire de nombreux récepteurs tels que la thrombospondine, CD24, TLR2, TLR4, TLR7, TLR9 et RAGE. Elle est composée de deux domaines fonctionnels, les boîtes A et B, et d'une queue d'acides aminés chargés négativement, capable d'interagir avec les deux boîtes et de moduler leur fonction.

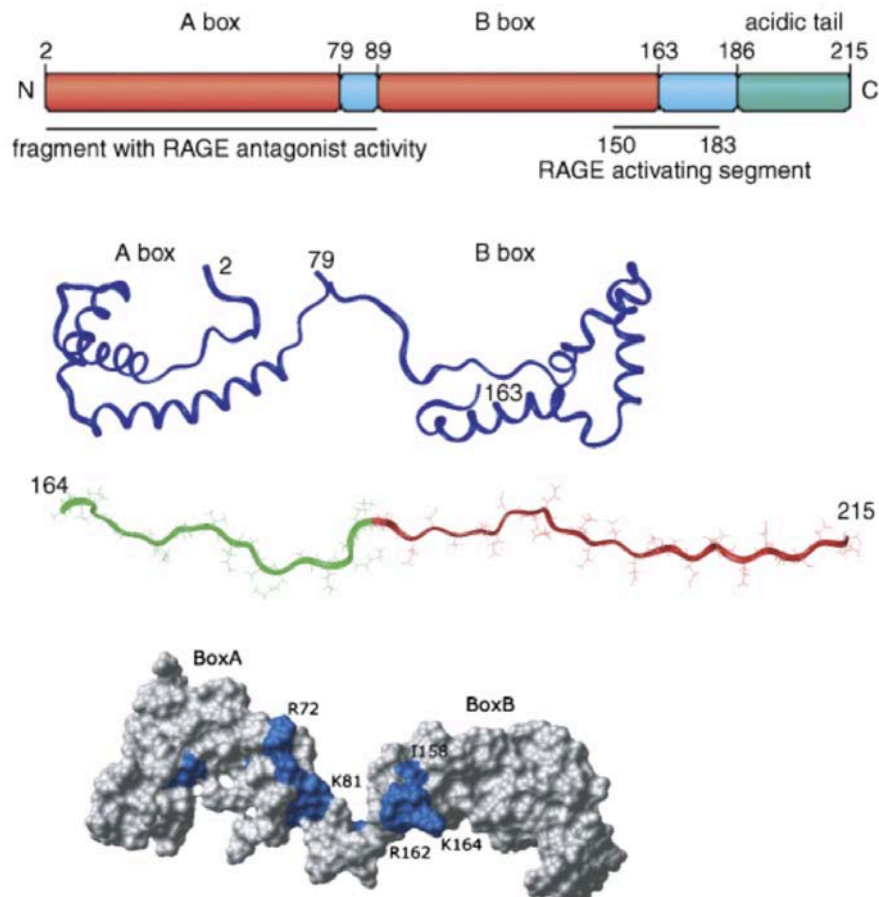


Figure 18. Structure d'HMGB1. HMGB1 est une protéine nucléaire de 25 kDa. Elle contient deux domaines de liaison à l'ADN appelés boîtes A et B (rouge) et une queue d'acides aminés chargés négativement (vert). Lorsqu'elle est isolée du reste de la molécule, la boîte A agit comme un antagoniste spécifique d'HMGB1. D'après (Bianchi et al. 2007).

La boîte A est un antagoniste de RAGE et inhibe la libération d'IL-1 β et TNF α . La boîte B est un agoniste de RAGE et induit une réponse pro-inflammatoire [290]. La liaison de la boîte B sur les récepteurs TLR4 des macrophages induit la libération d'IL-1 β , IL-6, TNF- α , MIP-2 et IL-10. Les effets pro- ou anti-inflammatoires induits par HMGB-1 dépendent de son état d'oxydo-réduction. Dans l'environnement extracellulaire normal, la boîte A est en conformation inactive et seule la boîte B avec des effets pro-inflammatoires est active. En contexte d'inflammation, le stress oxydatif induit un changement de conformation et permet à la boîte A d'induire la résolution de la réaction inflammatoire [291].

HMGB1 est fortement impliquée dans la progression tumorale, par un effet direct et surtout par l'intermédiaire des MDSC. En effet, elle induit à la fois leur

différenciation, leur recrutement et leur effet suppresseur par l'intermédiaire de l'expression d'IL-10 et ADAM17 (*A disintegrin and metalloproteinase 17*), une protéase qui clive la L-sélectine (CD62L) sur les lymphocytes T naïfs, les empêchant de migrer dans les ganglions pour être activés [292].

g. IL-1 β et IL-6

La découverte du rôle de l'IL-1 β dans l'accumulation et l'induction de l'activité suppressive des MDSC a permis de mettre à jour les liens étroits entre inflammation et immunosuppression au cours du cancer.

Les souris à qui on inocule des cellules tumorales produisant de l'IL-1 β présentent un plus grand nombre de MDSC Gr1⁺CD11b⁺ que les souris portant les mêmes tumeurs mais ne produisant pas d'IL-1 β [280]. Des taux élevés de MDSC persistent même après ablation de la tumeur, suggérant que les MDSC générées sous l'effet de l'IL-1 β ont une durée de vie plus importante que celles générées par un environnement moins inflammatoire. [277]. Des résultats similaires ont été observés avec des tumeurs produisant de l'IL-6. Les MDSC exprimant le récepteur de l'IL-6 mais pas celui de l'IL-1, les effets de l'IL-1 β sur les MDSC pourraient être médiés par l'IL-6. [278].

h. IL-17

L'IL-17 est une cytokine pro-inflammatoire sécrétée par les lymphocytes CD4 Th17 et CD8 Tc17. Chez les souris déficientes en IL-17, le nombre de MDSC est diminué et la croissance tumorale est inhibée. L'administration d'IL-17 restaure le nombre de MDSC [293]. Chez les patients atteints de cancers gastro-intestinaux, il existe une forte corrélation entre les taux plasmatiques d'IL-17 et le nombre de MDSC circulantes [294]. L'IL-17 peut induire directement le recrutement des MDSC via leur récepteur spécifique, ou indirectement en stimulant la production d'IL-6.

i. Mécanismes moléculaires

La plupart des facteurs impliqués dans l'expansion des MDSC déclenchent des voies de signalisation mettant en jeu les protéines JAK (*Janus kinase*) et STAT (*Signal transducer and activator of transcription*). Ces molécules de signalisation sont impliquées dans la survie, la prolifération, la différenciation cellulaire et l'apoptose [295].

STAT3 est le principal facteur de transcription qui régule l'expansion des MDSC. Son activation anormale et persistante au sein des progéniteurs myéloïdes empêche leur différenciation en cellules myéloïdes matures et favorise ainsi l'expansion des MDSC [139]. STAT3 est également impliqué dans l'expression des protéines S100A8 et S100A9 par les MDSC, facilitant leur accumulation par un mécanisme autocrine [296].

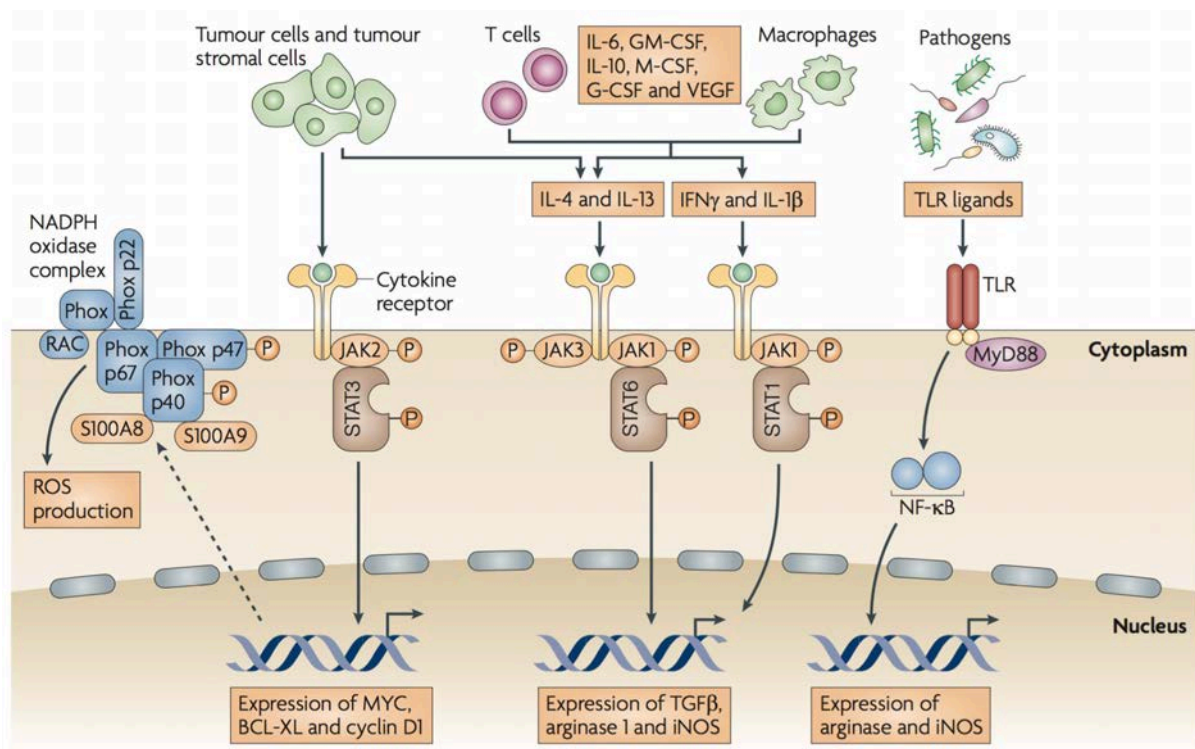


Figure 19. Voies de signalisation impliquées dans l'expansion et l'activation des MDSC. L'accumulation de MDSC est régulée par de nombreux facteurs, libérés par les cellules tumorales, les cellules stromales du microenvironnement tumoral, les macrophages et lymphocytes T activés, les cellules apoptotiques, les bactéries, virus ou cellules infectées. Ces facteurs déclenchent au niveau des MDSC des voies de signalisation mettant en jeu les facteurs de transcription de la famille STAT. STAT3 régule l'expansion des MDSC en stimulant la myélopoïèse, en inhibant la différenciation myéloïde et en favorisant la survie des cellules par l'induction de MYC, BCL-XL (*B cells lymphoma XL*) et la cycline D1. L'activation de STAT6, STAT1 et NF- κ B conduit à l'activation des MDSC et aboutit à l'expression de l'arginase 1, de la NO synthase inducible (iNOS) et à la production de cytokines immunosuppressives telles que le TGF- β (*Transforming growth factor β*). D'après [139].

4. Activation des MDSC

L'activité immunosuppressive des MDSC nécessite non seulement leur expansion, mais aussi leur activation. La plupart de ces facteurs sont produits par les lymphocytes T et les cellules du stroma tumoral à la suite de la mort des cellules tumorales ou sous l'influence des produits viraux ou bactériens. Ils incluent l'interféron- γ , les agonistes des TLR, l'IL-4, l'IL-13 ou le TGF- β , et activent des voies de signalisation qui mettent en jeu STAT1, STAT6 et NF- κ B.

a. Voie IFN γ – STAT1

STAT1 est le principal facteur de transcription activé par l'IFN- γ . Il est impliqué dans la production d'arginase 1 et iNOS par les MDSC. Ainsi, chez les souris *STAT1*^{-/-}, les MDSC ne produisent pas d'arginase 1 ni iNOS et sont incapables d'inhiber la prolifération des lymphocytes T. De même, le blocage de l'IFN- γ produit par les lymphocytes T activés abolit l'effet immunosuppresseur des MDSC[297,298].

b. Voie IL4R α – STAT6

La voie mettant en jeu le récepteur α de l'IL-4 (IL-4R α) et STAT6, activée par la liaison de l'IL-4 ou de l'IL-13, a été impliquée dans les mécanismes immunosuppresseurs des MDSC dans certaines tumeurs. L'activation de cette voie permet la production d'arginase par les MDSC [299]. L'activation de STAT6 par l'IL-4 ou l'IL-13 stimule par ailleurs l'activité de l'arginase 1 [300]. Chez les souris atteintes de sarcome, cette même voie est impliquée dans la production de TGF- β par les MDSC sous l'influence de l'IL-13, et aboutit à une baisse de l'immunosurveillance [301].

c. Voie des récepteurs Toll-like

Les récepteurs Toll-like (TLR) ont une place centrale dans l'activation des réponses immunitaires innées. Le sepsis polymicrobien secondaire à une ponction ligature caecale chez la souris induit une expansion des populations MDSC dans la rate, les ganglions et la moelle osseuse. Cette expansion est en particulier

dépendante de la protéine adaptatrice des TLR MyD88. Elle n'est en revanche pas inhibée par la seule inactivation du TLR4, ce qui suggère que l'expansion des MDSC par la voie MyD88 au cours du sepsis peut être consécutive à l'activation simultanée de différents TLR [302].

d. Voie du complément

Le système du complément est un élément majeur de la réponse inflammatoire, à l'interface entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Outre la formation d'opsonines et du complexe d'attaque membranaire, le clivage des fractions circulantes aboutit à la formation des anaphylatoxines qui constituent de puissantes molécules de signalisation [303]. Le C5a en particulier entraîne une forte inhibition de la réponse immunitaire anti-tumorale par le recrutement de MDSC. L'inhibition du récepteur au C5a entraîne une diminution de la croissance tumorale, une augmentation de la réponse lymphocytaire T CD8⁺ anti-tumorale, une diminution du recrutement des MDSC. Les MDSC isolées à partir de souris C5aR^{-/-} avaient des propriétés inhibitrices diminuées en raison d'une moindre production de ROS [288]. Le complément est donc une voie supplémentaire d'activation des MDSC.

5. Mécanismes d'action des MDSC

Les MDSC mettent en jeu un véritable réseau d'effecteurs et de molécules de signalisation pour moduler l'inflammation et réduire l'immunosurveillance au cours des cancers. Elles inhibent directement les lymphocytes T en les privant d'acides aminés essentiels, induisent leur apoptose, empêchent leur migration vers les organes lymphoïdes secondaires, ou inhibent les voies de signalisation intracellulaires nécessaires à leur activation. Elles inhibent également les lymphocytes T de façon indirecte en diminuant les capacités des cellules présentatrices d'antigènes à les activer et en induisant des lymphocytes T régulateurs. Au cours des cancers, elles modulent la réponse anti-tumorale en dialoguant avec les macrophages et cellules tumorales.

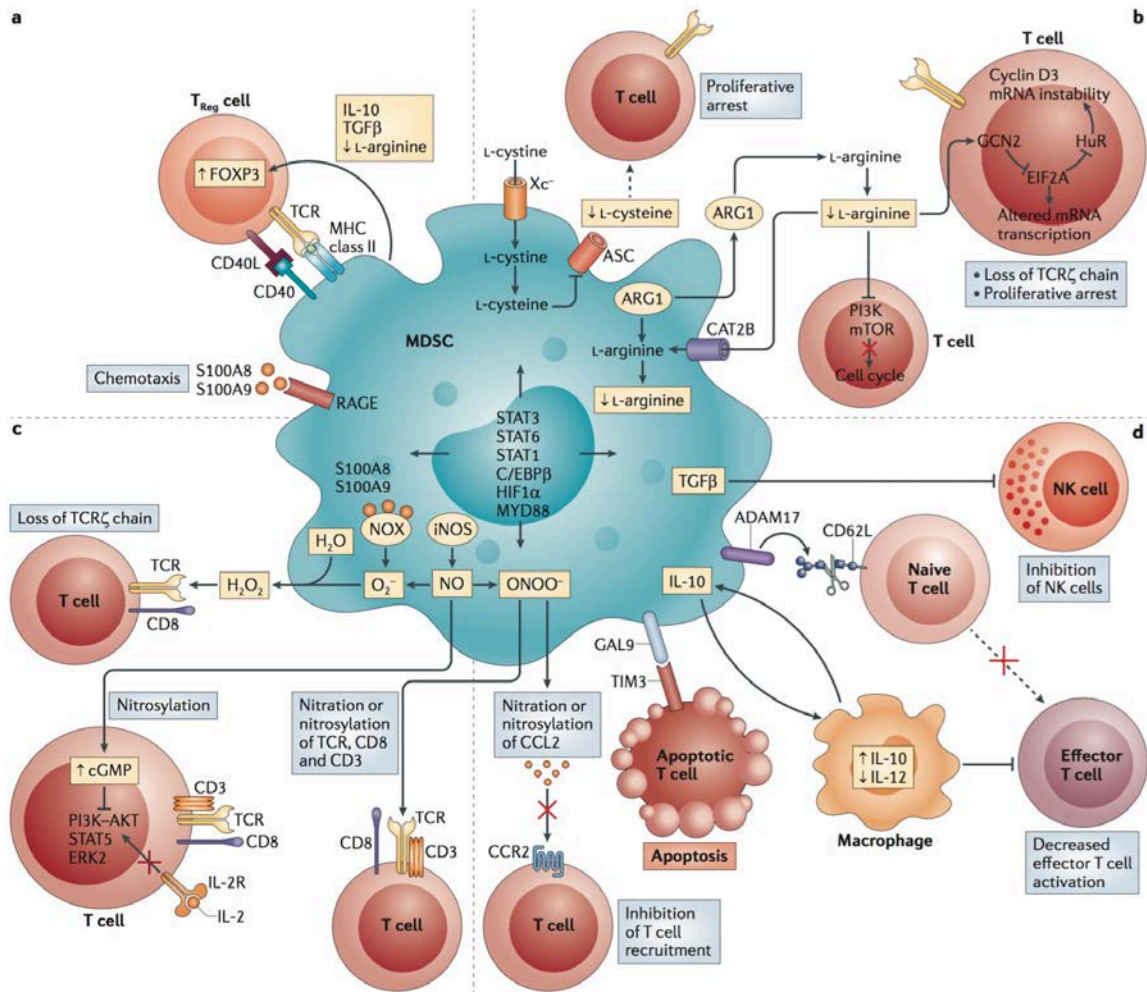


Figure 20. Mécanismes d'inhibition des fonctions lymphocytaires T par les MDSC. **a)** Les MDSC induisent le développement de Treg ou l'expansion des Treg existants. Les protéines S100A8 et S100A9 sont impliquées dans le chimiotactisme des cellules myéloïdes, et des MDSC en particulier. Elles agissent en se liant au récepteur RAGE. Les protéines S100A9/A9 font également partie du complexe enzymatique de la NADPH oxydase responsable de la production de ROS par les MDSC. **b)** Les cellules myéloïdes associées aux tumeurs, et les MDSC en particulier métabolisent des acides aminés essentiels à la croissance et la différenciation des lymphocytes T. **c)** Les cellules myéloïdes associées aux tumeurs libèrent des molécules oxydantes, telles que le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et le peroxynitrite (ONOO⁻). Le peroxynitrite provoque la nitration et la nitrosylation des protéines du TCR, et H₂O₂ diminue l'expression de la chaîne CD3ζ, empêchant l'activation des lymphocytes T par le TCR. **d)** Les cellules myéloïdes associées aux tumeurs interfèrent avec la migration et la viabilité des lymphocytes T. La métalloprotéase ADAM17 clive CD62L, nécessaire à la migration des lymphocytes T vers les ganglions. La galectine 9 (GAL9) peut induire l'apoptose des lymphocytes T par l'intermédiaire de la protéine TIM3 (*T cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3*). Ces mécanismes immunosuppresseurs, faisant appel à des voies de signalisation communes, peuvent être mis en jeu par plusieurs types de cellules myéloïdes. D'après [137].

a. Métabolisme de la L-arginine

Suite à la rencontre d'un antigène spécifique, l'activation et l'expansion clonale des lymphocytes T nécessitent un certain nombre de processus métaboliques. En limitant la disponibilité de certains acides aminés essentiels, les MDSC peuvent inhiber leur activation. Différents mécanismes leur permettent ainsi de dépléter le microenvironnement local en L-arginine, L-tryptophane et L-cystéine.

L'un des premiers mécanismes suppresseurs attribués aux MDSC a été l'inhibition de l'activation et de la prolifération des lymphocytes T par la déplétion en L-arginine. La L-arginine est un acide aminé essentiel conditionnel, autrement dit essentiel en conditions de stress métabolique telles que le cancer ou les traumatismes. Elle est le substrat de plusieurs enzymes :

- Les *Nitric oxide synthases* (NOS 1, 2, et 3), qui métabolisent la L-arginine en L-citrulline et en monoxyde d'azote (NO).
- Les arginases (ARG 1 et 2), qui convertissent la L-arginine en L-ornithine et en urée.
- L'Arginine:glycine aminotransférase (AGAT) qui transfère le groupe amidine de la L-arginine à la L-glycine, produisant de la L-ornithine et de la glycoxyamine
- L'Arginine décarboxylase (ADC), qui catalyse la formation d'agmatine et CO₂ à partir de la L-arginine [304].

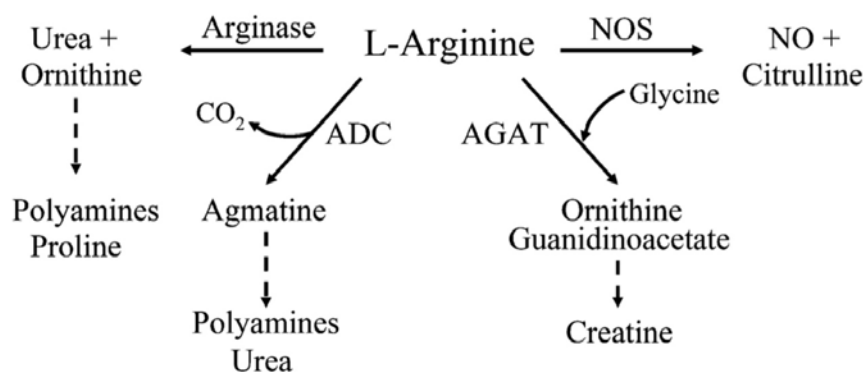


Figure 21. Métabolisme de la L-arginine. La L-arginine peut être métabolisée par 4 enzymes, Les NO Synthases (NOS 1, 2, et 3), les arginases (ARG 1 et 2), l'arginine:glycine aminotransférase (AGAT) et l'Arginine décarboxylase (ADC). Ces enzymes ne sont pas nécessairement exprimées simultanément et la distribution de leur expression est variable selon les types cellulaires. D'après [305]

Les MDSC utilisent la L-arginine via la voie de l'arginase et de la NO synthase pour moduler la réponse immunitaire. En l'absence de L-arginine, l'expression de CD3ζ par les lymphocytes T est diminuée, empêchant la transduction du signal par le récepteur T (TCR) [166]. L'impossibilité d'induire la cycline D3 et cdk4 (*cyclin-dependent kinase 4*) provoque le blocage du cycle cellulaire en phase G0-G1 [306]. Des études *in vivo* ont confirmé le rôle essentiel des MDSC dans la déplétion de la L-arginine. En effet, chez les patients atteints de carcinome rénal, une proportion élevée de MDSC de type granulocytaire et une argininémie basse sont associés à une diminution de la prolifération lymphocytaire T [205].

Alors que chez la souris la L-arginine est soit métabolisée par l'arginase 1, soit internalisée par l'intermédiaire des transporteurs CAT2B (*cationic amino-acid transporter 2B*), elle est chez l'homme exclusivement dégradée par l'arginase 1, elle-même induite par la PGE2 [206,307].

Chez la souris, l'arginase 1 est une enzyme de localisation intra-cytoplasmique. Elle est exprimée de façon constitutive par les hépatocytes, et inducible dans les cellules dendritiques, macrophages et MDSC sous l'influence des cytokines Th2, en particulier l'IL-4. Chez l'homme en revanche, elle est exprimée de façon constitutive dans les granules azurophiles des polynucléaires neutrophiles, mais pas dans le cytoplasme des cellules myéloïdes mononucléées (monocytes, macrophages, cellules dendritiques). Outre son rôle régulateur de la prolifération lymphocytaire T, elle participe également à l'activité fongicide des polynucléaires en déplaçant la L-arginine à l'intérieur des phagolysosomes [174].

Chez les patients hospitalisés en réanimation médicale, la diminution de production de NO nasal pourrait être la conséquence d'une hypoargininémie. Elle a été décrite comme marqueur d'immunodépression acquise et facteur prédictif d'acquisition d'infections nosocomiales [308]. L'augmentation de la production de L-ornithine après administration d'une immuno-nutrition enrichie en L-arginine suggère l'utilisation préférentielle de la L-arginine par la voie de l'arginase plutôt que par la voie de la NO synthase [81]. Il a été récemment montré que l'hypoargininémie chez ces patients était corrélée à l'expansion de MDSC de type granulocytaires [268].

Le catabolisme de la L-arginine par la NO synthase contribue également à l'immunosuppression induite par les MDSC. Les MDSC produisent du NO par l'intermédiaire d'iNOS et NOS3 (NO synthase endothéliale, eNOS). Les M-MDSC expriment préférentiellement iNOS alors que les G-MDSC expriment eNOS [309]. iNOS génère plus de NO qu'eNOS et est induite par les cytokines pro-inflammatoires, l'endotoxine, l'hypoxie et le stress oxydatif, alors qu'eNOS est exprimée de façon constitutive.

Le NO est une molécule de signalisation inorganique labile, capable de réagir avec de multiples composés pour former des facteurs toxiques ou régulateurs. Par exemple, le NO interagit avec :

- les cystéines, altérant la structure tertiaire des peptides et protéines
- les anions superoxyde (O_2^-) pour former du peroxyde nitrite ($ONOO^-$) qui altère la structure des protéines
- les cations divalents (Fe^{2+} , Zn^{2+}) qui régulent la fonction de divers facteurs de transcription et enzymes
- les acides nucléiques, induisant des mutations
- les lipides insaturés, conduisant à la formation de nitrolipides à l'activité pro-ou anti-inflammatoire [310].

Le NO produit par les MDSC exerce un effet négatif sur la fonction lymphocytaire T. Il inhibe JAK3, STAT5, ERK et AKT de la voie de signalisation de l'IL-2 et empêche ainsi la génération de lymphocytes T effecteurs et mémoire [311]. Il potentialise également l'activité de l'arginase 1 en augmentant l'affinité de l'enzyme pour la L-arginine [312].

b. Activité IDO

L'activité IDO constitue la première étape limitante du catabolisme du L-tryptophane. Elle est largement exprimée dans les tissus humains tels que le poumon et le placenta, et dans certaines cellules immunitaires (cellules dendritiques, monocytes / macrophages, cellules souches mésenchymateuses) et peut être induite

en contexte inflammatoire, en particulier par l'IFN- γ [313]. Elle est fortement impliquée dans les mécanismes de tolérance immunitaire, aussi bien physiologiques que pathologiques.

Physiologiquement, elle est impliquée dans la défense antibactérienne par privation des micro-organismes dépendants du tryptophane et par effet toxique de ses métabolites tels que la 3-hydroxy-kynurénine [314]. Elle joue également un rôle essentiel dans la tolérance fœto-maternelle. Ce rôle a été particulièrement illustré chez la souris, où l'administration de 1-méthyl-tryptophane (1-MT), un inhibiteur spécifique d'IDO, entraîne le rejet des fœtus allogéniques mais pas des fœtus syngéniques [315].

IDO peut également être induite de façon pathologique comme un mécanisme d'échappement au système immunitaire. Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est ainsi capable d'induire IDO de façon IFN- γ -indépendante dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes et d'inhiber la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ [316]. IDO est également impliquée dans la tolérance du système immunitaire vis-à-vis des cellules cancéreuses. Elle peut être exprimée aussi bien par les cellules tumorales elles-mêmes que par les cellules du microenvironnement, en particulier les cellules dendritiques situées sur le site tumoral et dans les ganglions drainants, inhibant ainsi la réponse immunitaire dirigée contre les antigènes tumoraux [154,317].

Plus récemment, il est apparu que les MDSC étaient également impliquées dans l'expression d'IDO dans les tumeurs solides ou hématologiques. Chez les patients atteints de cancer du sein ou de leucémie lymphoïde chronique, les MDSC qui infiltrent la tumeur expriment IDO par une voie dépendante de STAT-3 et inhibent la prolifération lymphocytaire T à la fois directement et par l'induction de lymphocytes Treg [318,319]. Chez les patients après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques, particulièrement en cas de réaction du greffon contre l'hôte, l'IL-6 et le G-CSF induisent l'expansion de MDSC de type monocytaire (CD14⁺HLA-DR^{low/neg}) inhibant l'expression de CD3 ζ et la prolifération lymphocytaire T via l'expression d'IDO [232].

c. Production d'espèces réactives de l'oxygène

La NADPH oxydase (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase*) est un complexe enzymatique membranaire, exprimé dans les cellules phagocytaires professionnelles (polynucléaires neutrophiles, monocytes, macrophages et éosinophiles). La NADPH oxydase génère des anions superoxydes qui réagissent spontanément avec de nombreuses molécules pour former des espèces réactives de l'oxygène (ROS) telles que le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), le radical hydroxyle et l'acide hypochlorique. Ces ROS altèrent les protéines, lipides et acides nucléiques, et jouent un rôle essentiel dans l'élimination des agents pathogènes phagocytés. Ainsi, les anomalies de la NADPH oxydase sont à l'origine de la granulomatose septique chronique, caractérisée par la survenue d'infections bactériennes et fongiques récidivantes [320,321].

La NADPH est également mise en jeu par les MDSC pour inhiber l'activation des lymphocytes T. Ainsi, la production d'H₂O₂ chez les patients atteints de cancer réduit la production de cytokines, diminue l'expression de CD3ζ par les lymphocytes T et inhibe la réponse immunitaire spécifique anti-tumorale [204]. La production de ROS par les MDSC dépend en particulier de la liaison des intégrines situées à leur surface (intégrine αM, CD11b; intégrine β1, CD29 et intégrine β2, CD18) [322]. Elle est également stimulée par de nombreux facteurs produits dans le microenvironnement tumoral (TGF-β, IL-3, IL-6, IL-10, *platelet-derived growth factor*, GM-CSF) [323].

L'anion superoxyde réagit également avec le NO pour former du peroxynitrite, l'un des plus puissants oxydants produits par l'organisme. Le peroxynitrite induit la nitration ou la nitrosylation du TCR et des molécules du CMH, empêchant leur interaction et rendant les cellules tumorales résistantes à l'apoptose induite par les lymphocytes T cytotoxiques [324]. En raison de la courte demi-vie des peroxynitrites, ces réactions nécessitent des contacts cellulaires étroits. L'interaction des peroxynitrites avec la chimiokine CCL2 inhibe l'infiltration des lymphocytes T au sein du microenvironnement tumoral [325].

d. Expression de Programmed Death-Ligand 1

Les cellules cancéreuses échappent à la réponse immunitaire anti-tumorale en exprimant PD-L1. La liaison de PD-L1 sur son récepteur PD-1 à la surface des lymphocytes T induit leur épuisement ou anergie (*exhaustion*) et/ou leur apoptose. Dans certaines tumeurs chez l'homme et la souris, les MDSC expriment également PD-L1 [212,252].

e. Induction de lymphocytes T régulateurs

Les lymphocytes Treg jouent un rôle important dans le contrôle des réactions immunitaires dirigées contre les antigènes du soi et du non-soi, et dans certains modèles animaux, protègent les cellules cancéreuses de l'immunité anti-tumorale [93]. Ils représentent 5 à 10% des lymphocytes CD4⁺ et 1 à 5% des lymphocytes totaux. Ils expriment fortement CD25 (sous-unité α du récepteur à l'IL-2) et faiblement CD127 (sous-unité α du récepteur à l'IL-7). Bien qu'aucune molécule membranaire ne permette de les distinguer, ils ont la particularité d'exprimer le facteur de transcription foxp3 (*forkhead/ winged helix transcription factor*) qui joue un rôle important dans leur développement et la régulation de leurs fonctions [326,327]. Dans de nombreux cancers chez la souris et chez l'homme, les MDSC induisent l'expansion des Treg en sécrétant de l'IL-10 et du TGF- β [222,328,329].

6. MDSC au cours des pathologies inflammatoires

Si les MDSC ont été essentiellement étudiées au cours des cancers, elles ont également été décrites dans les phénomènes inflammatoires chroniques non cancéreux et dans un certain nombre de maladies auto-immunes.

a. Maladies infectieuses et sepsis

Les MDSC granulocytaires productrices de NO sont associées à une altération de la réponse immunitaire au cours des infections parasitaires à *Toxoplasma gondii* et *Trypanosoma cruzi* chez la souris [330,331]. Des G-MDSC provoquant l'apoptose des lymphocytes T CD4⁺ ont également été décrites au cours des infections à *Candida albicans* chez la souris [332].

L'étude de *Delano et al.* est l'une des premières à s'être intéressée au rôle des MDSC au cours des processus inflammatoires aigus. Elle a permis de montrer que le nombre de MDSC GR-1⁺CD11b⁺ était fortement augmenté dans la moelle osseuse, la rate et le sang de souris après CLP. Ces cellules étaient essentiellement constituées de progéniteurs immatures hétérogènes exprimant diverses cytokines tant pro- qu'anti inflammatoires (TNF- α , IL-10, ...), et favorisaient la polarisation Th2 de la réponse immunitaire. Une étude plus récente a montré que les MDSC améliorent la survie des souris dans un modèle de péritonite par CLP, et que leur mobilisation dépend en grande partie des protéines de la phase aiguë hépatique, en particulier la chimiokine CXCL1 et la protéine sérum amyloïde A (SAA) [333].

Une autre étude réalisée chez la souris illustre de façon élégante l'absence de spécificité du phénotype MDSC d'une part, et la plasticité fonctionnelle des cellules myéloïdes d'autre part [334]. Les MDSC Gr1⁺CD11b⁺ étaient purifiées à partir de souris soumises à une infection polymicrobienne par CLP soit précocement (3 jours) soit tardivement (12 jours) après l'infection avant d'être transférées à un second groupe de souris soumises à une même infection. Les MDSC précoces produisaient du NO et des cytokines pro-inflammatoires, augmentaient les concentrations plasmatiques de cytokines pro-inflammatoires et diminuaient la croissance bactérienne au prix d'une mortalité précoce élevée. Au contraire, les MDSC tardives exerçaient une activité arginase, produisaient de l'IL-10 et du TGF- β et amélioraient la survie précoce au prix d'une prolifération bactérienne accrue.

b. Maladies auto-immunes

Les MDSC sont augmentées au cours des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et dans les modèles murins d'entérocolite auto-immune. Chez la souris, elles inhibent la prolifération des lymphocytes T et leur transfert adoptif diminue l'intensité des symptômes, suggérant un effet bénéfique [267].

Au cours de l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale, modèle murin de sclérose en plaques, le rôle des MDSC est plus équivoque. Elles pourraient d'une part limiter la progression de la maladie par leur effet suppresseur sur la prolifération

lymphocytaire T, mais la production de quantités excessives de NO pourrait aggraver les lésions neuronales [335].

c. Etats d'agression aiguë

Le concept d'immunodépression post-agression a été mise en évidence il y a plus de 40 ans chez les patients qui, dans les suites d'une intervention chirurgicale, présentaient une anergie après stimulation par des antigènes de rappel [63].

Un modèle de stress traumatique par laparotomie chez la souris a permis de mettre en évidence le rôle des MDSC dans ce phénomène. Les cellules GR1⁺CD11b⁺ s'accumulent dans les zones T de la rate, autour des centres germinatifs, inhibent l'expression de CD3 ζ , la production d'IL-2 et la prolifération des lymphocytes T par la production d'arginase [336].

Les patients hospitalisés en réanimation présentent un état de défaillance immunitaire illustré par la survenue fréquente d'infections nosocomiales, et attribuée en partie à une hypoargininémie [308]. Une étude réalisée chez des patients non septiques a permis de montrer que ces patients présentaient une proportion élevée de G-MDSC exprimant l'arginase. La proportion de G-MDSC était inversement corrélée à l'argininémie plasmatique et la mortalité à J7 était significativement plus élevée chez les patients présentant une proportion élevée de G-MDSC à l'admission [268].

V. Place des MDSC parmi les cellules myéloïdes

Il apparaît ainsi qu'un certain nombre de contextes inflammatoires, et en particulier les cancers, sont capables de promouvoir le développement de cellules myéloïdes à fortes capacités immunosuppressives. La majorité des études s'est intéressée à des populations myéloïdes isolées. Une approche globale et intégrative se heurte cependant à deux écueils : tout d'abord l'existence d'une forte plasticité au sein des cellules myéloïdes, en particulier des phagocytes mononucléés, dépendante du microenvironnement local et du compartiment tissulaire étudié - tissu normal ou tumoral, organes lymphoïdes secondaires ou sang périphérique [337,338]. Par ailleurs, les sous-populations myéloïdes partagent un grand nombre de marqueurs phénotypiques communs, exprimés à des degrés divers, qui rendent leur distinction parfois difficile.

La définition des MDSC n'est aujourd'hui pas consensuelle. Les stratégies utilisées pour l'analyse cytométrique sont souvent variables selon les publications. Un consortium international regroupant 23 laboratoires tente actuellement d'harmoniser l'approche des MDSC en testant 10 stratégies d'analyse phénotypique [339]. Les premiers résultats révèlent d'ores et déjà qu'il existe une importante variabilité inter-laboratoire. Elle est tout d'abord liée au fait que les MDSC de type granulocytaire ne survivent pas aux étapes de congélation / décongélation, ce qui sous-entend la nécessité de réaliser impérativement les analyses sur sang frais. Elle est liée d'autre part aux difficultés de l'analyse phénotypique. On peut en effet reprocher à un certain nombre de publications de fonder cette analyse sur une succession de fenêtres aux limites plus ou moins bien définies, sans tenir compte des contingents cellulaires normaux. Enfin, contrairement à l'assertion initiale, un certain nombre de publications font état de MDSC de phénotype mature [193].

Tableau 3. Comparaison des phénotypes myéloïdes chez la souris

Cellules	Sous-type	CD11b	CD11c	F4/80	GR1	Ly6G	Ly6C	CMH-II	ARG1	CD36	CD49d	CD115	CD124	CD163	CD205	CD206	B220	iNOS	IL-10	IL-12
Cellules dendritiques	cDC	+	+	-	-				+			Low			+					
	pDC	-	+	-	+												+			
Monocytes	Classiques	+	-	+	+	-	+	-				+								
	Inflammatoires	+	-	+	+	Hi	Hi	-				+								
Macrophages	ND	+	+	+	-	-	Low	+				+/-								
	M1	+	+	+	High	-	Hi	Hi				+/-						+	-	+
	M2	+	+	+	Low	-	Low	Low	+			+/-	+	+	+				+	-
Granulocytes		+	-	-	High	Hi	Low	-				-								
MDSC	ND	+	-	+	+								+							
	G-MDSC	+		-	High	+	Low					+/-	+	+						
	M-MDSC	+		+	Mid	-	Hi					+	+	+						

Tableau 4. Comparaison des phénotypes myéloïdes chez l'homme

Cellules	Sous-type	Lin	HLA-DR	CD11b	CD14	CD15	CD33	CD66b
Cellules dendritiques	cDC	-	+	+	-	-	+	-
	pDC	-	+	+	-	-	+	-
Monocytes	ND	+	+	+	+	-	+	-
	ND	+	+	+	+	-	+	-
Macrophages	M1	+	+	+	+	-	+	-
	M2	+	+	+	+	-	+	-
Granulocytes		+	-	+		+	+	+
MDSC	ND	-			-	-	+	
	G-MDSC	+	-	+	-	+	+	+
	M-MDSC	+	low/-	+	+	-	+	-

Concernant les MDSC circulantes, on peut toutefois retenir les caractéristiques minimales suivantes :

- Les MDSC monocytaires ($CD14^+HLA-DR^{lo/-}$) peuvent être identifiées comme une sous-population de monocytes $CD14^+$ présentant une diminution de l'expression d'HLA-DR. Ce phénotype ne laisse en rien présager du caractère immature de cette sous-population. Au cours du sepsis en particulier, il a été montré que la diminution d'expression d'HLA-DR était en partie liée à un phénomène d'endocytose partiellement induite par l'IL-10 [125].

- Les MDSC granulocytaires ($CD14^-CD15^+$) sont définies dans la plupart des études parmi les cellules mononucléées isolées par gradient de densité. CD15 étant un marqueur de la lignée granulocytaire, ce phénotype fait donc systématiquement référence à des granulocytes de faible densité. Une fois de plus, même si la présence de granuleux immatures parmi les cellules mononucléées est classiquement décrite [130], le phénotype $CD14^-CD15^+$ (et/ou $CD66b^+$ et/ou $CD11b^+$) n'est pas spécifique d'un quelconque caractère immature. L'ajout du CD16 permettrait d'apporter une information supplémentaire sur le degré de maturité des cellules [340].

- Le phénotype des MDSC dites immatures ($Lin^-HLA-DR^-CD33^+CD11b^+$) regroupe également de façon non spécifique un certain nombre de cellules, en particulier les basophiles [341].

Au sein des tissus, les MDSC ont surtout été étudiées chez la souris. Une fois de plus, les analyses phénotypiques par cytométrie en flux permettent difficilement de distinguer clairement des TAM ou DC suppressives. L'analyse morphologique de sous-populations triées pourrait permettre d'apporter un niveau de précision supplémentaire.

Enfin, quel que soit le compartiment, le caractère suppresseur n'est associé à aucun marqueur phénotypique spécifique et seuls les tests fonctionnels *in vitro* permettent de le confirmer.

En résumé, il existe de toute évidence une grande plasticité au sein du compartiment myéloïde, aussi bien à l'état normal que pathologique, dépendante du compartiment tissulaire et de l'environnement cytokinique. Quel que soit la sous-population cellulaire considérée, il ressort que les contextes pathologiques inflammatoires sont capables d'induire un phénotype suppresseur par deux mécanismes : d'un part en stimulant la myélopoïèse et en recrutant des cellules immatures, et d'autre part en polarisant la fonction des cellules matures vers un phénotype fonctionnel de type tolérogène. Enfin, les mécanismes d'action mis en jeu par les cellules myéloïdes suppressives sont généralement redondants, axés sur la production de cytokines anti-inflammatoires (IL-10, TGF- β) qui vont diminuer la réponse cellulaire cytotoxique et favoriser le recrutement de Treg, l'expression de ligands de récepteurs inhibiteurs tels que PD-L1, on encore réguler la disponibilité d'acides aminés essentiels ou semi-essentiels par l'expression d'IDO ou arginase 1.

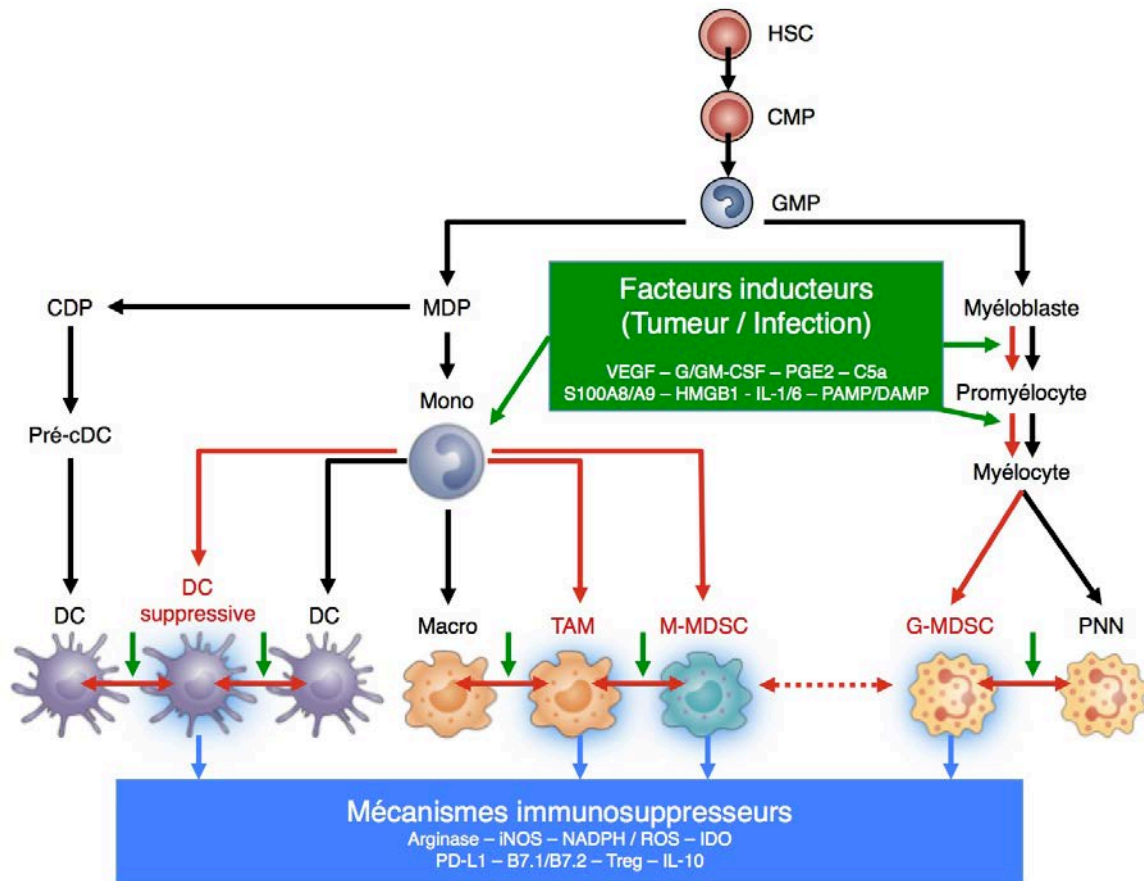


Figure 22. Cellules myéloïdes suppressives au cours des états d'agression aigue et chroniques. En situation normale, les cellules souches hématopoïétiques (HSC) donnent naissance aux progéniteurs myéloïdes communs (CMP) puis aux progéniteurs des granulocytes et macrophages (GMP). Ceux-ci se différencient ensuite en monocytes, cellules dendritiques, macrophages et polynucléaires neutrophiles (flèches noires). En situation pathologique, des facteurs issus du microenvironnement tumoral, de la réaction inflammatoire ou des alarmines (DAMP) stimulent (flèches vertes) l'apparition de cellules myéloïdes suppressives. Celles-ci proviennent de deux sources : d'une part la mobilisation de cellules myéloïdes immatures ayant acquis des propriétés suppressives, et d'autre part la polarisation de cellules matures. Selon l'environnement, différents phénotypes peuvent être observés : DC suppressives, TAM, TAN, M- ou G-MDSC. Les mécanismes immunosuppresseurs apparaissent souvent communs à tous les sous-types de cellules myéloïdes suppressives.

Objectifs

Objectifs

En dehors de l'antibiothérapie et des techniques de suppléance des défaillances d'organes, il n'existe à ce jour aucun traitement spécifique du sepsis. Les échecs des thérapeutiques immunomodulatrices évaluées chez l'homme ont révélé que la physiopathologie du sepsis était beaucoup plus complexe qu'une simple réaction inflammatoire exacerbée. Il nous est apparu que les cellules myéloïdes jouaient vraisemblablement un rôle central dans les mécanismes d'immunodépression observés au cours du sepsis. Le travail de cette thèse s'est donc articulé autour de 3 questions :

- **Quels mécanismes d'action sont mis en œuvre par les cellules myéloïdes au cours du sepsis ?** Nous nous sommes dans un premier temps intéressés à l'activité d'IDO, enzyme jouant un rôle essentiels dans les mécanismes d'immunorégulation, tant physiologiques – au cours de la tolérance fœto-maternelle par exemple, que pathologiques – au cours du cancer et de certaines maladies infectieuses chroniques telles que l'infection VIH. Dans un second temps, nous avons étudié le rôle de l'alarmine ambivalente HMGB1 dans l'induction de la défaillance des polynucléaires neutrophiles.

- **Quels sont l'origine, le phénotype et la fonctionnalité des sous-populations myéloïdes au cours du sepsis ?** Cette question aura été au cœur de la problématique de cette thèse. Nous nous sommes ainsi particulièrement intéressés à la problématique des MDSC, impliquées dans les mécanismes d'immunodépression au cours des états inflammatoires chroniques. A titre de comparaison, l'étude du lymphome B diffus à grandes cellules a constitué un modèle de pathologie inflammatoire chronique.

- **Quel est l'impact clinique de l'action de ces cellules myéloïdes en contexte infectieux et non-infectieux ?** Nous avons cherché à connaître les effets cliniques de l'action des sous-populations myéloïdes, en particulier sur le développement des infections nosocomiales. Parallèlement, nous avons amorcé l'étude des conséquences immunologiques de la circulation extracorporelle chez les patients de chirurgie cardiaque.

Résultats

Article 1. L'activité Indoléamine 2,3-dioxygénase est augmentée chez les patients souffrant d'un sepsis sévère ou d'un choc septique

Enhanced indoleamine 2,3-dioxygenase activity in patients with severe sepsis and septic shock.

Pierre Tattevin, Delphine Monnier, Olivier Tribut, Joelle Dulong, Nadège Bescher, Frédéric Mourcin, Fabrice Uhel, Yves Le Tulzo, and Karin Tarte

J Infect Dis. 2010 Mar 15;201(6):956-66

Ce travail présente les résultats de l'étude cognitive de l'activité IDO dans une série de 83 patients atteints de sepsis, sepsis sévère et choc septique, et 26 volontaires sains.

Nous avons pu montrer que l'activité IDO augmente graduellement en fonction de la gravité du sepsis. L'activité IDO à l'admission était significativement plus élevée chez les patients décédés. Elle est également prolongée car toujours élevée 14 jours après l'admission. Elle est indépendante des autres facteurs biologiques connus pour être associés à un mauvais pronostic au cours du sepsis (lymphopénie persistante, augmentation de la proportion de Treg, diminution prolongée de l'expression monocyttaire d'HLA-DR).

Nous avons validé que les monocytes CD14⁺ étaient la principale source d'IDO parmi les cellules mononucléées de sujets sains après stimulation par l'IFN- γ ou par les agonistes des TLR. En revanche, si le nombre de monocytes CD14⁺ était augmenté chez les patients septiques, leur fonctionnalité était modifiée. En effet, en accord avec le phénomène de dysfonction lié au sepsis, les monocytes de patients n'étaient plus capables de produire une activité IDO suite à une stimulation NF- κ B dépendante par les agonistes des TLR. En revanche, cette activité était conservée lorsqu'elle était stimulée par l'IFN- γ , indépendamment de NF- κ B.

Ce travail met en évidence un nouveau mécanisme de la dysfonction immunitaire du sepsis et ouvre la perspective d'une utilisation thérapeutique d'inhibiteurs d'IDO pour améliorer le pronostic des patients atteints de sepsis.

Enhanced Indoleamine 2,3-Dioxygenase Activity in Patients with Severe Sepsis and Septic Shock

Pierre Tattevin,^{1,4,a} Delphine Monnier,^{2,5,a} Olivier Tribut,^{3,6} Joelle Dulong,^{5,7} Nadège Bescher,³ Frederic Mourcin,^{5,7} Fabrice Uhel,¹ Yves Le Tulzo,^{1,4} and Karin Tarte^{2,5}

¹Service des Maladies Infectieuses et Réanimation Médicale, ²Service d'Immunologie, Thérapie Cellulaire et Hématopoïèse, Pôle Cellules et Tissus, and ³Laboratoire de Pharmacologie Clinique et Expérimentale, Centre Hospitalier Universitaire, ⁴Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U835, ⁵INSERM U917, and ⁶Centre d'Investigation Clinique, INSERM 0203, Université Rennes 1, IFR140, and ⁷Etablissement Français du Sang, Bretagne, Rennes, France.

Background. Severe sepsis results in a sustained deleterious immune dysregulation. Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), the rate-limiting enzyme of tryptophan catabolism, plays a pivotal role in immune tolerance and is induced during various inflammatory conditions.

Methods. Plasma samples obtained from patients with septic shock ($n = 38$), severe sepsis ($n = 35$), or sepsis ($n = 10$) and from healthy donors ($n = 26$) were analyzed for IDO activity by high-performance liquid chromatography. Lymphocyte, monocyte, and regulatory T cell counts as well as monocytic human leukocyte antigen DR (HLA-DR) expression were quantified by flow cytometry. Peripheral blood mononuclear cells and purified CD14⁺ and CD14⁻ fractions were assayed in vitro for spontaneous and inducible IDO expression and activity.

Results. IDO activity gradually increased according to sepsis severity, and septic patients who died had higher IDO activity on admission than did survivors ($P = .013$). Monocytes were a major source of active IDO in normal peripheral blood. The percentage and absolute number of circulating CD14⁺ cells were increased in septic patients, and their monocytes remained fully able to produce functional IDO after NF- κ B-independent interferon γ stimulation but not through NF- κ B-dependent Toll-like receptor engagement.

Conclusions. IDO activity is increased during severe sepsis and septic shock and is associated with mortality. IDO production could be used to better characterize monocyte reprogramming in sepsis.

Septic shock, the systemic host response that occurs during severe infection, remains the leading cause of mortality in intensive care units (ICUs). Owing to recent advances in antibiotic and supportive therapies, most patients survive the initial intense proinflammatory response. However, they rapidly display clinical features consistent with an immunosuppressive state, including a loss of delayed-type hypersensitivity, an in-

ability to eradicate infection, and a predisposition to nosocomial infections [1–3]. This sustained immune dysregulation is characterized by a reprogramming of leukocytes rather than by hyporeactivity. The main mechanisms demonstrated so far are (1) lymphopenia, associated with extensive apoptosis of T, B, and dendritic cells [1, 4]; (2) an increase in the proportion of circulating regulatory T cells (Treg) that exhibit an enhanced suppressive activity [5, 6]; and (3) marked alterations of monocyte phenotype and function exemplified by a reduced expression of HLA-DR [7, 8], granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) receptor, CX3CR1 fractalkine receptor, and CD14, a loss of antigen-presenting capacity, and a defective production of inflammatory cytokines in response to in vitro challenge with bacterial compounds [9–12]. Monocyte dysfunction has been linked to several factors, including increased levels of interleukin 10 (IL-10) and cortisol or the direct inhibitory effect of Treg, and seems to be partially restored by interferon γ (IFN- γ) or GM-CSF treatment [13–17]. Among these alterations,

Received 5 May 2009; accepted 16 October 2009; electronically published 12 February 2010.

Potential conflicts of interest: none reported.

Presented in part: 46th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Francisco, California, September 2006 (abstract B-672).

Financial support: This study was supported by grants from the Collège des Universitaires de Maladies Infectieuses et Tropicales (CMIT) and from the Programme Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC) inter-régional.

^a These authors contributed equally to this work.

Reprints or correspondence: Dr Yves Le Tulzo, Service des Maladies Infectieuses et Réanimation Médicale, CHU Pontchaillou, rue Henri le Guilloux, 35033 Rennes, France (yves.le-tulzo@univ-rennes1.fr).

The Journal of Infectious Diseases 2010;201:956–966

© 2010 by the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved.

0022-1899/2010/20106-0019\$15.00

DOI: 10.1086/650996

the down-modulation of HLA-DR expression on monocytes and the intensity of lymphocyte apoptosis are associated with outcome in patients with sepsis when they persist over time [4, 18, 19].

Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) plays a pivotal role in immune tolerance [20]. IDO catalyzes the first and limiting step of tryptophan catabolism, resulting in suppression of T cell proliferation *in vitro* and *in vivo*. In addition, the tryptophan-depleting activity of IDO affects the growth of several pathogens, so that IDO activation could have beneficial, as well as detrimental, consequences on host defences against infections. IDO can be induced in various cell types during infection, especially in response to IFN- γ signaling and/or bacterial components such as Toll-like receptor (TLR) ligands. Recently, IDO blockade was demonstrated to protect mice against lipopolysaccharide (LPS)-induced endotoxin shock, in association with a modulation of interleukin 12 (IL-12) and IL-10 production by dendritic cells [21]. In humans, IDO activation has been reported in human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients [22] and after major trauma [23]. Studies on IDO expression in human myeloid dendritic cells obtained by *in vitro* differentiation of monocytes showed that bioactive enzyme is inconstantly induced by various combinations of IFN- γ , cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA-4), CD40-Ligand, prostaglandin E₂, and TLR ligands such as LPS, poly(I:C), or peptidoglycan [24–27]. However, little is known about circulating monocytes and macrophages in human diseases. Our objectives were (1) to study IDO activity in plasma obtained from patients with sepsis, (2) to investigate the association between IDO and other immunosuppression markers, and (3) to explore *in vitro* the effect of TLR ligands on IDO activity.

METHODS

Patients and control participants. This study was performed in the infectious diseases department and ICU at Rennes University Hospital. A total of 83 consecutive adult septic patients, including 38 patients with septic shock, 35 patients with severe sepsis, and 10 patients with sepsis, were prospectively enrolled and compared with 26 healthy control participants. The study design was approved by the institutional review board. Pregnant women, patients who were younger than 18 years old, patients with malignancy, HIV-infected patients, and patients receiving immunosuppressive agents were excluded. Standard criteria were used for diagnosis of septic shock, severe sepsis, and sepsis [28]. The Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) at admission in ICU, and the Logistic Organ Dysfunction (LOD) system at day 0 and day 7 were used to assess severity of sepsis [29, 30]. Blood samples treated with heparin were collected for all patients within 24 h following sepsis diagnosis (day 0). When possible, additional samples were obtained 6–8 days later (day 7, $n = 49$) and 13–15 days later (day 14, $n = 8$). The delay

between blood sampling and the beginning of laboratory procedures was always <2 h. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by Ficoll density gradient, and plasma samples were stored at -80°C until use.

Flow cytometry. Because a planned preliminary analysis of findings in the first 36 septic patients enrolled demonstrated that IDO activity was markedly increased in patients with severe sepsis and septic shock, we performed additional investigations for the 47 last septic patients of our cohort (24 with severe sepsis and 23 with septic shock) and for 10 control participants. Lymphocytes, monocytes, and CD4⁺CD25^{high} T cell counts were measured, as well as the level of HLA-DR expression on monocytes, using phycoerythrin (PE)-conjugated monoclonal antibodies to CD14 (Beckman Coulter) and CD25 (Becton Dickinson), fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated monoclonal antibodies to HLA-DR (Beckman Coulter) and CD4 (Becton Dickinson), and TruCount tubes (Becton Dickinson). Isotype-matched mouse monoclonal antibodies were used as negative controls. According to the study design, Treg were defined as CD4⁺CD25^{high} T cells. As Foxp3 became the reference marker for Treg quantification, we checked in a subset of septic patients ($n = 12$) that both markers were closely related: $91.6\% \pm 10\%$ of CD4⁺CD25^{high} were Foxp3⁺. HLA-DR cell surface density was expressed as the ratio of mean fluorescence intensity evaluated on CD14⁺ cells. To evaluate the mechanism of CpG-dependent IDO activation, freshly isolated PBMCs were stimulated for 3 h by 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CpG-C (Invivogen), with Golgi Plug protein transport inhibitor (Becton Dickinson) added for the last 2-h incubation as described elsewhere [31]. The percentage of interferon α (IFN- α) and IFN- γ producing cells were then analyzed on Lin⁻HLA-DR⁺CD123⁺ plasmacytoid dendritic cells (pDCs) using the Cytotfix/Cytoperm kit, as well as Lin1-FITC, HLA-DR-PerCP, IFN- α -PE (Miltenyi Biotec), IFN- γ -PE (Becton Dickinson), and CD123-APC monoclonal antibodies (Miltenyi Biotec).

Cell isolation and culture. PBMCs isolated from healthy donors and septic patients were stimulated with IFN- γ and microbial-derived TLR ligands. For some experiments, CD14⁺ and CD14⁻ fractions were further selected by using the CD14 isolation kit (Miltenyi Biotec) with a cell purity >96%. Whole PBMCs, CD14⁺, and CD14⁻ cells were cultured at 10^6 cells/mL in Roswell Park Memorial Institute, or RPMI, 1640 medium—10% fetal calf serum (Biowest)—penicillin/streptomycin supplemented with 20 ng/mL macrophage-colony stimulating factor (R&D Systems) and were stimulated either by 50 IU/mL IFN- γ (R&D Systems), 10 ng/mL LPS, 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CpG-C (Invivogen), or 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Poly(I:C) (Sigma). In some experiments, IFN type I activity was blocked by a combination of 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ anti-IFN- α/β R2 with 2000 IU/mL anti-IFN- α monoclonal antibodies (PBL), and NF- κB signaling was inhibited by 20 $\mu\text{mol}/\text{L}$ wedelolactone (Calbiochem).

Table 1. Characteristics of Patients with Sepsis and Control Participants

Characteristics	Patients			Control participants (n = 26)
	Septic shock (n = 38)	Severe sepsis (n = 35)	Sepsis (n = 10)	
Male sex	25	25	7	11
Age, years	69 (49–75)	69 (49–76)	37 (24–47)	32 (24–47)
SAPS II	52 (41–65)	36 (28–55)	15 (13–21)	NA
LOD score	8 (5–11)	4 (1–6)	0	NA
Died/survived	16/22	1/34	0/10	NA

NOTE. Data are expressed as median (interquartile range) unless otherwise indicated. LOD, Logistic Organ Dysfunction; NA, not applicable; SAPS, Simplified Acute Physiology Score.

IDO expression and activity assessment. Human mesenchymal stem cells (MSCs) were used as positive control of IFN- γ -dependent IDO-producing cells and were obtained and characterized as described elsewhere [32]. RNA was extracted using RNeasy kit (Qiagen) from purified monocytes and mesenchymal stem cells unstimulated or treated for 3 days with IFN- γ . Complementary DNA was generated using Superscript reverse-transcriptase (Invitrogen). For quantitative polymerase chain reaction, we used assay-on-demand primers and probes, Taqman Universal MasterMix, and ABI Prism 7000 apparatus from Applied Biosystems. *ABL* was used as an internal standard gene. For immunofluorescence analysis, mesenchymal stem cells and monocytes were cultured on glass coverslips and fixed in 4% paraformaldehyde. Cells were stained with polyclonal IDO Ab (Thermo Fisher Scientific), followed by Alexa 455-conjugated donkey anti-sheep secondary antibodies (Invitrogen) and analyzed by confocal microscopy (SP2, Leica). ImageJ software was used for image analysis. Finally, IDO activity was evaluated by measuring kynurenine and tryptophan levels in plasma samples and cell-culture supernatants with high-performance liquid chromatography, using 3-nitro-L-tyrosine as an internal stan-

dard [32]. IDO activity was maximal in culture after 3 days of IFN- γ stimulation for both monocytes and PBMCs, so that all in vitro experiments were stopped at 72 h.

Statistical analysis. Quantitative variables were expressed as median and interquartile range (IQR). Differences observed between groups were first analyzed using the nonparametric Kruskal-Wallis test followed by the Mann-Whitney *U* test. Because of multiple comparisons, the α level was adjusted according to the Bonferroni correction. Differences observed between day 0 and day 7 were analyzed using the Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test. Correlations between 2 continuous variables were investigated using the nonparametric Spearman rank correlation test. IDO activities in cell-culture supernatants were compared using the Mann-Whitney *U* test.

RESULTS

Enhanced IDO activity in sepsis is associated with severity.

The characteristics of septic patients and healthy donors are summarized in Table 1, and sepsis etiology is detailed in Table 2. On day 0, IDO activity was markedly increased in patients

Table 2. Sites of Infection and Microorganisms Isolated in Septic Patients

Characteristic	Septic shock (n = 38)	Severe sepsis (n = 35)	Sepsis (n = 10)
Infection site, no. of patients			
Respiratory tract	17	20	4
Intra-abdominal/pelvis	7	3	0
Vascular	6	4	
Urinary tract	3	3	
Other sources	5	4	6
Unknown	0	1	0
Bacteremia, no. of patients	19	12	5
Isolates, no. of patients			
Gram positive	14	19	6
Gram negative	12	7	2
Candida	1	1	0
Miscellaneous	3	2	0
Unknown	8	6	2

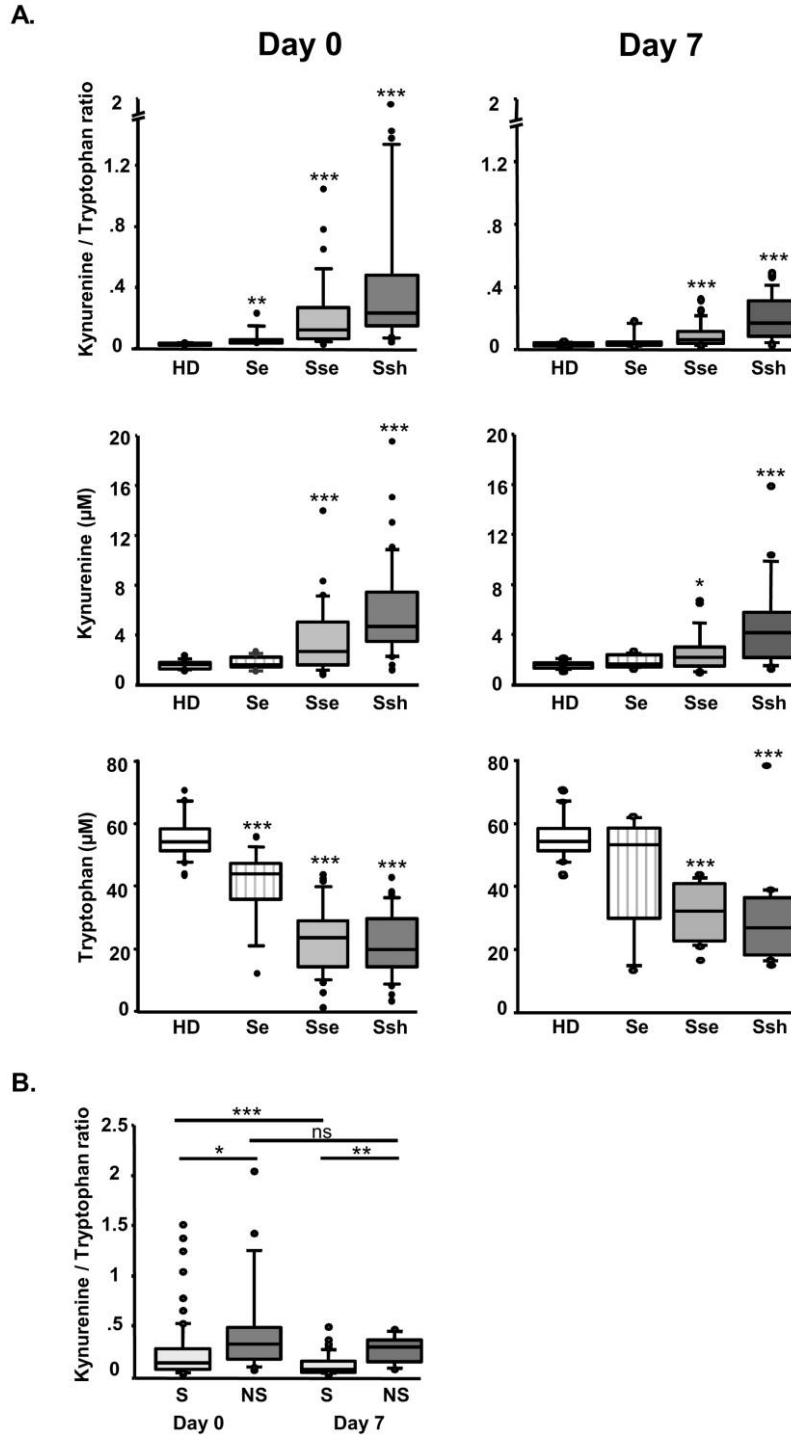


Figure 1. Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) activity is correlated to sepsis severity. (A) IDO activity in healthy donors (HD) vs septic patients. Tryptophan and kynurenine concentrations were measured by high-performance liquid chromatography in plasma samples collected from 26 healthy donors and from 83 septic patients at diagnosis (day 0), including 10 patients with sepsis (Se), 35 with severe sepsis (Sse), and 38 with septic shock (Ssh). On day 7, data are available for 49 of the 83 septic patients, including 6 with sepsis, 22 with severe sepsis, and 21 with septic shock. Horizontal lines from the bottom to the top represent the 10th, 25th, 50th (median), 75th, and 90th percentiles. Circles represent outlying values. Statistical analyses were used to compare each patient group vs control group ($*P < .05$; $**P < .01$; $***P < .001$). (B) IDO activity in surviving (S) vs nonsurviving (NS) septic patients. Patients were defined as survivors if they were alive at day 30 and as nonsurvivors if they died before day 30. Box plot distributions of the kynurenine/tryptophan ratio are for day 0 (66 survivors, 17 nonsurvivors) and at day 7 (42 survivors, 7 nonsurvivors). $*P < .05$; $**P < .01$; $***P < .001$; ns, not significant.

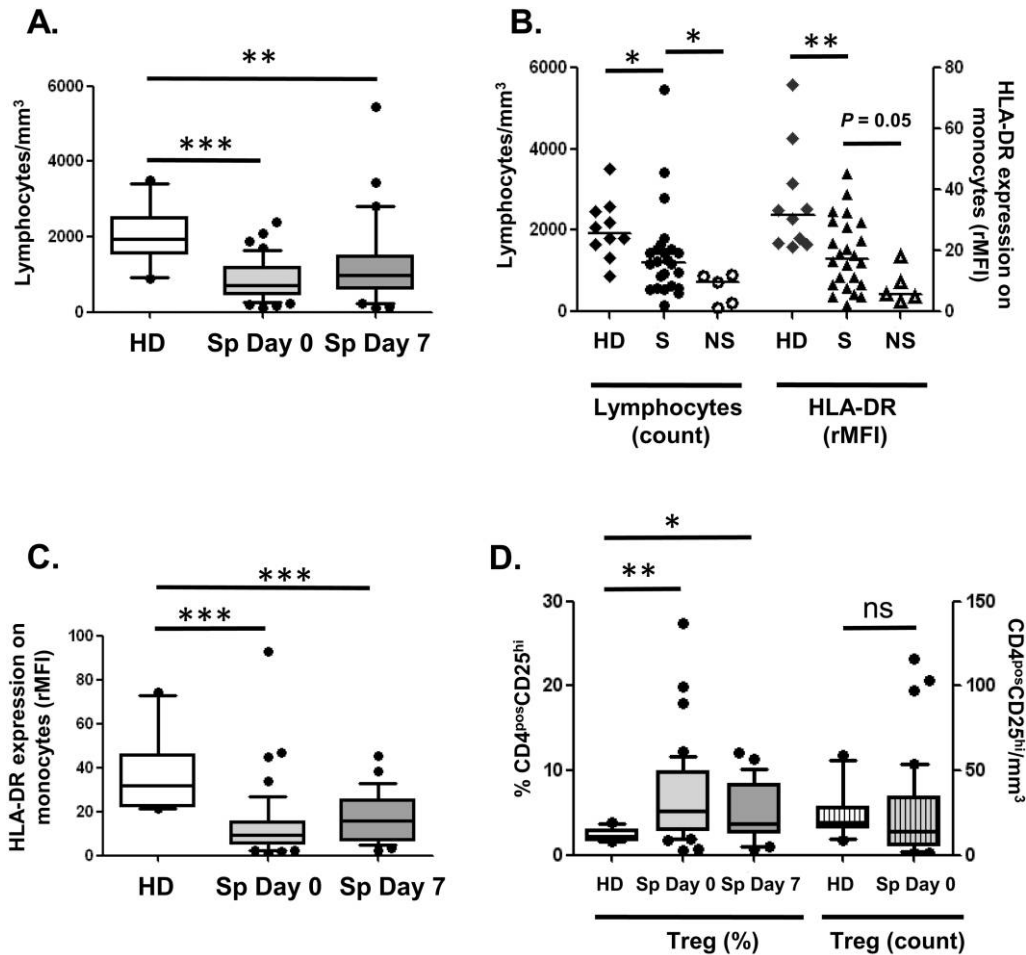


Figure 2. Comparative analysis of sepsis biological markers. Lymphocyte count (A, B), HLA-DR expression on monocytes (B, C), and Treg percentage and count (D) were evaluated by flow cytometry at day 0 and day 7 on a cohort of 47 septic patients (Sp) and 10 healthy donors (HD). HLA-DR was expressed as the ratio of mean fluorescence intensity (rMFI) obtained with anti-HLA-DR monoclonal antibodies vs isotypic control after gating on CD14⁺ cells. Level of Treg was expressed as the percentage of CD4⁺CD25^{high} cells among CD4⁺ T cells. When indicated (B), data on survivors (S, $n = 24$) and nonsurvivors (NS, $n = 5$) were analyzed separately at day 7 (* $P < .05$; ** $P < .01$; *** $P < .001$; ns, not significant).

with septic shock (0.235 [IQR, 0.152–0.481], +751%, $P < .001$), in patients with severe sepsis (0.123 [IQR, 0.068–0.271], +344%, $P < .001$), and in patients with sepsis (0.033 [IQR, 0.031–0.052], +20%, $P = .008$), as compared with control participants (0.028 [IQR, 0.025–0.036]) (Figure 1A). Notably, IDO activity gradually heightened with sepsis severity, from non-severe sepsis to severe sepsis ($P < .001$), and from severe sepsis to septic shock ($P = .009$). No difference was found according to site of infection or micro-organism (gram-positive vs gram-negative). IDO activity was still increased at day 7 in patients with septic shock (0.163 [IQR, 0.081–0.305], +482%, $P < .001$) and severe sepsis (0.064 [IQR, 0.038–0.116], +128%, $P < .001$), compared with control participants, whereas it had returned to normal values at day 7 in patients with nonsevere sepsis (Figure 1A). IDO activity at day 0 was correlated with day 0 SAPS II score ($\rho = 0.424$, $P < .001$) and day 0 LOD score ($\rho = 0.479$; $P < .001$). IDO activity at day 7 was correlated with

day 7 LOD score ($\rho = 0.629$; $P < .001$). IDO activity was still higher for the 8 patients with severe sepsis or septic shock in whom samples were obtained at day 14 than in control participants ($P = .006$). Increases in IDO activity resulted from the combination of reduced tryptophan concentration and increased kynurenine level at each time point. Altogether, these data indicate a striking IDO-mediated tryptophan degradation in septic patients that is persistent and parallels sepsis severity.

Enhanced IDO activity in sepsis is associated with unfavorable outcome. Mortality, defined as death occurring within 30 days after sepsis diagnosis, was 20% in the overall septic population and reached 42% in the patient group with septic shock (Table 1). At day 0, IDO activity was higher in nonsurvivors than survivors (0.318 [IQR, 0.167–0.486] vs 0.127 [IQR, 0.063–0.268]; $P = .013$), and similar results were observed at day 7 (0.294 [IQR, 0.145–0.364] vs 0.068 [IQR, 0.037–0.152]; $P = .005$) (Figure 1B). In addition, IDO activity, although not

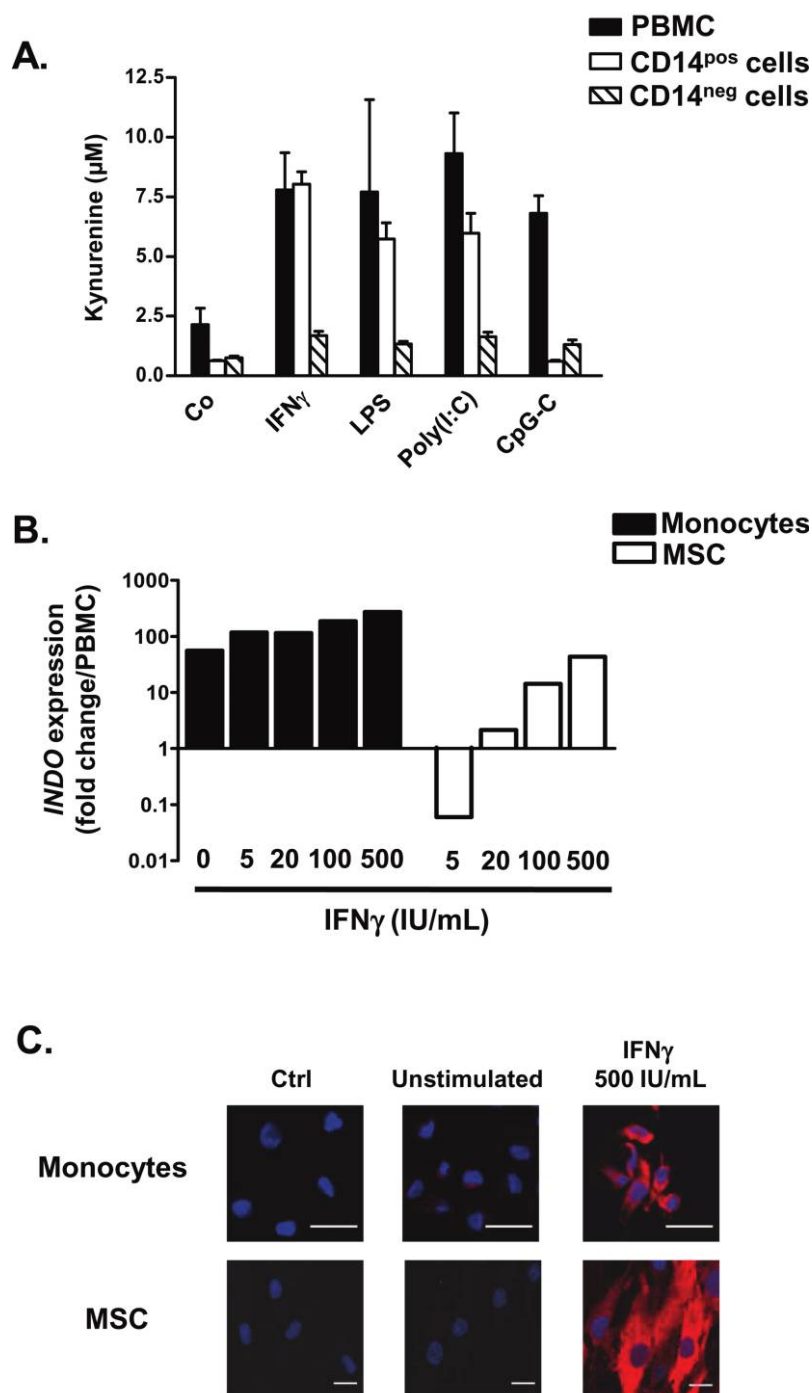


Figure 3. Monocyte-dependent indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) activity in healthy donors. (A) Monocytes are a major source of IDO activity in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy donors. PBMC, CD14⁺, and CD14⁻ fractions were stimulated during 3 days by interferon γ (IFN- γ), lipopolysaccharide (LPS), Poly(I:C), or CpG-C, or left untreated (Co) before quantification of kynurenine level in cell culture supernatants. Bars represent mean values (\pm standard deviation) from 3 distinct experiments. (B, C) Induction of IDO expression in monocytes. Mesenchymal stem cells (MSC) or purified monocytes were stimulated with increasing doses of IFN- γ before RNA extraction (B) or immunofluorescence staining (C). For quantitative polymerase chain reaction, results were compared with expression in untreated PBMCs. Results are those from 1 of 3 experiments. Bars in panel C represent 20 μ m.

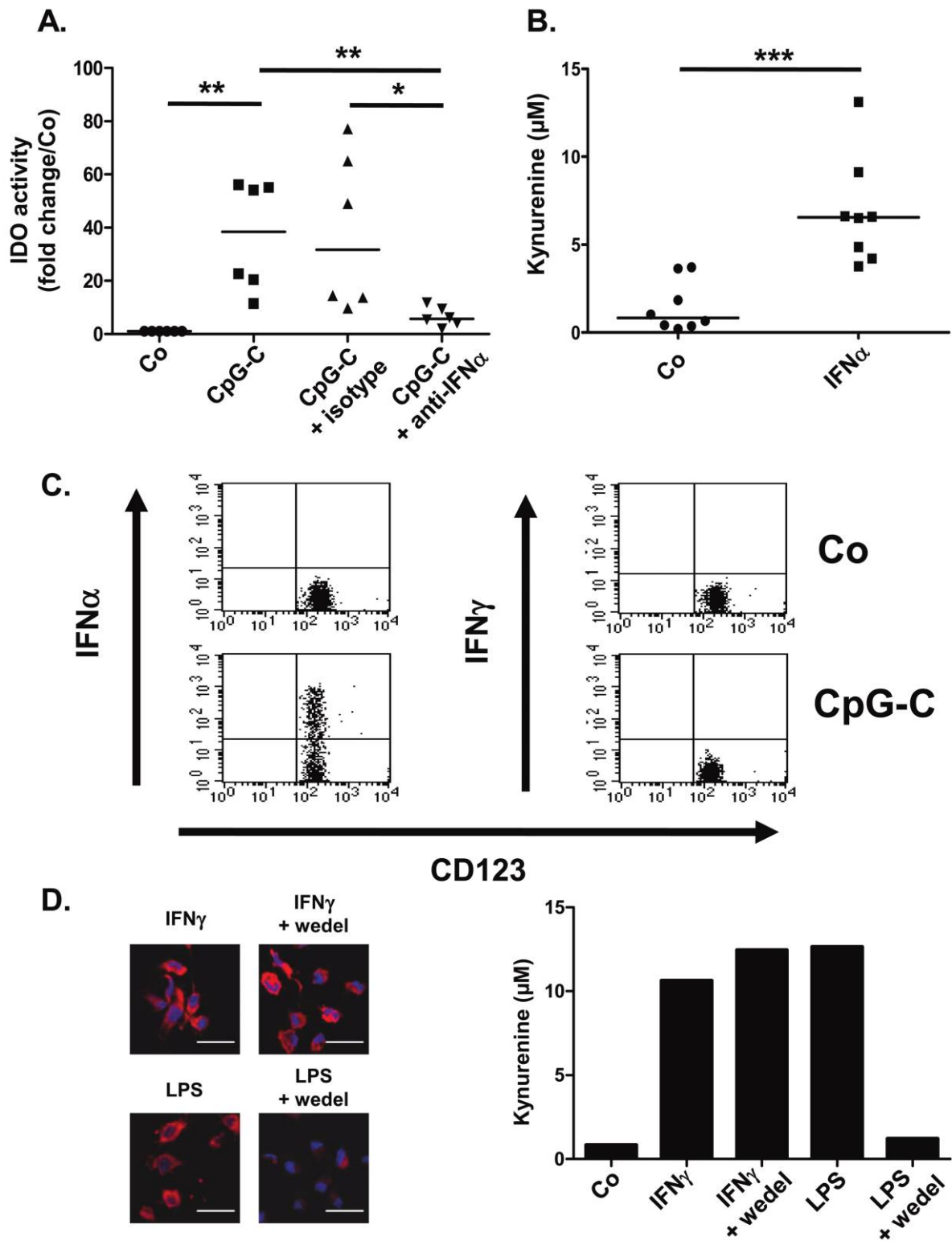


Figure 4. Mechanism of Toll-like receptor–dependent indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) induction in healthy donors (*A, B*) Interferon α (IFN- α) is involved in CpG-induced IDO activity. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy donors ($n = 6$) were either left untreated (Co) or were stimulated for 3 days with CpG-C in the presence of isotopic control or a combination of IFN- α -targeting monoclonal antibodies (anti-IFN- α). Results are expressed as a function of IDO activity in untreated PBMCs assigned to 1 (*A*). PBMCs from healthy donors ($n = 8$) were either left untreated (Co) or were stimulated for 3 days with IFN- α before quantification of kynurenine concentration (*B*). * $P < .05$; ** $P < .01$; *** $P < .001$ (*C*) CpG stimulation induces IFN- α secretion in plasmacytoid dendritic cells (pDCs). PBMCs were either left untreated (Co) or were stimulated for 3 h with CpG-C, and then analyzed for IFN- α and interferon γ (IFN- γ) production in Lin $^-$ HLA-DR $^+$ CD123 $^+$ pDCs. Results are those of 1 experiment out of 4. (*D*) NF- κ B signaling is required for IDO induction by lipopolysaccharide (LPS) in circulating monocytes. Purified monocytes were left untreated (Co) or stimulated for 3 days with IFN- γ or LPS in the presence of wedelolactone (wedel) or dimethyl sulfoxide. IDO expression was then evaluated by immunofluorescence (*left*) and kynurenine level by high-performance liquid chromatography (*right*). Bars represent 20 μm . Results are those from 1 of 3 experiments.

fully reverted to its normal value, decreased between day 0 and day 7 in survivors (-46.5% ; $P < .001$), whereas it did not significantly change in nonsurvivors.

Enhanced IDO activity in sepsis is not correlated with lymphocyte or monocyte alterations. Because prolonged lymphopenia, increased percentage of Treg, and persistent monocytic HLA-DR down-regulation are associated with poor outcome in septic patients [4, 5, 18], we evaluated these parameters in the last 47 septic patients enrolled in the study and explored their correlation with IDO activity. We first validated in these 47 patients that, similarly to the whole cohort, IDO activity was significantly increased and associated with disease severity at both day 0 and day 7 (data not shown). Regarding other immune parameters, lymphocyte count was decreased in septic patients at day 0 ($P < .001$), day 7 ($P = .003$), and day 14 ($854/\mu\text{L}$ [IQR, 674–1593], $n = 8$) compared to control participants ($1930/\mu\text{L}$ [IQR, 1642–2477], $n = 10$; $P = .008$) (Figure 2A) and was significantly higher at day 7 in survivors than in nonsurvivors ($P = .02$) (Figure 2B). Circulating monocytes of septic patients exhibited a severe and prolonged loss of HLA-DR expression compared with control participants ($P < .001$, $P = .001$, and $P = .03$ at day 0, day 7, and day 14, respectively) (Figure 2C), with a trend toward better restoration of HLA-DR expression at day 7 in survivors compared with nonsurvivors ($P = .05$) (Figure 2B). Finally, the proportion but not the absolute number of CD4^+ T cells with a regulatory phenotype was elevated in septic patients at day 0 ($P = .001$) and day 7 ($P = .01$) (Figure 2D) but was not predictive of death. We found no correlation between IDO activity and either lymphocyte count, number or proportion of Treg, or monocytic expression of HLA-DR, at both day 0 and day 7.

Stimulation of IDO activity in PBMCs from healthy donors.

To validate the role of circulating monocytes as IDO-producing cells, we stimulated whole PBMCs, CD14^+ , and CD14^- cells from control participants by $\text{IFN-}\gamma$ or by agonists for TLR4 (LPS), TLR3 (poly(I:C)), and TLR9 (CpG-C). Each compound induced a strong IDO activity in PBMCs. $\text{IFN-}\gamma$, LPS, and poly(I:C) directly stimulated IDO activity in purified monocytes but not in CD14^- cells (Figure 3A). To confirm these functional results, we then directly evaluated IDO expression. Although IDO was not constitutively expressed in human mesenchymal stem cells and was transcriptionally induced by $\text{IFN-}\gamma$ as described elsewhere [32], a high level of IDO messenger RNA was detected in nonstimulated circulating monocytes, despite a low protein expression. IDO protein expression was strongly enhanced after $\text{IFN-}\gamma$ treatment (Figure 3B–3C). In agreement with the lack of TLR9 expression on human monocytes, kynurenine release remained undetectable following stimulation of purified CD14^+ cells by CpG. In addition, CpG did not promote IDO activity in purified CD14^- cells, indicating that cell interactions between $\text{TLR9}^+\text{CD14}^-$ cells, most likely pDCs, and

$\text{TLR9}^-\text{CD14}^+$ monocytes, were required to promote CpG-dependent IDO production. To further explore the mechanism of this crosstalk, we evaluated the role of $\text{IFN-}\alpha$. Addition of anti- $\text{IFN-}\alpha$ combined with anti- $\text{IFN-}\alpha\beta$ receptor strongly reduced IDO activity in PBMCs stimulated with CpG, and $\text{IFN-}\alpha$ promoted IDO activity by itself in normal PBMCs (Figure 4A–4B). Moreover, whereas CpG stimulation of whole PBMCs induced neither $\text{IFN-}\alpha$ nor $\text{IFN-}\gamma$ production by CD14^+ monocytes (data not shown), TLR9 ligation induced the synthesis of $\text{IFN-}\alpha$ by pDCs, as evaluated by intracellular staining (Figure 4C). Collectively, these data suggest that CpG-dependent IDO expression in PBMCs requires TLR9^- monocytes and $\text{IFN-}\alpha$ release by TLR9^+ pDCs.

Given previously reported alteration of $\text{NF-}\kappa\text{B}$ expression and activation in PBMCs from patients with sepsis [12, 33], and the central role of $\text{NF-}\kappa\text{B}$ canonical pathway in TLR signaling [34], we investigated whether IDO induction in PBMCs involved $\text{NF-}\kappa\text{B}$. Wedelolactone, a specific $\text{NF-}\kappa\text{B}$ inhibitor, strongly decreased IDO expression and activity in CD14^+ cells stimulated by LPS, whereas $\text{IFN-}\gamma$ -dependent IDO induction was not affected (Figure 4D). The same results were obtained using NBD peptide, a selective inhibitor of the canonical $\text{NF-}\kappa\text{B}$ pathway (data not shown). These findings demonstrate that $\text{NF-}\kappa\text{B}$ is required for LPS-mediated IDO induction in monocytes.

Stimulation of IDO activity in PBMCs from patients with sepsis.

Besides their global dysfunction as antigen-presenting cells, circulating monocytes display a complex activated or deactivated status in septic patients. It was recently suggested that persistent immunosuppression after hematopoietic stem cell transplantation involves dysfunctional circulating monocytes displaying kynurenine hyperproduction spontaneously and after in vitro restimulation [35]. We tested the hypothesis that monocytes obtained from septic patients would also exhibit enhanced IDO activity. However, kynurenine concentrations were similar in unstimulated PBMCs obtained from septic patients ($1.49 \pm 2.01 \mu\text{mol/L}$, $n = 18$) and in control participants ($1.63 \pm 1.03 \mu\text{mol/L}$, $n = 22$). This was not due to depletion of circulating monocytes because the percentage of CD14^+ cells among PBMCs was enhanced in patients with sepsis (40% [IQR, 28%–47%], $n = 46$) compared with control participants (10% [IQR, 9%–13%], $n = 10$; $P < .001$). In addition, the absolute number of circulating CD14^+ monocytes was increased in septic patients at day 0 ($532/\mu\text{L}$ [IQR, 411–895], $n = 46$) and day 7 ($805/\mu\text{L}$ [IQR, 467–1157], $n = 29$) compared with control participants (293 [IQR, 229–386], $n = 10$; $P = .005$ and $P < .001$, respectively). The lack of IDO activity was also observed when PBMCs were primed with GM-CSF, an anti-apoptotic growth factor that restores in vitro monocyte function and cytokine secretion [13]. The mean level of kynurenine synthesis triggered by $\text{IFN-}\gamma$ was similar in PBMCs obtained from septic patients and from control participants, whereas

kynurenine release following LPS ($P < .001$) and poly(I:C) ($P = .001$) stimulation was significantly reduced (Figure 5). Thus, circulating monocytes from septic patients were remarkable for their inability to activate IDO through TLR3 and TLR4 engagement, while they remained responsive to IFN- γ stimulation. Moreover, CpG efficiently promoted IDO activity in only 2 of 7 patients ($P = .02$), compared with that in control participants.

DISCUSSION

In this study, we demonstrated that IDO activity was (1) markedly increased during sepsis; (2) correlated with sepsis stage, with SAPS II and LOD severity scores, and was predictive of outcome; and (3) remained significantly higher than activity in control participants for at least 14 days after diagnosis, in agreement with current views that sepsis-associated immunosuppression is long-lasting. Two recent studies described IDO activity in plasma as a prognostic factor in bacteremic patients and as a risk factor for post-traumatic sepsis [36, 37]. Conversely, in studies using high-throughput microarray approaches, *INDO*—the gene encoding IDO—was not significantly up-regulated in septic patients [38, 39], in agreement with our findings that an IDO increase in circulating monocytes occurs through post-transcriptional mechanisms.

We found no correlation between increased IDO activity in plasma and HLA-DR down-regulation on circulating monocytes. Thus, these alterations, even if they participate in immune deactivation and occur in the same cell type, may be driven by different processes. In agreement with the hypothesis of 2 independent mechanisms, dexamethasone induces HLA-DR down-regulation on monocytes *in vitro* [11, 15] but has no effect on IDO (data not shown). Likewise, we found no correlation between Treg and IDO levels in plasma, although Treg are able to directly drive antigen-presenting cells to express functional IDO [20, 40]. Interestingly, neutrophil and monocyte oxidative metabolism is increased in septic patients, both constitutively and under various stimuli [41]. Because IDO activity is modulated by intracellular redox status in human macrophages [42], it would be interesting to evaluate further the relationships between IDO and oxidative burst in sepsis.

Using *in vitro* studies, we demonstrated that CD14⁺ monocytes are the main IDO producers within PBMCs, in response to IFN- γ , LPS, and poly(I:C). We identified, as already described for dendritic cells [43], a discrepancy between IDO expression and activity in human monocytes. Unlike poly(I:C), LPS alone is unable to induce active IDO expression in monocyte-derived dendritic cells [24, 27]. In our study, both TLR3 and TLR4 ligands increased IDO activity in purified circulating monocytes, and NF- κ B was required for LPS-mediated IDO induction. Similarly, whereas IL-10 cooperates with IFN- γ for IDO induction in murine dendritic cells [44], it strongly re-

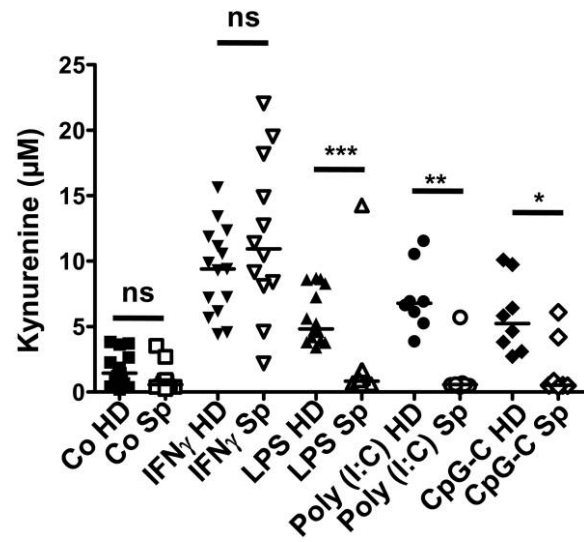


Figure 5. Monocyte-dependent indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) activity is impaired but not suppressed in septic patients. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy donors (HD; $n = 15$) and septic patients (Sp; $n = 12$) were left untreated (Co) or were stimulated during 3 days by interferon γ (IFN- γ) or lipopolysaccharide (LPS), before quantification of kynurenine level in cell-culture supernatants. For 8 healthy donors and 7 septic patients, PBMCs were also evaluated for their response to poly(I:C) and CpG-C ($*P < .05$; $**P < .01$; $***P < .001$; ns: not significant).

pressed IFN- γ -driven IDO activity in human monocytes (data not shown). Collectively, these results confirm that IDO induction involves different signaling pathways depending on cell type. Moreover, sepsis-related alteration of the NF- κ B pathway [12, 33] could play a crucial role in the selective unresponsiveness of monocytes to NF- κ B-dependent TLR stimulation, whereas IFN- γ remains fully able to trigger IDO activation in an NF- κ B-independent manner. Interestingly, because LPS and poly(I:C) did not induce IDO, both MyD88 and TRIF pathways seem to be altered during sepsis. Surprisingly, we observed no spontaneous IDO activity in PBMCs isolated from patients during the early phase of sepsis. Several hypotheses could explain this intriguing result. First, IDO activity could be due to expansion, recruitment, and/or activation of immunosuppressive cells within inflamed tissues rather than in peripheral blood. In agreement, a GR-1⁺CD11b⁺ population of immature myeloid cells with suppressor functions was recently identified in spleen, lymph nodes, and bone marrow during sepsis in mice [45]. Alternatively, blood monocytes could be involved in IDO activation during sepsis in humans, because CD14⁺ monocyte counts were significantly increased in septic patients and remained able to produce IDO in response to IFN- γ stimulation *in vitro*. This change in the dynamic of circulating monocytes might be related to TLR-dependent stimulation of bone marrow myelopoiesis and monopoiesis by microbial components [46, 47] and could be amplified by an impaired CX3CR1-de-

pendent recruitment of monocytes toward infected tissues [11]. Given the heterogeneity of circulating monocytes [48], further studies on monocyte subset functions are warranted in both early and late phases of sepsis.

Another intriguing finding was that CpG-dependent induction of IDO in PBMCs required both CD14⁺TLR9⁻ monocytes and CD14⁻TLR9⁺ IFN- α -producing pDCs, fostering 2 nonexclusive hypotheses. First, circulating pDCs could produce IDO after TLR9 triggering through unidentified monocyte-derived factors. Interestingly, recombinant IFN- α was recently shown to promote IDO protein expression in pDCs within PBMCs [49]. Conversely, even if IFN- α alone did not induce IDO expression and activity in purified monocytes (data not shown), CpG-dependent IDO activity could originate from CD14⁺ cells, because TLR9-activated pDCs also produce TNF α , a well-described IDO inducer in combination with IFN- γ [32, 50]. Whatever the IDO-producing cell in normal PBMCs stimulated by CpG, the TLR9 signal was unable to drive IDO activity in PBMCs of septic patients. This could be related to the dramatic decrease in Lin⁻HLA-DR⁻CD123⁺ circulating pDCs during sepsis (data not shown) but could also imply sepsis-related monocyte reprogramming.

The present work suggests that IDO activation during severe sepsis and septic shock could be an additional mechanism by which circulating monocytes contribute to sepsis-induced immune dysregulation. Better understanding of immune alterations during sepsis could pave the way toward new therapeutic strategies aiming to restore septic patient's immunity. As some IDO inhibitors are already under evaluation in patients with advanced malignancies, one could envision the use of small molecules targeting IDO to relieve immune suppression in severe sepsis and septic shock.

Acknowledgments

We thank the Centre d'Investigation Clinique de Rennes for their logistic and methodological support. We are grateful to Nathalie le Floch (INRA, St Gilles) for her help with quantification of IDO activity and to Céline Pangault for sample collection and management.

References

- Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* **2003**; 348:138–150.
- Anname D, Bellissant E, Cavaillon JM. Septic shock. *Lancet* **2005**; 365: 63–78.
- 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.
- Le Tulzo Y, Pangault C, Gacouin A, et al. Early circulating lymphocyte apoptosis in human septic shock is associated with poor outcome. *Shock* **2002**; 18:487–494.
- Venet F, Pachot A, Debard AL, 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**; 32:2329–2331.
- Venet F, Chung CS, Kherouf H, et al. Increased circulating regulatory T cells (CD4⁺CD25⁺CD127⁻) contribute to lymphocyte anergy in septic shock patients. *Intensive Care Med* **2009**; 35:678–686.
- Fumeaux T, Pugin J. Is the measurement of monocytes HLA-DR expression useful in patients with sepsis? *Intensive Care Med* **2006**; 32: 1106–1108.
- Monneret G, Finck ME, Venet F, et al. The anti-inflammatory response dominates after septic shock: association of low monocyte HLA-DR expression and high interleukin-10 concentration. *Immunol Lett* **2004**; 95:193–198.
- 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**; 34:1193–1201.
- von Knethen A, Tautenhahn A, Link H, Lindemann D, Brune B. Activation-induced depletion of protein kinase C α provokes desensitization of monocytes/macrophages in sepsis. *J Immunol* **2005**; 174: 4960–4965.
- Pachot A, Cazalis MA, Venet F, et al. Decreased expression of the fractalkine receptor CX3CR1 on circulating monocytes as new feature of sepsis-induced immunosuppression. *J Immunol* **2008**; 180:6421–6429.
- Adib-Conquy M, Adrie C, Fitting C, Gattolliat O, Beyaert R, Cavaillon JM. Up-regulation of MyD88s and SIGIRR, molecules inhibiting Toll-like receptor signaling, in monocytes from septic patients. *Crit Care Med* **2006**; 34:2377–2385.
- Williams MA, White SA, Miller JJ, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces activation and restores respiratory burst activity in monocytes from septic patients. *J Infect Dis* **1998**; 177:107–115.
- Williams MA, Withington S, Newland AC, Kelsey SM. Monocyte anergy in septic shock is associated with a predilection to apoptosis and is reversed by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor *ex vivo*. *J Infect Dis* **1998**; 178:1421–1433.
- Le Tulzo Y, Pangault C, Amiot L, et al. Monocyte human leukocyte antigen-DR transcriptional downregulation by cortisol during septic shock. *Am J Respir Crit Care Med* **2004**; 169:1144–1151.
- Docke WD, Randow F, Syrbe U, et al. Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN- γ treatment. *Nat Med* **1997**; 3:678–681.
- Venet F, Pachot A, Debard AL, et al. Human CD4⁺CD25⁺ regulatory T lymphocytes inhibit lipopolysaccharide-induced monocyte survival through a Fas/Fas ligand-dependent mechanism. *J Immunol* **2006**; 177: 6540–6547.
- Monneret G, Lepape A, Voirin N, et al. Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive Care Med* **2006**; 32:1175–1183.
- Docke WD, Hoflich C, Davis KA, et al. Monitoring temporary immunodepression by flow cytometric measurement of monocytic HLA-DR expression: a multicenter standardized study. *Clin Chem* **2005**; 51: 2341–2347.
- Mellor AL, Munn DH. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol* **2004**; 4:762–774.
- Jung ID, Lee MG, Chang JH, et al. Blockade of indoleamine 2,3-dioxygenase protects mice against lipopolysaccharide-induced endotoxin shock. *J Immunol* **2009**; 182:3146–3154.
- Murray MF. Tryptophan depletion and HIV infection: a metabolic link to pathogenesis. *Lancet Infect Dis* **2003**; 3:644–652.
- Pellegrin K, Neurauder G, Wirleitner B, Fleming AW, Peterson VM, Fuchs D. Enhanced enzymatic degradation of tryptophan by indoleamine 2,3-dioxygenase contributes to the tryptophan-deficient state seen after major trauma. *Shock* **2005**; 23:209–215.
- Tas SW, Vervoordeldonk MJ, Hajji N, et al. Non-canonical NF- κ B signaling in dendritic cells is required for indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) induction and immune regulation. *Blood* **2007**; 110(5):1540–1549.
- von Bergwelt-Baildon MS, Popov A, Saric T, et al. CD25 and indoleamine 2,3-dioxygenase are up-regulated by prostaglandin E2 and ex-

- pressed by tumor-associated dendritic cells in vivo: additional mechanisms of T-cell inhibition. *Blood* **2006**; 108:228–237.
26. Munn DH, Sharma MD, Mellor AL. Ligation of B7–1/B7–2 by human CD4⁺ T cells triggers indoleamine 2,3-dioxygenase activity in dendritic cells. *J Immunol* **2004**; 172:4100–4110.
 27. Krause P, Singer E, Darley PI, Klebensberger J, Groettrup M, Legler DE. Prostaglandin E2 is a key factor for monocyte-derived dendritic cell maturation: enhanced T cell stimulatory capacity despite IDO. *J Leukoc Biol* **2007**; 82:1106–1114.
 28. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* **2003**; 31:1250–1256.
 29. Le Gall JR, Klar J, Lemeshow S, et al. The Logistic Organ Dysfunction system: a new way to assess organ dysfunction in the intensive care unit. ICU Scoring Group. *JAMA* **1996**; 276:802–810.
 30. Le Gall JR, Lemeshow S, Saulnier F. A new Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study. *JAMA* **1993**; 270:2957–2963.
 31. Ida JA, Shrestha N, Desai S, Pahwa S, Hanekom WA, Haslett PA. A whole blood assay to assess peripheral blood dendritic cell function in response to Toll-like receptor stimulation. *J Immunol Methods* **2006**; 310:86–99.
 32. Maby-El Hajjami H, Ame-Thomas P, Pangault C, et al. Functional alteration of the lymphoma stromal cell niche by the cytokine context: role of indoleamine-2,3 dioxygenase. *Cancer Res* **2009**; 69:3228–3237.
 33. Adib-Conquy M, Adrie C, Moine P, et al. NF- κ B expression in mononuclear cells of patients with sepsis resembles that observed in lipopolysaccharide tolerance. *Am J Respir Crit Care Med* **2000**; 162:1877–1883.
 34. Kawai T, Akira S. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med* **2007**; 13:460–469.
 35. Hainz U, Obexer P, Winkler C, et al. Monocyte-mediated T-cell suppression and augmented monocyte tryptophan catabolism after human hematopoietic stem-cell transplantation. *Blood* **2005**; 105:4127–4134.
 36. Logters TT, Laryea MD, Altrichter J, et al. Increased plasma kynurenine values and kynurenine-tryptophan ratios after major trauma are early indicators for the development of sepsis. *Shock* **2009**; 32:29–34.
 37. Huttunen R, Syrjanen J, Aittoniemi J, et al. High activity of indoleamine 2,3 dioxygenase enzyme predicts disease severity and case fatality in bacteremic patients. *Shock* **2010**; 33(2):149–154.
 38. Payen D, Lukaszewicz AC, Belikova I, et al. Gene profiling in human blood leucocytes during recovery from septic shock. *Intensive Care Med* **2008**; 34:1371–1376.
 39. Pachot A, Lepape A, Vey S, Bienvenu J, Mouglin B, Monneret G. Systemic transcriptional analysis in survivor and non-survivor septic shock patients: a preliminary study. *Immunol Lett* **2006**; 106:63–71.
 40. Hill M, Tanguy-Royer S, Royer P, et al. IDO expands human CD4⁺CD25 high regulatory T cells by promoting maturation of LPS-treated dendritic cells. *Eur J Immunol* **2007**; 37:3054–3062.
 41. 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:R25.
 42. Thomas SR, Salahifar H, Mashima R, Hunt NH, Richardson DR, Stocker R. Antioxidants inhibit indoleamine 2,3-dioxygenase in IFN- γ -activated human macrophages: posttranslational regulation by pyrrolidine dithiocarbamate. *J Immunol* **2001**; 166:6332–6340.
 43. Braun D, Longman RS, Albert ML. A two-step induction of indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) activity during dendritic-cell maturation. *Blood* **2005**; 106:2375–2381.
 44. Yanagawa Y, Iwabuchi K, Onoe K. Co-operative action of interleukin-10 and interferon- γ to regulate dendritic cell functions. *Immunology* **2009**; 127:345–353.
 45. Delano MJ, Scumpia PO, Weinstein JS, 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**; 204:1463–1474.
 46. Serbina NV, Hohl TM, Cherny M, Pamer EG. Selective expansion of the monocytic lineage directed by bacterial infection. *J Immunol* **2009**; 183:1900–1910.
 47. Nagai Y, Garrett KP, Ohta S, et al. Toll-like receptors on hematopoietic progenitor cells stimulate innate immune system replenishment. *Immunity* **2006**; 24:801–812.
 48. Geissmann F, Auffray C, Palframan R, et al. Blood monocytes: distinct subsets, how they relate to dendritic cells, and their possible roles in the regulation of T-cell responses. *Immunol Cell Biol* **2008**; 86:398–408.
 49. Boasso A, Herbeval JP, Hardy AW, et al. HIV inhibits CD4⁺ T-cell proliferation by inducing indoleamine 2,3-dioxygenase in plasmacytoid dendritic cells. *Blood* **2007**; 109:3351–3359.
 50. Robinson CM, Hale PT, Carlin JM. NF- κ B activation contributes to indoleamine dioxygenase transcriptional synergy induced by IFN- γ and tumor necrosis factor- α . *Cytokine* **2006**; 35:53–61.

Article 2. HMGB1 induit une dysfonction des polynucléaires neutrophiles dans un modèle expérimental de sepsis et chez les patients qui survivent au choc septique

HMGB1 induces neutrophil dysfunction in experimental sepsis and in patients who survive septic shock

Murielle Grégoire, Jean-Marc Tadié, Fabrice Uhel, Arnaud Gacouin, Caroline Piau, Bone N, Yves Le Tulzo, Edward Abraham, Karin Tarte and Jaroslaw W Zmijewski.

Article soumis à Critical Care Medicine

Ce travail présente les résultats de l'étude du rôle de la protéine HMGB1 l'incapacité des polynucléaires neutrophiles à produire des ROS à la phase tardive du sepsis dans un modèle murin de sepsis polymicrobien et dans une série de 33 patients hospitalisés en réanimation pour un état de choc septique ou non septique.

Nous avons pu montrer dans un modèle murin de sepsis polymicrobien par ponction ligature cæcale qu'il existe une défaillance du burst oxydatif et des capacités de bactéricidie des polynucléaires neutrophiles. Cette dysfonction est due en partie à un effet inhibiteur de l'alarmine HMGB1 sur la NADPH oxydase.

De même, il existe chez les patients hospitalisés en réanimation qui ont survécu à un choc septique une altération similaire des capacités de bactéricidie des polynucléaires neutrophiles et du burst oxydatif, associés à des concentrations plasmatiques élevées d'HMGB1. La culture de polynucléaires de sujets sains en présence de plasma de patient septique diminuait l'activité de la NADPH oxydase. Cette activité était rétablie par l'ajout d'un anticorps inhibiteur d'HMGB1, suggérant le rôle de cette alarmine dans la dysfonction des polynucléaires chez l'homme.

Ces données suggèrent que la persistance d'HMGB1 au décours du sepsis chez la souris et chez l'homme pourrait contribuer à la persistance d'une défaillance des capacités bactéricides des polynucléaires neutrophiles. HMGB1 pourrait ainsi constituer une nouvelle cible thérapeutique afin de restaurer les capacités immunitaires des patients au décours d'une infection bactérienne grave.

Abstract

Objective: Sepsis is accompanied by the initial activation of proinflammatory pathways and long-lasting immunosuppression that appears to contribute to late onset mortality. Although high mobility group box 1 (HMGB1) is involved in many aspects of inflammation, its role in sepsis-induced immune suppression remains unclear. In these studies, we examined the ability of HMGB1 to contribute to dysfunction of neutrophil NADPH oxidase activity and associated neutrophil dependent bacterial clearance in mice subjected to sepsis and in patients that survive septic shock.

Design: Prospective, observational cohort study and Animal study.

Setting: Tertiary level ICU and associated research laboratory.

Patients: Patients admitted for septic shock (septic patients) or for other types of shock (control patients) were included.

Subjects: Male C57BL/6 mice.

Measurements and Main Results: Using a murine model of polymicrobial septic peritonitis, we demonstrated that treatment with anti-HMGB1 antibody significantly diminished sepsis-induced dysfunction of neutrophil NADPH oxidase activity. In a second set of experiments, we found that blocking HMGB1 preserved the ability of neutrophils from patients recovering from septic shock to activate NADPH oxidase.

Conclusions: Taken together, our data suggest that HMGB1 accumulation in the late phase of sepsis plays a specific role in the development of post-sepsis immunosuppression, and specifically neutrophil dependent antibacterial defense mechanisms. Thus, blocking HMGB1 may be a promising therapeutic intervention to diminish adverse effects of sepsis-induced immunosuppression.

Introduction

Sepsis is one of the leading causes of morbidity and mortality in intensive care units (ICUs) and affects more than one million critically ill patients each year in the United States alone (1). Although activation of the innate immune system is an essential step in bacterial clearance, the initial pro-inflammatory response of sepsis subsequently evolves to the development of an immune dysfunction (2-4). In particular, critically ill patients who develop chronic critical illness for longer than two weeks often evolve to a persistent state of immune suppression characterized by enhanced apoptosis of lymphocytes and immune cell dysfunction (4-6). It has been suggested that preservation of immune function in septic patients as well as recovery from immunosuppression would result in improved outcome in this setting (2, 7). In spite of advances in clinical and translational research, therapeutic interventions for sepsis are limited to use of antibiotics and fluid resuscitation as specific pharmacological treatment is not available for this condition. Similarly, there is no effective pharmacological approach to accelerate the recovery of dysfunctional neutrophils, monocytes, dendritic cells, and lymphocytes from sepsis-induced immunosuppression (1, 8-11). Of particular note, loss of phagocytic function and diminished microbial killing associated with severe infection are associated with deficient production of reactive oxygen species (ROS) which has adverse effects on dissemination of existing infection and acquired susceptibility to nosocomial infections and viral reactivation (12-14).

Neutrophils and macrophages are essential cell populations responsible for bacterial eradication, primarily through production of anti-bacterial peptides, cytokines and reactive oxygen/nitrogen species (ROS/RNS) (13, 15). Among antimicrobial mediators, activation of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase is a key mechanism linked to high output superoxide production, also known as oxidative burst (16, 17). NADPH oxidase consists of several subunits that form an active membrane-bound or soluble complex, assembled in response to specific signals triggered by microbial or fungal products (18). Dysfunction of NADPH oxidase has serious adverse effects on neutrophil-dependent bacterial clearance in experimental models of intra-abdominal polymicrobial sepsis and in patients with

chronic granulomatous disease (16, 19, 20). It is important to note that while NADPH oxidase is activated during the initial phase of polymicrobial sepsis, this event is followed by an impairment of polymorphonuclear neutrophil (PMN)-dependent ROS production at later time points (12). The exact mechanism responsible for development of such neutrophil dysfunction, which also affects newly produced neutrophils, is not well understood (21), but implicated in delayed or poor recovery of immune homeostasis in sepsis survivors.

We have recently shown that appearance of damage-associated molecular pattern (DAMP) proteins, in particular high-mobility group box 1 protein (HMGB1), diminished neutrophil-dependent bacterial killing in models of sepsis (17). HMGB1, originally described as a nuclear non-histone DNA-binding protein, has subsequently been shown to be an alarmin involved in inflammatory response (22, 23). HMGB1 released from dying cells promotes pro-inflammatory activation of immune cells and contributes to organ injury in polymicrobial sepsis and sterile inflammatory conditions associated with trauma and hemorrhage (23-27). Although plasma levels of HMGB1 are increased during sepsis, substantial amounts of HMGB1 are also present in the circulation for extended periods in patients following severe infection (23, 26). We hypothesized that such prolonged accumulation of extracellular HMGB1 might promote development of immunosuppression related to dysfunction of neutrophil NADPH oxidase and diminish bacterial clearance in mice subjected to sepsis and in patients that survive septic shock.

Material and methods

Patients and control participants

This study was performed in the infectious diseases department and intensive care unit (ICU) at Rennes University Hospital. The study design was approved by our ethic committee (CHU Rennes, n°13-8 and n°15.44-2) and informed consent was obtained. Patients admitted in our ICU for septic shock (septic patients) or for other types of shock (control patients) were included. Pregnant women, patients who were younger than 18 years old, patients with malignancy, HIV-infected patients, and patients receiving immunosuppressive agents were excluded. Standard criteria were used for diagnosis of septic shock (1). Patients admitted for other reasons than septic shock were also included as control. The following data were recorded: age, reason for admission, length of stay, mortality and occurrence of nosocomial infection. Nosocomial infections were defined as already described (28).

PMNs isolation and culture

Peripheral blood neutrophils (PMNs) were purified using whole blood CD15 microbeads (Miltenyi Biotec) as previously described (29). Purified fraction with at least 95% cell purity as evaluated by flow cytometry (Galios, Beckman Coulter) was used for further experiments. PMNs were cultured in RPMI 1640 containing 10% FBS.

Measurement of ROS

PMNs were incubated with or without plasma followed by stimulation with PMA (10 μ M, Sigma-Aldrich) for 15 minutes. To detect ROS production, PMNs were incubated with H2DCFDA probes (10 μ M, Invitrogen) for 30 minutes. Quantification of ROS production was performed by flow cytometry. Results were expressed as the ratio of mean fluorescence intensity (rMFI) obtained from PMA-treated to untreated PMNs.

PMNs Bacterial killing assay

PMNs (10⁶ cells) were incubated with *E. coli* (2 x10⁶) or MSSA (methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*) (2 x10⁶) for 12 hours. Cells were lysed using triton and serial dilutions incubated on agar plates overnight at 37°C. The amounts of viable bacteria colonies were calculated as colony forming units (CFU).

Mice

Male C57BL/6 mice were purchased from the National Cancer Institute–Frederick (Frederick, MD, USA). Male mice, 8 to 10 weeks of age, were used for experiments. The mice were kept on a 12-hours light-dark cycle with free access to food and water. All experiments were conducted in accordance with protocols approved by the University of Alabama at Birmingham Animal Care and Use Committee.

Reagents

RPMI 1640 was purchased from BioWhittaker (Walkersville, MD). FBS and penicillin-streptomycin were obtained from Gemini Bioproducts (Calabasas, CA). Hanks balanced salt solution (HBSS) was purchased from Invitrogen (Grand Island, NY). Custom antibody mixtures (Abs) and negative selection columns for PMNs isolation were from StemCell Technologies (Vancouver, Canada). Anti-phospho-p40phox (Thr154) antibody was purchased from Cell Signaling (Danvers, MA). Polyclonal antibodies to neutralize HMGB1 were prepared as previously described (30). Phorbol myristate acetate (PMA), *Escherichia coli* 0111:B4 endotoxin (LPS), IgG, were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Cecal ligation and puncture (CLP) -induced sepsis

Animals underwent cecal ligation and puncture (CLP) or sham laparotomy (sham). For animals that received CLP or sham laparotomy, a midline abdominal incision was made under isoflurane anesthesia. For animals that received CLP, the cecum was

mobilized and ligated in the middle of cecum below the ileocecal valve, punctured once using a 21-G needle and a small stool sample was squeezed out of the cecum to induce polymicrobial peritonitis (31). The cecum was then replaced into the abdominal cavity, and the abdominal wall was closed in layers. Antibiotic therapy (25 mg/kg imipenem) was initiated 4 hours after CLP or sham laparotomy and administered by subcutaneous injection every 12 hours for 5 days. Saline for fluid resuscitation was administered to create a more clinically relevant sepsis model as this is standard care for humans. Mice were then sacrificed 7 days after surgery and bone marrow PMNs were isolated (Figure 1A). In a second set of experiments, mice underwent CLP and neutralizing anti-hmgb1 antibody (125 µg, 500 µl PBS) or IgG were administered with antibiotics for five days. Mice were then sacrificed 7 days after surgery and bone marrow PMNs were isolated.

PMNs isolation and culture

Bone marrow PMNs were isolated as described previously (17). PMNs were cultured in RPMI 1640 medium containing 5% FBS and treated as indicated in the figure legends. PMNs viability under experimental conditions was determined using trypan blue staining and was consistently greater than 95%.

Assay for NADPH activity.

NADPH oxidase activity was measured using a standard cytochrome c reduction assay as previously described (17). Briefly, PMNs (5×10^5 /ml) were incubated with cytochrome c (10 µM) in the presence or absence of *E. coli* (10⁶/ml) or HMGB1 (300 ng/ml) in 1 ml of HBSS. The rate of cytochrome c reduction was recorded using a spectrophotometer (UV-2501PC Shimadzu; Shimadzu, Japan) for 15 minutes.

In vitro killing activity assay.

PMNs (0.5×10^6) were incubated with ampicillin-resistant *E. coli* DH5 α (1×10^6) in RPMI 1640 medium (1 ml) without serum for 2, 6 and 16 hours at 37°C. Next, 20 μ l of cell/bacterial suspension was incubated with 480 μ l Triton X-100 (0.1%) for 10 minutes to lyse PMNs. Serial dilutions were then plated on agar plates with ampicillin and incubated overnight at 37°C. The number of bacterial colonies on agar plates was determined using colony counter software (Bio-Rad, Hercules, CA).

Western blot analysis

Western blot analysis was performed as previously described (30). Briefly, equal amounts of protein were resolved using 8 or 12% SDS-PAGE and transferred onto PVDF membranes (polyvinylidenedifluoride membrane, Immobilon-P; Millipore, Billerica, MA). To measure the amount of total and phosphorylated proteins, membranes were probed with specific antibodies followed by detection with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG. Bands were visualized by enhanced chemiluminescence (ECL Plus, Amersham) and quantified by AlphaEase FC software (Alpha Innotech, San Leandro, CA). Each experiment was carried out two or more times.

Results

Deficient oxidative burst and diminished bacterial killing is associated with neutrophil dysfunction in experimental sepsis

To examine the nature of neutrophil dysfunction during sepsis, mice were subjected to cecal ligation and puncture (CLP), with control mice receiving only abdominal incision and exposure of cecum (sham group). Similar to antibiotic regimes administered in critically ill patients, mice were also treated with imipenem (25 mg/kg), each day for total of 5 days (Figure 1A). Early administration of antibiotics resulted in marked improvement of viability as 100% of mice on imipenem survived at least 7 days whereas those without antibiotics incurred 80% mortality within 48 hours (data not shown). The extent of immunosuppression was determined by measurement of neutrophil oxidative burst, e.g. NADPH oxidase-derived superoxide formation, in PMA-stimulated bone marrow neutrophils that were isolated from mice 7 days after sham procedures or CLP. As shown in Figure 1B, significant reduction in NADPH oxidase activation was found in post-sepsis neutrophils, as compared to those obtained from the sham group. Along with dysfunctional oxidative burst, post-sepsis neutrophils also had diminished capacity to kill bacteria (Figure 1C).

HMGB1 inhibits neutrophil NADPH oxidase activation and bacterial killing

As shown in Figure 2A, development of post-sepsis immunosuppression is associated with prolonged accumulation of HMGB1 in plasma. Recently, we have shown that direct exposure of murine neutrophils to HMGB1 resulted in diminished capacity for PMA-stimulated oxidative burst (17). We further examined if a similar inhibitory mechanism affected oxidative burst activity in the presence of bacteria. As shown in Figure 2B, adjunction of HMGB1 effectively reduced NADPH oxidase activation in the presence of *E. coli*.

NADPH oxidase requires phosphorylation and assembly of several subunits, including activatory phosphorylation of p40phox (19). Indeed, a robust increase of p40phox phosphorylation occurs promptly after stimulation of neutrophils (control)

with PMA. However, there was little to no p40phox phosphorylation in neutrophils isolated 7 days after CLP (Figure 2B).

Next, to establish the importance of HMGB1 in regulating sepsis-mediated neutrophil dysfunction, septic mice were intravenously injected HMGB1 neutralizing antibody or isotype specific (control) IgG.

Of note, PMA-induced p40phox phosphorylation was preserved in neutrophils isolated from mice treated with CLP and anti-HMGB1 antibody, but not in neutrophils obtained from mice subjected to sepsis and control IgG (Figure 2C).

These results suggest that HMGB1 plays an important role in acquisition of the neutrophil immunosuppressive phenotype that is characterized by diminished oxidative burst.

Deficient oxidative burst and bacterial killing persist in PMNs of patients who survive septic shock

Critically ill patients with sepsis frequently demonstrate evidence of prolonged immunosuppression, as characterized by immune cell dysfunction and increased susceptibility to nosocomial infections (3). To establish whether loss of bacterial killing is associated with dysfunctional NADPH oxidase, oxidative burst was measured in PMNs obtained from patients 7 days after septic shock, from critically ill patients without sepsis or from healthy donors (Figure 3A). A total of 33 patients, including 21 patients with septic shock (infective endocarditis = 6 pneumonia = 5, Urinary tract infection =3, intra-abdominal infection = 3, bacteremia = 2 and meningitis= 2) and 12 critically ill non-septic patients (ARDS =5, cardiogenic shock = 2, status epilepticus =2, cardiac arrest = 2, stroke = 1), were prospectively enrolled and compared with 16 healthy control participants. Characteristics of patients included in the study are shown in table 1.

PMNs loaded with redox sensitive H₂DCF-DA fluorogenic probe (32, 33) were treated with PMA to stimulate NADPH oxidase. Then, DCF fluorescence was measured using flow cytometry. As shown in Figures 3B and C, neutrophils from healthy donors or critically ill patients without sepsis had robust activation of NADPH oxidase. Conversely, this response was reduced in neutrophils from patients with a

history of septic shock. Of note, decrease in NADPH oxidase activity was also associated with diminished bacterial killing; this was shown using neutrophils from patients who had sepsis or a non-septic critical illness, and neutrophils from healthy donors cultured with *E. coli* or MSSA (Figures 3C).

HMGB1 promotes dysfunction of neutrophils following sepsis

As previously shown in preclinical models of polymicrobial infection and in patients surviving sepsis (23, 34), high plasma levels of HMGB1 persist after sepsis resolution (Figure 4A). However, it is not known whether prolonged accumulation of extracellular HMGB1 contributes to complications after sepsis, including increased susceptibility to secondary infections. As shown in Figure 4B, culture of healthy donors neutrophils in the presence of plasma from post-sepsis patients, compared with plasma from healthy donors or critically ill patients without sepsis, resulted in a substantial loss of oxidative burst. Because HMGB1 reduced NADPH oxidase activation in mice subjected to polymicrobial sepsis, we examined if similar immunosuppressive effects mediated by HMGB1 could be found in patients after septic shock. To assess this hypothesis, neutrophils from healthy donors were cultured with plasma obtained from post-sepsis patients in the presence of HMGB1 neutralizing antibody or control isotype. As shown in Figure 4C, anti-HMGB1 antibody preserved the ability of neutrophils to activate NADPH oxidase when compared to control IgG. These results suggest that persistent high plasma levels of HMGB1 in post-sepsis patients are involved in the diminished activity of neutrophil NADPH oxidase and may play an important role in the development of immune suppression.

Discussion

In the present studies, increased amounts of circulating HMGB1 have substantial impact on the development of neutrophil immunosuppressive phenotypes in a mouse model of intra-abdominal polymicrobial sepsis and in patients that survive septic shock. In particular, we found that exposure of neutrophils to HMGB1 directly suppressed PMA or *E. coli* -induced oxidative burst and the ability of neutrophils to eradicate bacteria. In turn, neutralization of HMGB1 effectively prevented neutrophil dysfunction and preserved their capacity for bacterial clearance. We also demonstrated that circulating amounts of HMGB1 were sufficient to diminish neutrophil oxidative burst in patients that survive septic shock. Moreover, our data indicate that neutrophils obtained from healthy or critically ill patients without sepsis developed a phenotype consistent with immunosuppression, as defined by diminished oxidative burst and bacterial killing, after culture with plasma from patients recovering from sepsis. The inhibitory effects of septic plasma on neutrophil activation could be prevented by an anti-HMGB1 neutralizing antibody.

Although recent studies have shown improved survival of patients in the first several days following sepsis (35), multiple long term complications remain, including frailty, cognitive impairment, diminished ability to contain ongoing infections as well as an increased risk of acquiring nosocomial bacterial, viral and fungal infections (36, 37). While most studies have focused on the detrimental effects of activated PMNs during the early pro-inflammatory phase of sepsis, less is known about mechanisms linked to loss of anti-bacterial action by existing and newly produced PMNs during later periods after severe infection. Of note, experimental studies have shown impairment of innate immune responses, especially dysfunction of neutrophil oxidative burst and increased susceptibility to secondary infections, including *P. aeruginosa*, following the induction of severe infection (38).

Our previous studies suggested that HMGB1 interfered with NADPH oxidase functional assembly, including phosphorylation of p40phox (17). Such findings are confirmed by these current studies that demonstrated the ability of HMGB1 to

diminish oxidative burst and bacterial clearance by neutrophils isolated from mice treated for CLP-induced sepsis or from patients recovering from septic shock.

In addition to inducing a decrease in oxidative burst, a possible mechanism by which HMGB1 affects neutrophil function is related to impairment of neutrophil chemotaxis and failure to target infectious foci for bacterial eradication. In particular, modulation of neutrophil mitochondrial membrane potential is directly linked to neutrophil dysfunctional motility and diminished NADPH oxidase activation (39). Of note, this concept is supported by distal localization of mitochondria in polarized neutrophils that was recently linked to ATP extracellular flux and enhanced neutrophil directional motility (40). HMGB1 was recently implicated in mitochondrial depolarization and Warburg effects (41).

Although HMGB1 is released from dying cells, activated macrophages and other cell populations during inflammation, the pathophysiologic impact of late accumulation of extracellular HMGB1 is not well understood. In particular, elevated levels of HMGB1 in the circulation appear to be similar between survivors and non-survivors of severe infection and do not predict hospital mortality (26). However, neutralization of HMGB1 with anti-HMGB1 antibody had favorable outcome in experimental sepsis (23, 24, 42). Moreover, improved clinical outcome was observed in sepsis patients that produced substantial amounts of anti-HMGB1 antibody (43). Previous studies have shown that besides sepsis, trauma/hemorrhage is also associated with development of immunosuppression accompanied by the release of DAMPs, including HMGB1 (44, 45). In addition, elevated amounts of HMGB1 in circulation are also associated with a reduced function of the immune system in diabetes, patients subjected to therapies for cancer, and chronic inflammatory conditions resulting from atherosclerosis or rheumatoid arthritis (23, 44).

Our data suggest that HMGB1 accumulation in the late phase of sepsis contributes to the development of post-sepsis immunosuppression through inhibiting neutrophil dependent antimicrobial defense mechanisms. Blocking HMGB1 may be a promising therapeutic intervention to diminish adverse effects of sepsis induced immunosuppression and to improve recovery of immune homeostasis in this setting.

Table 1. Patient characteristics.

	Post-septic patients N=21	Critically ill nonseptic patients N=12	<i>P</i>
Age, median years [IQR]	63 [49-69]	62 [57.8-71.8]	0.79
Outcome			
Survivor n (%)	15 (71%)	10 (83%)	0.37
Nonsurvivor n (%)	6 (29%)	2 (17%)	
Nosocomial Infections n (%)	6 (29%)	3 (25%)	0.58
Length of stay in ICU median days [IQR]	11 [8-29]	13 [8.8-28.5]	0.63

REFERENCES

1. Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *The New England journal of medicine*. 2013;369(9):840-51.
2. 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.
3. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *The Lancet Infectious diseases*. 2013;13(3):260-8.
4. Benjamim CF, Hogaboam CM, Kunkel SL. The chronic consequences of severe sepsis. *Journal of leukocyte biology*. 2004;75(3):408-12.
5. Hotchkiss RS, Coopersmith CM, McDunn JE, Ferguson TA. The sepsis seesaw: tilting toward immunosuppression. *Nature medicine*. 2009;15(5):496-7.
6. Le Tulzo Y, Pangault C, Amiot L, Guilloux V, Tribut O, Arvieux C, et al. Monocyte human leukocyte antigen-DR transcriptional downregulation by cortisol during septic shock. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2004;169(10):1144-51.
7. Ward PA. Immunosuppression in sepsis. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2011;306(23):2618-9.
8. Cohen J, Opal S, Calandra T. Sepsis studies need new direction. *The Lancet Infectious diseases*. 2012;12(7):503-5.
9. Vincent JL, Opal SM, Marshall JC, Tracey KJ. Sepsis definitions: time for change. *Lancet*. 2013;381(9868):774-5.
10. Leentjens J, Kox M, Koch RM, Preijers F, Joosten LA, van der Hoeven JG, et al. Reversal of immunoparalysis in humans in vivo: a double-blind, placebo-controlled, randomized pilot study. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2012;186(9):838-45.
11. 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. *Critical care medicine*. 2013;41(2):580-637.
12. 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. *Critical care medicine*. 2002;30(2):315-22.
13. Kolaczkowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(3):159-75.
14. Grailer JJ, Kalbitz M, Zetoune FS, Ward PA. Persistent neutrophil dysfunction and suppression of acute lung injury in mice following cecal ligation and puncture sepsis. *Journal of innate immunity*. 2014;6(5):695-705.

15. Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(8):519-31.
16. Segal AW. How neutrophils kill microbes. *Annual review of immunology*. 2005;23:197-223.
17. Tadie JM, Bae HB, Banerjee S, Zmijewski JW, Abraham E. Differential activation of RAGE by HMGB1 modulates neutrophil-associated NADPH oxidase activity and bacterial killing. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2012;302(1):C249-56.
18. Panday A, Sahoo MK, Osorio D, Batra S. NADPH oxidases: an overview from structure to innate immunity-associated pathologies. *Cellular & molecular immunology*. 2015;12(1):5-23.
19. Groemping Y, Rittinger K. Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. *The Biochemical journal*. 2005;386(Pt 3):401-16.
20. Geiszt M, Kapus A, Ligeti E. Chronic granulomatous disease: more than the lack of superoxide? *Journal of leukocyte biology*. 2001;69(2):191-6.
21. Demaret J, Venet F, Friggeri A, Cazalis MA, Plassais J, Jallades L, et al. Marked alterations of neutrophil functions during sepsis-induced immunosuppression. *Journal of leukocyte biology*. 2015.
22. Bianchi ME. HMGB1 loves company. *Journal of leukocyte biology*. 2009;86(3):573-6.
23. Andersson U, Tracey KJ. HMGB1 is a therapeutic target for sterile inflammation and infection. *Annual review of immunology*. 2011;29:139-62.
24. Wang H, Ward MF, Sama AE. Novel HMGB1-inhibiting therapeutic agents for experimental sepsis. *Shock*. 2009;32(4):348-57.
25. Manganelli V, Signore M, Pacini I, Misasi R, Tellan G, Garofalo T, et al. Increased HMGB1 expression and release by mononuclear cells following surgical/anesthesia trauma. *Critical care*. 2010;14(6):R197.
26. Gibot S, Massin F, Cravoisy A, Barraud D, Nace L, Levy B, et al. High-mobility group box 1 protein plasma concentrations during septic shock. *Intensive care medicine*. 2007;33(8):1347-53.
27. Karlsson S, Pettila V, Tenhunen J, Laru-Sompa R, Hynninen M, Ruokonen E. HMGB1 as a predictor of organ dysfunction and outcome in patients with severe sepsis. *Intensive care medicine*. 2008;34(6):1046-53.
28. Tadie JM, Trinquart L, Janniere-Nartey C, Guerot E, Louis B, Fagon JY, et al. Prediction of nosocomial infection acquisition in ventilated patients by nasal nitric oxide: proof-of-concept study. *Shock*. 2010;34(3):217-21.

29. Gregoire M, Guilloton F, Pangault C, Mourcin F, Sok P, Latour M, et al. Neutrophils trigger a NF-kappaB dependent polarization of tumor-supportive stromal cells in germinal center B-cell lymphomas. *Oncotarget*. 2015;6(18):16471-87.
30. Tadie JM, Bae HB, Deshane JS, Bell CP, Lazarowski ER, Chaplin DD, et al. Toll-like receptor 4 engagement inhibits adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase activation through a high mobility group box 1 protein-dependent mechanism. *Molecular medicine*. 2012;18:659-68.
31. Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, Ward PA. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nature protocols*. 2009;4(1):31-6.
32. Wrona M, Patel K, Wardman P. Reactivity of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 and their oxidized forms toward carbonate, nitrogen dioxide, and hydroxyl radicals. *Free Radic Biol Med*. 2005;38(2):262-70.
33. Zmijewski JW, Banerjee S, Bae H, Friggeri A, Lazarowski ER, Abraham E. Exposure to hydrogen peroxide induces oxidation and activation of AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem*. 2010;285(43):33154-64.
34. Lotze MT, Tracey KJ. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(4):331-42.
35. Stevenson EK, Rubenstein AR, Radin GT, Wiener RS, Walkey AJ. Two decades of mortality trends among patients with severe sepsis: a comparative meta-analysis*. *Critical care medicine*. 2014;42(3):625-31.
36. Luyt CE, Combes A, Deback C, Aubriot-Lorton MH, Nieszkowska A, Trouillet JL, et al. Herpes simplex virus lung infection in patients undergoing prolonged mechanical ventilation. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2007;175(9):935-42.
37. Limaye AP, Kirby KA, Rubenfeld GD, Leisenring WM, Bulger EM, Neff MJ, et al. Cytomegalovirus reactivation in critically ill immunocompetent patients. *Jama*. 2008;300(4):413-22.
38. Liu Z, Bone N, Jiang S, Park DW, Tadie JM, Deshane J, et al. AMP-activated protein kinase and Glycogen Synthase Kinase 3beta modulate the severity of sepsis-induced lung injury. *Molecular medicine*. 2015.
39. Fossati G, Moulding DA, Spiller DG, Moots RJ, White MR, Edwards SW. The mitochondrial network of human neutrophils: role in chemotaxis, phagocytosis, respiratory burst activation, and commitment to apoptosis. *Journal of immunology*. 2003;170(4):1964-72.
40. Jiang S, Park DW, Stigler WS, Creighton J, Ravi S, Darley-Usmar V, et al. Mitochondria and AMP-activated protein kinase-dependent mechanism of efferocytosis. *The Journal of biological chemistry*. 2013;288(36):26013-26.

41. Yang L, Xie M, Yang M, Yu Y, Zhu S, Hou W, et al. PKM2 regulates the Warburg effect and promotes HMGB1 release in sepsis. *Nature communications*. 2014;5:4436.
42. Entezari M, Weiss DJ, Sitapara R, Whittaker L, Wargo MJ, Li J, et al. Inhibition of high-mobility group box 1 protein (HMGB1) enhances bacterial clearance and protects against *Pseudomonas Aeruginosa* pneumonia in cystic fibrosis. *Molecular medicine*. 2012;18:477-85.
43. Barnay-Verdier S, Fattoum L, Borde C, Kaveri S, Gibot S, Marechal V. Emergence of autoantibodies to HMGB1 is associated with survival in patients with septic shock. *Intensive care medicine*. 2011;37(6):957-62.
44. Sims GP, Rowe DC, Rietdijk ST, Herbst R, Coyle AJ. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annual review of immunology*. 2010;28:367-88.
45. LeBlanc PM, Doggett TA, Choi J, Hancock MA, Durocher Y, Frank F, et al. An immunogenic peptide in the A-box of HMGB1 protein reverses apoptosis-induced tolerance through RAGE receptor. *The Journal of biological chemistry*. 2014;289(11):7777-86.

FIGURE LEGENDS

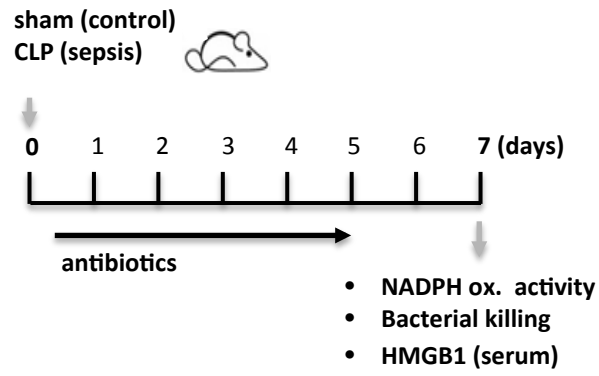
Figure 1. Mice subjected to intra-abdominal polymicrobial sepsis develop neutrophil dysfunction. (A) Mice subjected to cecal ligation and puncture (CLP)-induced sepsis or sham surgery were treated with antibiotics for 5 days followed by measurement of neutrophil function at day 7. Panel (B) shows the extent of NADPH oxidase activation in PMA-stimulated bone marrow neutrophils obtained from control (sham) or mice with CLP. (C) Bacterial clearance was determined after culture of neutrophils (CLP or control) with *E. coli* for indicated time period. Means \pm SD, n = 6, ** P < 0.01, NS -not significant.

Figure 2. HMGB1 diminishes neutrophil oxidative burst. (A) Western blot and quantitative analysis show the amount of HMGB1 in sera of mice obtained 7 days after CLP or sham. Means \pm SD, n = 5, ** P < 0.01. (B) Representative rates of cytochrome c reduction show NADPH oxidase inactivation in neutrophils treated with HMGB1 (0 or 300 ng/ml) for 15 minutes. Oxidative burst was determined after inclusion of *E. coli* (10⁶/ml) for 15 minutes. (C) Anti-HMGB1 neutralizing antibody prevent CLP-mediated dysfunction of neutrophil NADPH oxidase. Sham and CLP-induced sepsis mice were treated with HMGB1-neutralizing antibody (125 μ g) or control isotype specific IgG for (5 days). NADPH oxidase subunit phospho-phox40 (left panel) or oxidative burst (right panel) was then determined in bone marrow neutrophil stimulated using PMA (0 or 10 nM) for 15 minutes. (Means \pm SD, n = 3, ** P < 0.01).

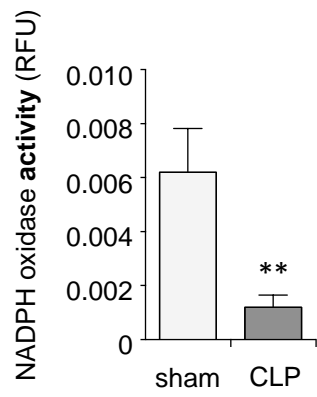
Figure 3. Human PMNs display diminished NADPH oxidase activation and a reduced ability to kill bacteria in patients that survived septic shock. (A) PMNs purified from blood of healthy donors, ICU non-septic or septic patients 7 day after shock onset were (B) loaded with H2DCF-DA and treated with PMA (0 or 10 μ M) for 30 minutes followed by measurement of ROS production before and after stimulation with PMA (10 nM) for 15 minutes. Representative FACS analyses show the extent of ROS production in untreated (gray) on stimulated (black) PMNs. (C) PMA-stimulated NADPH oxidase activation that was determined in PMNs isolated from patients with septic shock, non-septic patients and healthy donors (Means \pm SD, n = 6-7, ** P < 0.05). (D) PMNs (10⁶ cells) obtained from healthy or post-sepsis patients were incubated with E. coli or methicillin-susceptible Staphylococcus aureus (MSSA) for 16 hours and the amount of viable bacteria was determined using colony forming units (CFU) assay (Means \pm SD, n = 6-7, * P < 0.05).

Figure 4. HMGB1 in plasma of post sepsis patients promote dysfunction of PMNs oxidative burst. (A) The amount of HMGB1 was determined in plasma of healthy donors, non-sepsis patients or 7 days after septic shock (Means \pm SD, n = 6-8, * P < 0.05, Ns- not significant). (B) Healthy donor PMNs were incubated with plasma of healthy, non-sepsis or sepsis patients for 30 minutes and then oxidative burst was determined after stimulation with PMA (Means \pm SD, n = 6-8, * P < 0.05, Ns- not significant). (C) HMGB1-neutralizing antibody prevented the inhibitory action of post-sepsis plasma. Plasma obtained from post septic patients was treated with HMGB1-neutralizing antibody (50 μ g) or IgG (isotype control) for two hours and then treated plasma was used to culture with healthy donors PMNs for an additional 30 minutes. Oxidative burst was measured after inclusion of PMA (0 or 10 nM) for 15 minutes. Means \pm SD, n = 6, * P < 0.05.

A



B



C

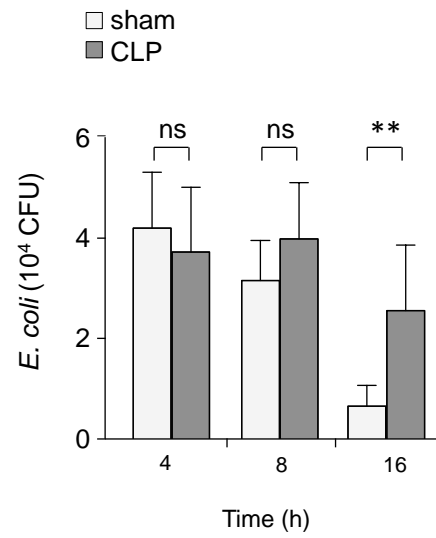
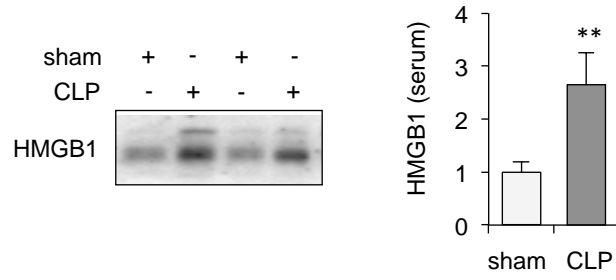
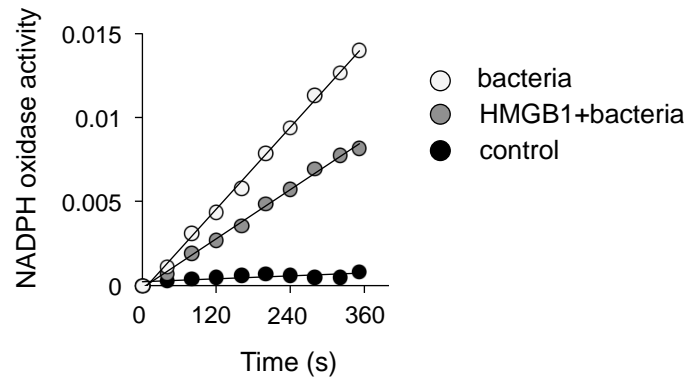


Figure 1

A



B



C

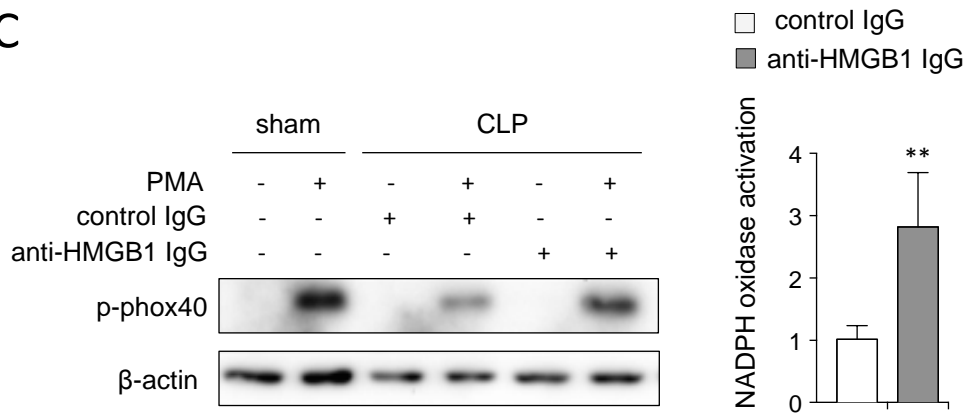


Figure 2

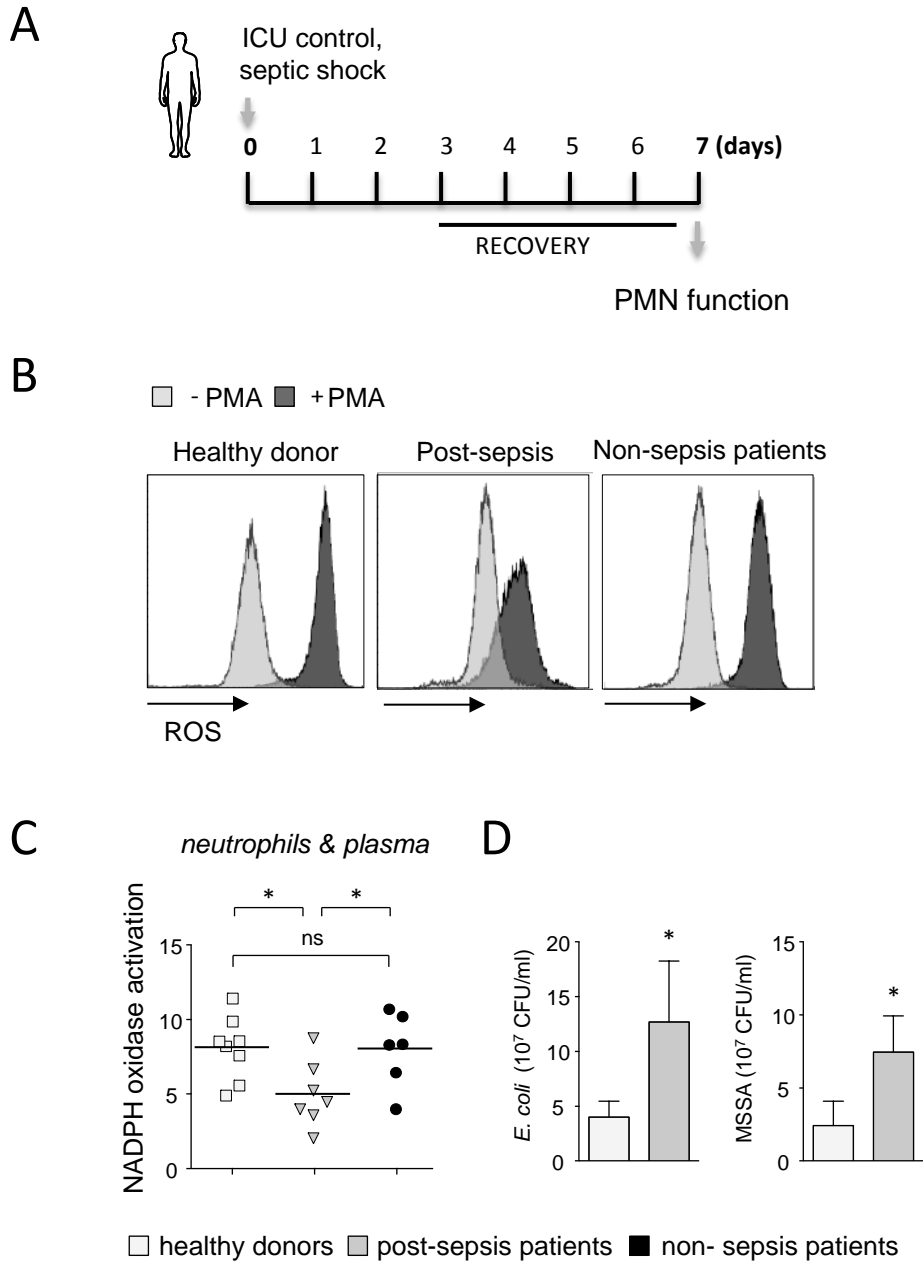
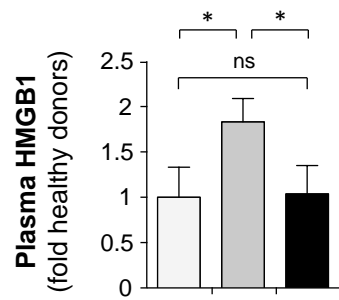


Figure 3

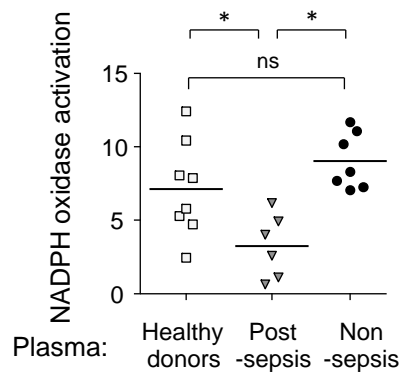
A

□ healthy donors
■ post-sepsis patients
■ non-sepsis patients



B

healthy donors PMNs



C

healthy donors PMNs

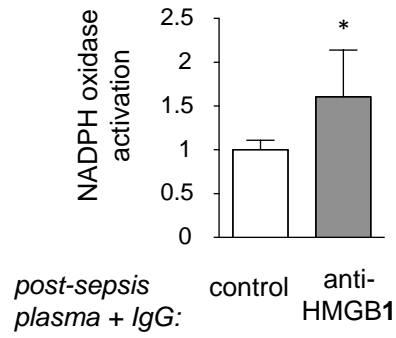


Figure 4

Article 3. L'expansion précoce de cellules suppressives d'origine myéloïde circulantes prédit le développement d'infections nosocomiales chez les patients septiques.

Early expansion of circulating Myeloid-derived suppressor cells predicts the development of nosocomial infections in septic patients.

Fabrice Uhel, Imane Azzaoui, Murielle Grégoire, Céline Pangault, Joelle Dulong, Jean-Marc Tadié, Arnaud Gacouin, Christophe Camus, Luc Cynober, Thierry Fest, Yves Le Tulzo, Mikael Roussel, and Karin Tarte,

Article soumis à American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine

Ce travail, constituant le cœur de cette thèse, présente les résultats de l'étude de l'origine, des fonctions suppressives et de l'impact clinique des MDSC au cours du sepsis.

Nous avons pu montrer que les cellules myéloïdes circulantes au cours du choc septique présentent un phénotype suppresseur, caractérisé par une augmentation significative du nombre de MDSC monocytaires (M-MDSC) CD14⁺HLA-DR^{low/-} et de la proportion de granulocytes de faible densité CD14⁻CD15⁺ identifiés comme étant des MDSC granulocytaires (G-MDSC). Il existe dans le sang des patients septiques une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans le recrutement, le phénotype et les fonctions suppressives des MDSC, en particulier *S100A8*, *S100A9*, *MMP8* et *ARG1*. Les taux plasmatiques des protéines *S100A8/A9*, arginase 1 ainsi que l'activité IDO étaient également augmentés. *In vitro*, la déplétion des cellules CD14 et CD15 permettait de restaurer la prolifération des lymphocytes T, confirmant le caractère suppresseur des M- et G-MDSC. Il existe par ailleurs une activité IDO portée par les G- et M-MDSC et une activité arginase portée spécifiquement par les G-MDSC. Nous avons ensuite pu montrer que les G-MDSC étaient constitués d'un ensemble hétérogène de cellules matures et immatures exprimant des marqueurs de dégranulation.

Enfin, nous avons pu montrer que l'augmentation initiale de la proportion de G-MDSC était associée au développement secondaire d'infections nosocomiales.

Early expansion of circulating Myeloid-derived suppressor cells predicts the development of nosocomial infections in septic patients.

Fabrice Uhel, MD^{1,2,3}, Imane Azzaoui, PhD^{3,4,5,6}, Murielle Grégoire, PhD^{3,4,5,6}, Céline Pangault, PharmD, PhD^{3,4,5,6}, Joelle Dulong, MBiol^{3,5,6}, Jean-Marc Tadié, MD, PhD^{1,2,3,5}, Arnaud Gacouin, MD^{1,2}, Christophe Camus, MD, PhD^{1,2}, Luc Cynober, PharmD, PhD⁷, Thierry Fest, MD, PhD^{3,4,5,6}, Yves Le Tulzo, MD, PhD^{1,2,3,5}, Mikael Roussel, MD, PhD^{3,4,5,6} and Karin Tarte, MD, PhD^{3,4,5,6}

¹ CHU Rennes, Maladies Infectieuses et Réanimation Médicale, F-35033 RENNES, France

² CHU Rennes, Inserm CIC-1414, F-35033 RENNES, France

³ INSERM, UMR U917, Rennes, France

⁴ CHU Rennes, Pôle Biologie, F-35033 RENNES, France

⁵ Université Rennes 1, UMR917, Rennes, France

⁶ EFS Bretagne, F-35016 RENNES, France

⁷ AP-HP Hôpital Cochin, Service de Biochimie, F-75014 PARIS, France

Corresponding author

Fabrice Uhel, Service des Maladies Infectieuses et Réanimation Médicale, CHU Pontchaillou, 2 rue Henri Le Guilloux, F-35033 Rennes Cedex 9, France; e-mail: fabrice.uhel@chu-rennes.fr; Phone: +33(0) 299 284 248; Fax: +33(0) 299 284 164.

Karin Tarte, INSERM U917, Faculté de Médecine, 2 Avenue du Pr Léon Bernard, F-35043 Rennes France, E-mail: karin.tarte@univ-rennes1.fr, Phone: +33 (0) 223 234 512, fax: +33 (0) 223 234 958.

Keywords

Sepsis, granulocytes, monocytes, cross infection, immune tolerance.

ABSTRACT

Rationale: Sepsis results in a sustained immune dysfunction responsible for poor prognosis and nosocomial infections. Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs), a heterogeneous population of cells characterized by their ability to suppress T-cell responses in cancers and inflammatory diseases, are poorly described in septic patients.

Objective: To characterize phenotype, function and clinical impact of MDSCs in septic patients.

Methods: In a prospective cohort of septic patients (n=94) and healthy controls (n=67), peripheral blood myeloid cell subsets were quantified by flow cytometry. The expression of 44 immune-related genes was studied by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction on whole blood RNA. MDSC mediators were quantified in plasma. *In vitro*, T-cell proliferation, arginase and Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) activities were assessed after depletion or not of CD14^{pos} or CD15^{pos} cells.

Measurements and main results: Peripheral CD14^{pos}HLA-DR^{low/neg} monocytic-MDSCs and CD14^{neg}CD15^{pos} low-density granulocytes identified as granulocytic-MDSCs were increased in septic patients (p<.0001). MDSC-related factors including *S100A8*, *S100A9*, *ARG1* were significantly increased at the transcriptomic and protein level in the blood of septic patients. *In vitro*, depletion of monocytic- and granulocytic restored T-cell proliferation. An arginase activity was specifically burden by G-MDSCs and an IDO activity relied on both M- and G-MDSCs. G-MDSCs were composed of immature and mature granulocytes expressing high levels of

degranulation markers. The initial proportion of G-MDSC predicted occurrence of nosocomial infections.

Conclusions: CD14^{pos}HLA-DR^{low/neg} M-MDSCs and CD15^{pos} G-MDSCs display arginase 1 and IDO activity *in vitro* and strongly contribute to T cell dysfunction in septic patients. The initial proportion of G-MDSCs predicts the development of nosocomial infections in septic patients.

INTRODUCTION

Sepsis is one of the leading causes of admission in intensive care units (ICUs). Despite a decreased overall mortality rate during the past three decades (1, 2), the prognosis remains hampered by a high long term mortality (3) secondary to nosocomial infections with opportunistic pathogens (4) or viral reactivations (5, 6), an increased risk of cardiovascular events and cancers (7), but also frequent hospital readmissions causing increased healthcare costs (8). This unfavorable outcome has been largely attributed to a persistent immunological impairment affecting both innate and adaptive immunity (9). To date, the most described features are i) monocyte dysfunction illustrated by reduced expression of HLA-DR and impaired production of inflammatory cytokines after a new bacterial challenge *in vitro* (10, 11), ii) functional impairment of polymorphonuclear neutrophil preceding nosocomial infections (12), iii) lymphopenia and lymphocyte dysfunction associated with an increased proportion and suppressive activity of regulatory T cells (Tregs) (13, 14) and iv) enhanced systemic indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) activity associated with mortality (15).

During the past decade, much attention has focused on a heterogeneous population of cells from the myeloid lineage called myeloid-derived suppressor cells (MDSCs), which have demonstrated to play potent immunosuppressive functions in cancers and inflammatory diseases (16, 17). In cancer, their induction is mediated by many soluble factors (such as S100A8/A9, GM-CSF, G-CSF, IL-4, IL-6, IL-10, VEGF or TGF- β). Various mechanisms have been proposed to support their suppressive activity, including depletion of arginine and tryptophan by arginase 1 and IDO,

respectively (18, 19); production of reactive oxygen species (ROS) by NADPH oxidase (NOX 2) (20); release of IL-10 or TGF- β and induction of Tregs (21). Two main subsets, monocytic (M)-MDSCs and granulocytic (G)-MDSCs have been identified, but their definition and role in humans remains elusive due to the lack of specific phenotypic markers (22).

CD14^{pos}HLA-DR^{low/neg} cells described more than 15 years ago as TLR-unresponsive cells in septic patients were recently reconsidered as M-MDSCs (23) but were not evaluated for their suppressive functions. Conversely, G-MDSCs with various phenotypes, including CD15^{pos} cells with decreased CD10 and CD16 expression (24), Lin^{neg}CD33^{pos}CD15^{pos}HLA-DR^{neg} cells (25), or CD15^{pos} low density granulocytes (LDGs) that co-purify with peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) after density gradient centrifugation (26), were shown to be expanded in septic and in ICU non-septic patients and to display T-cell inhibitory activity. Especially, CD15^{pos} LDGs were recently proposed to variably display either arginase or ROS-dependent inhibitory effects with a potential impact of causative pathogens (23, 26). However, the low number of patients studied and the controversial phenotype, origin, and function of putative suppressor cells preclude any definitive conclusion on the clinical impact, mechanisms of action, and role of MDSCs in septic patients.

Consequently, our objectives were i) to highlight the various potential MDSC subsets within the circulating myeloid compartment, ii) to characterize their suppressive activity, iii) to clarify their origins, and iv) to study the clinical impact of these cells in septic patients.

MATERIALS AND METHODS

Patients and healthy donor participants

This study was performed in the ICU at Rennes University Hospital. A total of 94 consecutive adult septic patients, including 22 patients with severe sepsis and 72 patients with septic shock, were prospectively enrolled, and compared with 67 healthy donors (HD). The study design was approved by the local institutional review board and written informed consents were obtained. Pregnant women, patients younger than 18 years old, patients with malignancy, HIV infection, or receiving and receiving immunosuppressive agents were excluded. The standard criteria were used for diagnosis of severe sepsis and septic shock (27). The Simplified Acute Physiology Score (SAPS II), the Sepsis-related Organ Failure Assessment (SOFA) score and the Logistic Organ Dysfunction (LOD) system at admission in ICU were used to assess severity of sepsis (28, 30). The occurrence of nosocomial infections during hospitalization was prospectively recorded and defined as previously described (31).

Samples

Blood heparinized samples were collected within 3 days following sepsis diagnosis. The delay between blood sampling and the beginning of laboratory procedures was < 1h. PBMCs were isolated by Ficoll density gradient, and plasma samples were stored at -80°C until use. For transcriptomic assays, whole blood RNA samples collected on PAXGene Blood RNA tubes (PreAnalytiX, Hombrechtikon, Switzerland) came from a previously published cohort of septic patients (15).

Flow cytometry

White blood cell (WBC) differentials were obtained using the Cytodiff™ panel (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) on 50 µL of blood as previously described (32). Analysis of myeloid subpopulations including M-MDSCs and G-MDSCs was performed on whole blood (300 µL /tube) or PBMCs (2×10^5 cells /tube) using multicolor antibody panels (*Table S1*). Samples were run on a Navios flow cytometer and data were analyzed using Kaluza software (Beckman Coulter). Absolute counts were obtained using Flow-count fluorospheres (Beckman Coulter). Blood monocytes and dendritic cells were defined in accordance with nomenclature approved by the International Union of Immunological Societies (33). Differentiation stages of granulocytes were defined as previously described (34). Gating strategy is detailed in *Figure S1*.

Quantitative real-time PCR

Total RNA was extracted using PAXgene blood RNA kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). cDNA was then generated using Multiscribe Reverse Transcriptase and High-Capacity cDNA reverse Transcription kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). For quantitative RT-PCR, we used custom designed Taqman array microfluidic cards and the Taqman Universal Master Mix from Applied Biosystems (Invitrogen). Gene expression was measured by the ABI Prism 7900HT Sequence Detection System. *18S*, *CDKN1B* and *ELF1*, were determined as appropriate internal standards using TaqMan endogenous control assays (Invitrogen) and geNorm algorithm analysis (<https://genorm.cmgg.be>). For each sample, the CT value for the gene of interest was

determined, normalized to the geometric mean value of the 3 housekeeping genes, and compared to the median value obtained from healthy donors using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method.

Cytokines and enzymes activity assessment

Plasma levels of Myeloperoxidase (MPO), neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), S100A8/9, S100A12, and Arginase I (Hycult Biotech, Ude, The Netherlands) were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), according to manufacturer's instructions. Plasma levels of G-CSF, IL-10, and IL-12 were measured using a Milliplex map magnetic bead kit (EMD Millipore, Billerica, MA, USA). IDO and arginase 1 activities were evaluated by measuring kynurenine, tryptophan, ornithine, and arginine levels in plasma samples and cell-culture supernatants with high-performance liquid chromatography (HPLC) (15, 35).

Cell isolation and culture

Fresh PBMCs from septic patients or HDs were magnetically depleted for residual erythrocytes using glycophorin A beads (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany). When indicated, PBMCs were also depleted for CD14^{pos} monocytes or CD15^{pos} LDGs using CD14 or CD15 microbeads (Miltenyi Biotech). Each negative fraction (PBMC, PBMC-CD14^{pos} cells and PBMC-CD15^{pos} cells) was labeled with 0.2 μ M carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE; Interchim,

Montluçon, France), then plated in triplicate in 96-well round-bottom plates with RPMI 1640 medium enriched with 10% human AB serum (Biowest, Courtaboeuf, France) and 1% penicillin-streptomycin (Gibco, Saint Aubin, France). Cells were stimulated with soluble anti-CD3 and anti-CD28 (0.6 µg/mL, Sanquin, Amsterdam, The Netherlands) and cultured at 37°C and 5% CO₂. After 4 days, T cells were labeled with anti-CD2, anti-CD4 and anti-CD8 antibodies (Table S1) and resuspended in DAPI buffer to identify viable cells. CFSE dilution was finally assessed by flow cytometry. Results were analyzed with ModFit LT software (Verity Software House, Topsham, ME, USA) and expressed as the cumulated proportion of proliferated T cells (\geq G2 generation). For cytological analyses, cytopsin slides of magnetically purified CD15^{pos} cells were stained with May-Grünwald-Giemsa and examined by light microscopy.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed with GraphPad Prism 6.0 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Comparisons between groups were performed using Mann-Whitney *U* test, Wilcoxon matched-pairs signed test for matched samples, or Friedman test with Dunn's correction if multiple comparisons were requested. Correlations between 2 continuous variables were investigated using the nonparametric Spearman rank correlation test. Hierarchical clustering was performed using Cluster 3.0, originally written by Michael Eisen (<http://bonsai.hgc.jp/~mdehoon/software/cluster/software.htm>) (36). We performed an unsupervised hierarchical clustering with Spearman's rank distance and average

linkage. Clustering results were displayed using Treeview (<http://jtreeview.sourceforge.net>). A receiver operating characteristic (ROC) plot was performed to determine the best G-MDSC threshold to discriminate between patients with high *versus* low risk of developing nosocomial infections. Kaplan-Meier curves were then created to illustrate the cumulative incidence of nosocomial infections between patients with high *versus* low proportion of G-MDSCs and were compared with the Mantel-Cox log-rank test.

RESULTS

Peripheral blood myeloid cells display a suppressive phenotype in septic patients.

The characteristics of septic patients and HD are summarized in *Table 1* and sepsis etiology is detailed in *Table 2*. As human MDSCs are heterogeneous and poorly defined, we started by performing an extensive cartography of the peripheral blood myeloid compartment in 36 septic patients and 26 HD (Figure 1A). As previously described (15), the CD14^{pos} monocytes count was increased in septic patients compared to HD. Interestingly, this difference was essentially related to the CD14^{pos}CD16^{pos} subtype (65.7 x10⁶/L [Interquartile range (IQR), 35.2-175.4 x10⁶ /L] in septic patients, vs. 28.7 x10⁶/L [IQR, 17.3-38.0 x10⁶/L] in HD, p<.001). Moreover, consistently with previous reports (37), the inflammatory CD14^{dim}CD16^{pos} subset was strongly decreased (9.8 x10⁶/L [IQR, 1.1-27.8 x10⁶ /L] in septic patients vs. 37.5 x10⁶/L [IQR, 20.5-53.3 x10⁶/L] in HD, p<.0001). As expected, HLA-DR expression in septic patients was deeply decreased on the three monocyte subtypes (p<.0001) (Figures S2A & S2B). In agreement, the number of CD14^{pos}HLA-DR^{low/neg} monocytes, previously described as M-MDSCs was markedly increased in septic patients (160.3 x10⁶/L [IQR, 34.3-356.2 x10⁶/L]) compared to HD (4.0 x10⁶/L [IQR, 2.0-17.5 x10⁶/L], p<.0001). Besides an increase in circulating mature and immature granulocytes (p<.0001), we observed in septic patients a high proportion of CD14^{neg}CD15^{pos} LDGs (28,7% of PBMCs [IQR, 18,2-52,9 %] in septic patients, vs. 0,8 % [IQR, 0,31-2,1 %] in HD, p<.0001). Interestingly, the proportion of LDGs, previously described as G-MDSCs (38), correlated with the peripheral blood immature granulocyte count (r=.3264, p<.01) but not with mature granulocyte count. The CD14^{pos}HLA-DR^{low/neg} count and the proportion of LDGs were not statistically different between severe

sepsis and septic shock patients (data not shown). Of note, whereas the proportion of LDGs did not differ according to the gram of the causative microorganism, the number of circulating CD14^{pos}HLA-DR^{low/neg} monocytes was higher in patients with gram-negative sepsis (Figure S2C). Lastly, the three dendritic cell (DC) subtype counts (plasmacytoid dendritic cells, and both subsets of myeloid DC expressing CD1c or CD141) were dramatically decreased in septic patients (Figure S3A).

We next performed a transcriptomic analysis targeting 44 immune-related genes including cell subset specific markers and functional pathways. This approach was conducted on whole blood from 29 septic patients and 15 HD. Unsupervised hierarchical clustering analysis revealed that the level of expression of these immune-related genes allowed to segregate septic patients and HD almost perfectly (Figure 1B). In particular, genes associated with MDSCs recruitment, phenotype, and suppressive functions, including *MMP8*, *MMP9*, *ARG1*, *S100A8*, *S100A9*, *S100A12*, *CD274* (PD-L1), *IL4R*, and *IL10* were significantly upregulated whereas genes associated with adaptive immunity and inflammation, including *CD4*, *MS4A1* (CD20), *CD8B*, *CD3G*, *IL8*, and *IL6* were significantly downregulated in septic patients (Table 3). Noteworthy, even if both molecules were downregulated, we observed a decreased in the *CD247* (CD3ζ)/*CD3G* (CD3γ) ratio in septic patients (Figure S3B). This observation is consistent with the inhibitory effect of MDSCs on T cells, and suggests that lymphocytes that survived sepsis-induced apoptosis may display impaired functions.

To confirm and extend this work, we studied the main features of MDSC activity at the protein level (Figure 1C). In agreement with their increased RNA levels, concentrations of calcium-binding proteins S100A8/A9 and S100A12 involved in MDSCs recruitment (39) were respectively increased by 3- and 9-fold in septic patient peripheral blood compared to HD ($p < .0001$). Plasma levels of G-CSF, which has been reported to take part in the recruitment of G-MDSCs (40) was also increased in septic patients ($p < .01$). The plasma kynurenine / tryptophan ratio reflecting IDO activity was markedly increased in patients with sepsis (0,213 [IQR, 0.0915-0.658], +719%, $p < .0001$) compared with HD (0.026 [IQR, 0.023-0.035]). As previously described, this enhancement occurred at the post-transcriptomic level and was not associated with an increased *IDO1* expression (data not shown) (15). Conversely, *ARG1* expression, was increased and we also observed increased levels of plasma arginase 1 enzyme (38.8 ng/mL [IQR, 16.2-112.6 ng/mL], vs. 18.3 ng/mL [IQR, 9.6-23.4 ng/mL], $p < .01$) associated with a decreased circulating arginine concentration (35.3 μ M [IQR, 23.9-59.7 μ M] vs. 66.5 μ M [IQR, 52.1-95.1 μ M], $p < .0001$) in septic patients compared to HD. Finally, the increased IL10/IL12 ratio at protein and transcriptomic levels was consistent with an overall suppressive environment (Figure S3C).

Altogether, these data indicate a specific expansion of $CD14^{pos}HLA-DR^{low/neg}$ monocytes and LDGs in septic patients, consistent with M-MDSCs and G-MDSCs phenotypes respectively, occurring in a systemic suppressive environment.

CD14^{pos} monocytes and CD15^{pos} LDGs from septic patients display a MDSC activity in vitro.

As MDSC definition in humans lacks phenotypic specificity and relies on their suppressive properties, we next assessed the effect of CD14^{pos} and CD15^{pos} cells on T-cell proliferation induced by polyclonal stimulation. First, the proliferation of both CD4^{pos} and CD8^{pos} T-cells was strongly reduced in septic patients compared to HD (Figure 2A). Depletion of CD14^{pos} cells resulted in a significant increase in the proportion of proliferating CD4^{pos} (+144%, p=.002) and CD8^{pos} T cells (+124%, p=.004) in septic patients, whereas CD14^{pos} cells depletion decreased CD4^{pos} and CD8^{pos} T-cell proliferation in HD (-15%, p=.02, and -17%, p=.008; respectively) (Figures 2B & S4). Similarly, depletion of CD15^{pos} cells in septic patients increased CD4^{pos} and CD8^{pos} T lymphocytes proliferation by +60% (p=.014) and +65% (p=.037) respectively, whereas it had no effect on healthy donors T-cell proliferation, in agreement with the lack of LDGs in normal context. These results indicate that both CD14^{pos} monocytes, essentially made up of HLA-DR^{low/neg} cells, and CD15^{pos} LDGs should be considered as MDSCs in sepsis.

We then assessed if those MDSCs displayed Arginase 1 and IDO activity by measuring arginine, ornithine, and kynurenine concentrations in culture supernatants. PBMCs from septic patients but not those from HD exerted an Arginase 1 activity *in vitro*, as demonstrated by an increased ornithine / arginine ratio (p=.009) (Figure 2C). This activity was completely abrogated after CD15^{pos} LDG depletion but was not affected by CD14^{pos} monocyte depletion (p<.0001). In addition, arginase activity

strongly correlated with the number of LDGs in culture wells ($r=.90$, $p<.001$), further reinforcing the demonstration that LDGs, unlike monocytes, are key arginase 1 producers in septic patients. A mild IDO activity dependent on CD14^{pos} monocytes was detected in HD, as indicated by a low level of kynurenine production after polyclonal stimulation. This activity was enhanced in septic patients ($p=.041$) and relied on a cooperation between CD14^{pos} monocytes and LDGs ($p=.0002$) since abrogation of IDO activity required depletion of both subsets. Altogether, those results highlight the central role of LDGs/G-MDSC in the production of suppressive factors in septic patients.

Low-density granulocytes in septic patients are composed of immature and mature granulocytes expressing high levels of degranulation markers.

In a last step, we sought to determine the origin of LDGs. As granulocytes that co-purify in the PBMC-fraction were called LDGs, we referred to granulocytes which sediment with erythrocytes as high-density granulocytes (HDGs). To determine if LDGs and HDGs could be morphologically and phenotypically distinguished, we compared CD15^{pos} cells from density gradient interface (LDGs) and pellet (HDGs).

Based on their expression of CD16 and CD11b maturation markers, we first noticed that LDGs were significantly enriched for immature granulocytes (Figure 3A). Indeed, LDGs contained a higher proportion of CD15^{pos}CD16^{neg}CD11b^{pos/low} promyelocytes and myelocytes ($4.4\pm 2.3\%$ vs. $0.4\pm 0.2\%$, $p=.004$), a higher proportion

of CD15^{pos}CD16^{low} metamyelocytes (51.5±12.3% vs. 38.9±12.1%, p=.008) and a lower proportion of mature neutrophils (44.0±13.5% vs. 60.7±12.2%, p=.004) compared to HDGs. Morphological analysis confirmed that HDGs could be considered as a homogeneous population of mature neutrophils, whereas LDGs were composed of neutrophils at different stages of maturation, including mature segmented neutrophils as well as more immature banded neutrophils and myelocytes (Figure 3B). Detailed phenotypic characterization of LDGs revealed high expression of CD11b (αM-integrin, expressed by mice MDSCs) and CD64 (FCγRI, high-affinity immunoglobulin-Fc fragment receptor I, indicative of sepsis and cells' activation (41)), and intermediate levels of CD33 and CD115 (colony stimulating factor 1 receptor). We also observed two levels of CD16 expression, consistent with mature and immature stages (Figure S5).

Provided arginase 1 has been described to be stocked inside azurophilic granules of human granulocytes (42), we hypothesized that LDGs might result from neutrophil activation and degranulation. As compared to HDGs, LDGs expressed higher surface levels of CD35 (p<.05), CD63 (p<.01) and CD66b (p<.01) on both mature and immature subsets, indicating degranulation of secretory vesicles, azurophilic, and specific granules, respectively (43) (Figure 3C). Furthermore, LDGs had lower side and forward scatter (SSC and FSC) than HDGs, suggesting that they were smaller and had lower granularity (Figures 3D & S5). Consistently, plasma levels of neutrophil granule proteins MPO and NGAL were significantly increased in septic patients compared to HD (p<.0001) (Figure 3E).

High initial levels of G-MDSC are associated with a higher risk of secondary nosocomial infections

Among patients with severe sepsis or septic shock, 21 (22%) developed one or more nosocomial infection(s) (NI) (7 nosocomial pneumonia, 4 urinary tract infections, 2 central venous catheter-related infections, 2 spontaneous bacteremia, 2 skin and soft tissues infections, 2 peritonitis, 1 colitis, 1 mediastinitis). The first episode occurred 20 days [IQR, 12-28 days] after ICU admission. The initial proportion of LDGs correlated with SOFA score ($r=.28$, $p=.019$) and was significantly higher in patients who further developed NI (45.5 % of PBMCs [IQR, 24.5-69.4 %] compared to patients who did not (26.5 % [IQR, 16.3-45.7 %, $p<.005$) (Figure 4A). Similarly, the initial peripheral immature granulocytes count was 2.5 fold increased ($2.1 \times 10^6/L$ [IQR, $0.6-4.3 \times 10^6/L$] in patients with NI vs. $0.9 \times 10^6/L$ [IQR, $0.3-2.3 \times 10^6/L$] in patients without NI, $p<.05$) whereas the mature granulocytes count was not significantly different. A receiver operating characteristic (ROC) plot determined that LDGs > 36% was the best threshold to identify patients with the highest risk of developing nosocomial infections (area under the curve (AUC) .70 (95% confidence interval .57-.83). The cumulative incidence of nosocomial infections was thus significantly higher in patients with LDGs > 36% (Log rank $p=.023$). Conversely, the peripheral CD14^{pos}HLA-DR^{low/neg} monocytes count was not associated with NI occurrence (Figure 4B).

In line with those results, development of NI was also associated with higher initial plasma concentrations of G-CSF ($p=.013$) and S100A12 ($p=.027$), as well as a five-fold increase of IDO systemic activity ($p=.023$) (Figure 4C). More importantly, early levels of arginase 1, specifically produced by G-MDSCs, correlated with initial SOFA ($r=0.43$, $p=.21$, Spearman) and SAPS II ($r=0.41$, $p=.035$, Spearman) scores, and were significantly higher in patients who developed NI ($p=.043$). Finally, enhanced arginase 1 concentration was also associated with unfavorable outcome with a higher arginase 1 in non-survivors as compared with survivors ($p=.016$).

DISCUSSION

In this study, we demonstrated that CD14^{pos}HLA-DR^{low/neg} monocytes and CD15^{pos} LDGs were both expanded in septic patients, were responsible for IDO and an arginase 1 activity and inhibited T-cell proliferation *in vitro*, making them functional M- and G-MDSCs, respectively. LDG / G-MDSC were composed of immature and mature granulocytes displaying high levels of degranulation markers. More importantly, we demonstrated that the early expansion of G-MDSC predicted the development of nosocomial infections in patients with severe sepsis and septic shock.

"Endotoxin tolerance", defined by the reduced capacity of monocytes to release pro-inflammatory cytokines in response to various bacterial compounds associated with a preserved or enhanced ability to release anti-inflammatory mediators such as IL-10 or IL-1 receptor antagonist (IL-1RA), is one of the most described features of sepsis-induced immunosuppression (44). The decreased expression of antigen presentation molecules HLA-DR has been associated with poor prognosis and increased nosocomial infections and is currently considered an essential surrogate marker of monocyte unresponsiveness (45). This state of "reprogramming" can be related to the acquisition by monocytes of a MDSC phenotype. Indeed, we demonstrated in the present study that CD14^{pos}HLA-DR^{low/neg} monocytes, previously described as M-MDSC in cancer patients, inhibited T cell proliferation and supported IDO activity *in vitro*. We only found a trend toward higher initial number of peripheral M-MDSCs in patients who further developed nosocomial

infections. This result could be explained by the fact that only persisting and not initial low monocyte HLA-DR expression predicts mortality in septic shock (11, 46).

Like monocytes, granulocytes also seem to display an important plasticity during sepsis. The massive recruitment of neutrophils from the bone marrow combined with a delayed apoptosis results in a markedly increased number of circulating neutrophils of various degrees of maturation (47, 48). Neutrophils in septic patients are affected by a severe dysfunction, including an impaired clearance of bacteria, a reduced production of reactive oxygen species (ROS) and a decreased recruitment to infected tissues (49). Patients with the most severe dysfunction have thus been described to be more vulnerable to nosocomial infections (12). Beside those functional impairments, neutrophils may also develop suppressive properties. Two studies recently described a unique population of LDGs that co-purify with PBMCs after density centrifugation in septic patients (23, 26). In agreement with our results, those cells produced arginase 1 and suppressed CD3 ζ chain expression and T-cell proliferation. However, their phenotype was controversial. With a precise analysis by flow cytometry, we demonstrated that this population of LDGs / G-MDSC consisted of both immature and mature cells displaying high levels of degranulation markers.

The immature subset obviously arise from the bone marrow as a result of the emergency myelopoiesis (50). Consistently, we found high levels of G-CSF in the plasma from septic patients. Simultaneously to the reconstitution and expansion of the primary granulocytic compartment, development of G-MDSCs could thus

participate to the regulation of the immune response. Accordingly, a prospective immunomonitoring study revealed that circulating immature granulocytes predicted early sepsis deterioration and could be responsible for immunosuppression through the induction of T-cell lymphopenia (24). Moreover, as described in cancer patients, the high levels of degranulation markers expressed by mature and immature LDGs / G-MDSCs may reflect an alternative activation state resulting in the release of suppressive molecules such as arginase 1 from intracellular granules to the circulation (51). Consistently, whereas arginase 1 is located in the cytosol of murine macrophages and MDSCs, the enzyme localizes to the azurophilic granules of human granulocytes (42).

Whether MDSCs play a protective or a deleterious role remains controversial. In mice studies, in which the timing of infection is controlled, MDSCs appear to play a protective role, probably by preventing mouse from dying of an overwhelming inflammatory response (50, 52-54). However, MDSCs that are activated to resolve inflammation may blunt cellular responses and subsequently enhance susceptibility to secondary infections (55). Accordingly, we demonstrated that high levels of G-MDSC at the early phase of sepsis were associated with the occurrence of hospital-acquired infections. To our knowledge, our study is the first to highlighting the major role of these cells in post-sepsis immune dysfunction. Currently, most deaths occur at the late phase of the disease, in patients who display patent signs of immune suppression directly related to a persistent lymphopenia and T-cell exhaustion (56, 58). We demonstrated that MDSCs specifically inhibited T-cell proliferation in septic patients. Depletion of CD14^{pos} M-MDSCs and CD15^{pos} G-MDSCs could restore T-cell

proliferation capacities, revealing that exhaustion might be more a myeloid-driven process than a T-cell intrinsic dysfunction. As described in ICU non-septic patients, arginase 1 produced by G-MDSCs plays a major role in the plasma arginine depletion and the subsequent poor prognosis (25).

CONCLUSIONS

Altogether, our results show that MDSCs are major actors of the sepsis-induced immune suppression. CD14^{pos}HLA-DR^{low/neg} M-MDSCs and CD15^{pos} G-MDSCs strongly contribute to T cell dysfunction in septic patients and the early expansion of G-MDSCs specifically promotes the development of nosocomial infections. Besides IDO, arginase 1 emerges as an important mediator of sepsis-related immune dysfunction.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by research grants from the French Intensive Care Society (SRLF) and the National Institute of Cancer (INCa Recherche Translationnelle 2010). We are thankful for the clinicians of the Polyvalent ICU of Saint Briec, of the Surgical and ICU of Rennes and for the French Blood Bank (EFS) of Rennes for providing samples. The authors acknowledge the Centre de Ressources Biologiques (CRB-santé) of Rennes (BB-0033-00056, <http://www.crbsante-rennes.com>) for managing samples.

AUTHORS' CONTRIBUTION

FU: raised funds, designed and performed experiments, provided samples, analyzed data and wrote the paper; IA: designed and performed experiments and analyzed data; MG and LC: performed experiments; CP and JD: Analyzed data; JMT, AG and CC: provided samples and analyzed data; TF: raised funds, designed and supervised research; YLT: provided samples and supervised research; MR: designed and supervised research, analyzed data; KT: raised funds, designed and supervised research, analyzed data and contributed to writing. All authors revised the manuscript.

CONFLICT-OF-INTEREST DISCLOSURE

The authors declare no competing financial interest

REFERENCES

1. Kaukonen K-M, Bailey M, Suzuki S, Pilcher D, Bellomo R. Mortality Related to Severe Sepsis and Septic Shock Among Critically Ill Patients in Australia and New Zealand, 2000-2012. *JAMA* 2014;311:1308.
2. 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;348:1546–1554.
3. Storgaard M, Hallas J, Gahrn-Hansen B, Pedersen SS, Pedersen C, Lassen AT. Short- and long-term mortality in patients with community-acquired severe sepsis and septic shock. *Scand J Infect Dis* 2013;45:577–583.
4. Otto GP, Sossdorf M, Claus RA, Rödel J, Menge K, Reinhart K, Bauer M, Riedemann NC. The late phase of sepsis is characterized by an increased microbiological burden and death rate. *Crit Care* 2011;15:R183.
5. Luyt C-E, Combes A, Deback C, Aubriot-Lorton M-H, Nieszkowska A, Trouillet J-L, Capron F, Agut H, Gibert C, Chastre J. Herpes Simplex Virus Lung Infection in Patients Undergoing Prolonged Mechanical Ventilation. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175:935–942.
6. Müller von L, Klemm A, Durmus N, Weiss M, Suger Wiedeck H, Schneider M, Hampl W, Mertens T. Cellular Immunity and Active Human Cytomegalovirus Infection in Patients with Septic Shock. *J Infect Dis* 2007;196:1288–1295.
7. Yende S, D'Angelo G, Kellum JA, Weissfeld L, Fine J, Welch RD, Kong L, Carter M, Angus DC. Inflammatory Markers at Hospital Discharge Predict Subsequent Mortality after Pneumonia and Sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177:1242–1247.
8. Chang DW, Tseng C-H, Shapiro MF. Rehospitalizations Following Sepsis: Common and Costly. *Crit Care Med* 2015;43:2085–2093.
9. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2013;13:862–874.
10. Rigato O, Salomao R. Impaired production of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha but not of interleukin 10 in whole blood of patients with sepsis. *Shock* 2003;19:113–116.
11. Le Tulzo Y, Pangault C, Amiot L, Guilloux V, Tribut O, Arvieux C, Camus C, Fauchet R, Thomas R, Drénou B. Monocyte Human Leukocyte Antigen-DR Transcriptional Downregulation by Cortisol during Septic Shock. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;169:1144–1151.
12. Stephan F, Yang K, Tankovic J, Soussy C-J, Dhonneur G, Duvaldestin P, Brochard L, Brun-Buisson C, Harf A, Delclaux C. Impairment of polymorphonuclear neutrophil functions precedes nosocomial infections in critically ill patients. *Crit Care Med* 2002;30:315–322.
13. Le Tulzo Y, Pangault C, Gacouin A, Guilloux V, Tribut O, Amiot L, Tattevin P, Thomas R, Fauchet R, Drénou B. Early circulating lymphocyte apoptosis in human septic shock is associated with poor outcome. *Shock* 2002;18:487–494.

14. Venet F, Chung C-S, Kherouf H, Geeraert A, Malcus C, Poitevin F, Bohé J, Lepape A, Ayala A, Monneret G. Increased circulating regulatory T cells (CD4(+)CD25 (+)CD127 (-)) contribute to lymphocyte anergy in septic shock patients. *Intensive Care Med* 2009;35:678–686.
15. Tattevin P, Monnier D, Tribut O, Dulong J, Bescher N, Mourcin F, Uhel F, Le Tulzo Y, Tarte K. Enhanced indoleamine 2,3-dioxygenase activity in patients with severe sepsis and septic shock. *J Infect Dis* 2010;201:956–966.
16. Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 2009;9:162–174.
17. Solito S, Marigo I, Pinton L, Damuzzo V, Mandruzzato S, Bronte V. Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity in human cancers. In: Rose NR, editor. *Ann N Y Acad Sci* 2014;1319:47–65.
18. Rodríguez PC, Hernandez CP, Quiceno D, Dubinett SM, Zabaleta J, Ochoa JB, Gilbert J, Ochoa AC. Arginase I in myeloid suppressor cells is induced by COX-2 in lung carcinoma. *J Exp Med* 2005;202:931–939.
19. Mougiakakos D, Jitschin R, Bahr von L, Poschke I, Gary R, Sundberg B, Gerbitz A, Ljungman P, Le Blanc K. Immunosuppressive CD14+HLA-DRlow/neg IDO+ myeloid cells in patients following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia* 2013;27:377–388.
20. Schmielau J, Finn OJ. Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of t-cell function in advanced cancer patients. *Cancer Research* 2001;61:4756–4760.
21. Huang B. Gr-1+CD115+ Immature Myeloid Suppressor Cells Mediate the Development of Tumor-Induced T Regulatory Cells and T-Cell Anergy in Tumor-Bearing Host. *Cancer Research* 2006;66:1123–1131.
22. Damuzzo V, Pinton L, Desantis G, Solito S, Marigo I, Bronte V, Mandruzzato S. Complexity and challenges in defining myeloid-derived suppressor cells. *Cytometry* 2014;88:77–91.
23. Janols H, Bergenfelz C, Allaoui R, Larsson AM, Ryden L, Bjornsson S, Janciauskiene S, Wullt M, Bredberg A, Leandersson K. A high frequency of MDSCs in sepsis patients, with the granulocytic subtype dominating in gram-positive cases. *J Leukoc Biol* 2014;doi:10.1189/jlb.5HI0214-074R.
24. 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, Francois B. Circulating Immature Granulocytes With T-Cell Killing Functions Predict Sepsis Deterioration*. *Crit Care Med* 2014;42:2007–2018.
25. Gey A, Tadie J-M, Caumont-Prim A, Hauw-Berlemont C, Cynober L, Fagon J-Y, Terme M, Diehl J-L, Delclaux C, Tartour E. Granulocytic myeloid-derived suppressor cells inversely correlate with plasma arginine and overall survival in critically ill patients. *Clin Exp Immunol* 2015;180:280–288.

26. Darcy CJ, Minigo G, Piera KA, Davis JS, McNeil YR, Chen Y, Volkheimer AD, Weinberg JB, Anstey NM, Woodberry T. Neutrophils with myeloid derived suppressor function deplete arginine and constrain T cell function in septic shock patients. *Crit Care* 2014;18:R163.
27. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent J-L, Ramsay G. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* 2003;31:1250–1256.
28. Le Gall JR, Lemeshow S, Saulnier F. A new Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study. *JAMA* 1993;270:2957–2963.
29. Le Gall JR, Klar J, Lemeshow S, Saulnier F, Alberti C, Artigas A, Teres D. The Logistic Organ Dysfunction system. A new way to assess organ dysfunction in the intensive care unit. ICU Scoring Group. *JAMA* 1996;276:802–810.
30. Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonça A, Bruining H, Reinhart CK, Suter PM, Thijs LG. 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. pp. 707–710.
31. Gaudriot B, Uhel F, Gregoire M, Gacouin A, Biedermann S, Roisne A, Flécher E, Le Tulzo Y, Tarte K, Tadie J-M. Immune Dysfunction After Cardiac Surgery with Cardiopulmonary Bypass. *Shock* 2015;44:228–233.
32. Roussel M, Benard C, Ly-Sunnaram B, Fest T. Refining the white blood cell differential: The first flow cytometry routine application. *Cytometry* 2010;77A:552–563.
33. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, Leenen PJM, Liu YJ, MacPherson G, Randolph GJ, Scherberich J, Schmitz J, Shortman K, Sozzani S, Strobl H, Zembala M, Austyn JM, Lutz MB. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 2010;116:e74–e80.
34. van Lochem EG, van der Velden VHJ, Wind HK, Marvelde te JG, Westerdal NAC, van Dongen JJM. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: Reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. *Cytometry* 2004;60B:1–13.
35. Loï C, Zazzo J-F, Delpierre E, Niddam C, Neveux N, Curis E, Arnaud-Battandier F, Cynober L. Increasing plasma glutamine in postoperative patients fed an arginine-rich immune-enhancing diet—A pharmacokinetic randomized controlled study*. *Crit Care Med* 2009;37:501–509.
36. Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:14863–14868.
37. Poehlmann H, Schefold JC, Zuckermann-Becker H, Volk H-D, Meisel C. Phenotype changes and impaired function of dendritic cell subsets in patients with sepsis: a prospective observational analysis. *Crit Care* 2009;13:R119.

38. Brandau S, Moses K, Lang S. The kinship of neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells in cancer: cousins, siblings or twins? *Seminars in Cancer Biology* 2013;23:171–182.
39. Sinha P, Okoro C, Foell D, Freeze HH, Ostrand-Rosenberg S, Srikrishna G. Proinflammatory S100 Proteins Regulate the Accumulation of Myeloid-Derived Suppressor Cells. *J Immunol* 2008;181:4666–4675.
40. Waight JD, Hu Q, Miller A, Liu S, Abrams SI. Tumor-Derived G-CSF Facilitates Neoplastic Growth through a Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cell-Dependent Mechanism. In: Blagosklonny MV, editor. *PLoS ONE* 2011;6:e27690–15.
41. Gibot S, Béné MC, Noel R, Massin F, Guy J, Cravoisy A, Barraud D, De Carvalho Bittencourt M, Quenot J-P, Bollaert P-E, Faure G, Charles P-E. Combination Biomarkers to Diagnose Sepsis in the Critically Ill Patient. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;186:65–71.
42. Munder M. Arginase I is constitutively expressed in human granulocytes and participates in fungicidal activity. *Blood* 2005;105:2549–2556.
43. Faurschou M, Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes and Infection* 2003;5:1317–1327.
44. Cavaillon J-M, Adib-Conquy M. Bench-to-bedside review: endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. *Crit Care* 2006;10:233.
45. Monneret G, Finck M-E, Venet F, Debard A-L, Bohé J, Bienvenu J, Lepape A. The anti-inflammatory response dominates after septic shock: association of low monocyte HLA-DR expression and high interleukin-10 concentration. *Immunology Letters* 2004;95:193–198.
46. Monneret G, Lepape A, Voirin N, Bohé J, Venet F, Debard A-L, Thizy H, Bienvenu 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.
47. Taneja R, Parodo J, Jia SH, Kapus A, Rotstein OD, Marshall JC. Delayed neutrophil apoptosis in sepsis is associated with maintenance of mitochondrial transmembrane potential and reduced caspase-9 activity*. *Crit Care Med* 2004;32:1460–1469.
48. Drifte G, Dunn-Siegrist I, Tissières P, Pugin J. Innate Immune Functions of Immature Neutrophils in Patients With Sepsis and Severe Systemic Inflammatory Response Syndrome*. *Crit Care Med* 2013;41:820–832.
49. Kovach MA, Standiford TJ. The function of neutrophils in sepsis. *Current Opinion in Infectious Diseases* 2012;25:321–327.
50. Cuenca AG, Delano MJ, Kelly-Scumpia KM, Moreno C, Scumpia PO, Laface DM, Heyworth PG, Efron PA, Moldawer LL. A paradoxical role for myeloid-derived suppressor cells in sepsis and trauma. *Mol Med* 2011;17:281–292.

51. Rodriguez PC, Ernstoff MS, Hernandez C, Atkins M, Zabaleta J, Sierra R, Ochoa AC. Arginase I-Producing Myeloid-Derived Suppressor Cells in Renal Cell Carcinoma Are a Subpopulation of Activated Granulocytes. *Cancer Research* 2009;69:1553–1560.
52. Delano MJ, Scumpia PO, Weinstein JS, Coco D, Nagaraj S, Kelly-Scumpia KM, O'Malley KA, Wynn JL, Antonenko S, Al-Quran SZ, Swan R, Chung CS, Atkinson MA, Ramphal R, Gabrilovich DI, Reeves WH, Ayala A, Phillips J, LaFace D, Heyworth PG, Clare-Salzler M, Moldawer LL. MyD88-dependent expansion of an immature GR-1+CD11b+ population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis. *J Exp Med* 2007;204:1463–1474.
53. Sander LE, Sackett SD, Dierssen U, Beraza N, Linke RP, Muller M, Blander JM, Tacke F, Trautwein C. Hepatic acute-phase proteins control innate immune responses during infection by promoting myeloid-derived suppressor cell function. *J Exp Med* 2010;207:1453–1464.
54. Derive M, Bouazza Y, Alauzet C, Gibot S. Myeloid-derived suppressor cells control microbial sepsis. *Intensive Care Med* 2012;38:1040–1049.
55. Fullerton JN, O'Brien AJ, Gilroy DW. Pathways mediating resolution of inflammation: when enough is too much. *J Pathol* 2013;231:8–20.
56. Torgersen C, Moser P, Luckner G, Mayr V, Jochberger S, Hasibeder WR, Dünser MW. Macroscopic Postmortem Findings in 235 Surgical Intensive Care Patients with Sepsis. *Anesth Analg* 2009;108:1841–1847.
57. Boomer JS, To K, Chang KC, Takasu O, Osborne DF, Walton AH, Bricker TL, Jarman SD, Kreisel D, Krupnick AS, Srivastava A, Swanson PE, Green JM, Hotchkiss RS. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA* 2011;306:2594–2605.
58. Drewry AM, Samra N, Skrupky LP, Fuller BM, Compton SM, Hotchkiss RS. Persistent Lymphopenia After Diagnosis of Sepsis Predicts Mortality. *Shock* 2014;42:383–391.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Peripheral blood myeloid cells display a suppressive phenotype in septic patients.

(A) Myeloid cells subsets in septic patients (sepsis) and healthy donors (HD). Whole blood monocyte subsets count was determined by flow cytometry in 36 septic patients and 26 HD. Mature and immature granulocytic subsets count was determined on a white blood cells differential by flow cytometry in 88 septic patients and 44 HD. The proportion of low-density granulocytes (LDGs) among PBMCs is shown for 88 septic patients and 16 HD. Box = interquartile range and median, whiskers = range, points = outlying values; comparisons between groups were performed using Mann-Whitney *U* test. Spearman's rank correlation coefficients (*r*) and *p* values are indicated for each correlation. * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$, **** $p < .0001$.

(B) Hierarchical clustering of genes involved in MDSCs pathophysiology, in septic patients and HD. The level of expression of each gene was determined by qRT-PCR (TLDA) in 15 HD and 29 septic patients, and analyzed by unsupervised hierarchical clustering with Spearman's rank distance and average linkage. Color intensity is related to the expression fold change; red = increased expression, green = decreased expression, black = no significant variation.

(C) Inducers and mediators of MDSCs activity in septic (Se) patients and HD. Plasma levels of S100A8/A9, S100A12 proteins and arginase 1 enzyme were determined by ELISA in 16 HD and 73 septic patients. Plasma levels of G-CSF were determined by ELISA in 10 HD and 25 septic patients. Plasma concentrations of Arginine (19 HD,

73 sepsis) and kynurénine / tryptophan (19 HD, 21 sepsis) were measured by high-performance liquid chromatography in plasma samples. Horizontal lines represent medians. Mann-Whitney *U* test; * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$, **** $p < .0001$.

Figure 2: CD14^{pos} monocytes and CD15^{pos} low-density granulocytes display a myeloid-derived suppressor cell activity in septic patients.

(A) T cell proliferation is deeply impaired in septic patients. Fresh PBMCs obtained from septic patients or healthy donors were stimulated with anti-CD3/anti-CD28 antibodies after CFSE labeling. The proportion of CD4^{pos} and CD8^{pos} proliferated T cells (\geq G2 generation) was determined at day 4 by flow cytometry. Box = interquartile range and median, whiskers = range, points = outlying values; comparisons between groups were performed using Mann-Whitney *U* test. ** $p < .01$, **** $p < .0001$.

(B) CD14^{pos} monocytes and CD15^{pos} low-density granulocytes (LDGs) suppress in vitro T cell proliferation in septic patients. Fresh PBMCs obtained from septic patients or healthy donors were magnetically depleted of CD14^{pos} monocytes (PBMC–CD14^{pos} cells), of CD15^{pos} LDGs (PBMC–CD15^{pos} cells), or not depleted (PBMC), and stimulated with anti-CD3/anti-CD28 antibodies after CFSE labeling. The proportion of CD4^{pos} and CD8^{pos} proliferated T cells (\geq G2 generation) was determined at day 4 by flow cytometry. Dashed lined represent the median of healthy donors values (n=8), black points represent septic patients. Proliferation values with or without depletion were compared using the Wilcoxon matched-pairs signed rank test. * $p < .05$, ** $p < .01$.

(C) CD14^{pos} monocytes and LDGs are responsible for IDO and arginase activities in vitro. The concentrations of arginine, ornithine and kynurenine were determined by high-performance liquid chromatography in the supernatants of PBMCs depleted or not of CD14^{pos} monocytes and/or CD15^{pos} LDGs. Friedman with Dunn's multiple comparisons test between depleted and not-depleted PBMCs; * p<.05, ** p<.01, *** p<.001. Spearman's rank correlation coefficients (r) and p values are indicated for correlation.

Figure 3: Characteristics of low-density granulocytes in septic patients.

(A) Low-density granulocytes (LDGs) are enriched for immature cells compared to high-density granulocytes (HDGs). The proportion of mature CD11b^{pos}CD16^{high} polymorphonuclear cells (PMN), immature CD11b^{pos}CD16^{low} metamyelocytes (MM), CD11b^{pos}CD16^{neg} myelocytes (M) and CD11b^{neg}CD16^{neg} promyelocytes (PM) in the LDGs versus HDGs fractions in septic patients were determined by flow cytometry after Ficoll density centrifugation. Error bars represent \pm SEM. **p <.01. The proportions of each granulocyte subset between LDGs and HDGs were compared with Wilcoxon matched-pairs signed rank test; ** p<.01.

(B) HDGs are a homogeneous population of mature neutrophils, whereas LDGs are composed of neutrophils at different stages of maturation, including mature segmented neutrophils as well as more immature banded neutrophils and myelocytes. May-Grünwald-Giemsa-stained cytopsin slides of purified CD15^{pos} cells from density gradient interface (LDGs) and pellet (HDGs).

(C, D) LDGs express high levels of degranulation markers. Mean fluorescence intensity (MFI) of degranulation surface markers (CD35, CD63, CD66b), size (forward scatter, FS) and granularity (SS, side scatter) were compared by flow cytometry between LDGs and HDGs purified from 9 septic patients. Wilcoxon matched-pairs signed rank test; * $p < .05$, ** $p < .01$.

(E) Plasma levels of neutrophil granule proteins are increased in septic patients. Plasma levels of myeloperoxidase (MPO) and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) were determined by ELISA in 16 HD and 74 septic patients. Horizontal lines represent medians. Mann-Whitney U test; **** $p < .0001$.

Figure 4: High initial levels of granulocytic myeloid-derived suppressor cells predict occurrence of nosocomial infections.

(A) High initial proportion of low-density granulocytes (LDGs) and elevated immature neutrophil count predict the development of nosocomial infections. The mature and immature granulocytic subsets count on a white blood cells differential and the proportion of low-density granulocytes (LDGs) among PBMCs were determined by flow cytometry in 88 septic patients, of which 21 (22%) developed nosocomial infection(s) (NI). The Kaplan-Meier curve represents the cumulative incidence of nosocomial infections according to G-MDSCs proportion. Grey line, MDSC $< 36\%$ among PBMCs; Dark line, G-MDSCs $> 36\%$ among PBMCs.

(B) Whole blood $CD14^{pos}HLA-DR^{low/neg}$ (M-MDSCs) count was determined by flow cytometry in 36 patients. Among them, 9 (25%) developed nosocomial infection(s).

(C) Plasma levels of S100A12 protein were determined by ELISA in 73 patients, 18 (24,7%) of which developed nosocomial infection(s). Plasma levels of G-CSF and arginase 1 enzyme were respectively determined by multiplex Luminex assay and ELISA, and concentrations of kynurenine and tryptophan were measured by high-performance liquid chromatography in 26 patients. Among them, 6 (23,1%) developed nosocomial infection(s), 21 survived (S) and 5 (19,2%) died (NS). Box = interquartile range and median, whiskers = range, points = outlying values; comparisons between groups were performed using Mann-Whitney *U* test. The Mantel-Cox log-rank test was used to compare the Kaplan-Meier curves. * $p < .05$; ** $p < .01$; ns, non-significant.

TABLES

Table 1. Characteristics of patients with sepsis and healthy donors.

Characteristics	Patients		
	Septic shock (n = 72)	Severe sepsis (n = 22)	Healthy donors (n = 67)
Male sex, n (%)	42 (58%)	14 (64%)	41 (61%)
Age, years	63 [53-73]	57 [41-75]	56 [49-60]
ICU length of stay, days	10 [4-18]	4 [2-7]	NA
Hospital length of stay, days	26 [13-47]	19 [7-23]	NA
Total duration of MV, days	6 [1-15]	0 [0-4]	NA
Died / Survived	18/54	1/21	NA
SAPS II	51 [38-63]	30 [22-40]	NA
SOFA	10 [8-13]	4 [2-6]	NA
Organ dysfunctions	3 [2-4]	1 [0-2]	NA
LOD score	6 [3-9]	3 [0-4]	NA

Data are expressed as median [interquartile range] unless otherwise indicated. ICU, intensive care unit; LOD, Logistic Organ Dysfunction; MV, Mechanical ventilation; NA, Not applicable; SAPS, Simplified Acute Physiology Score; SOFA, Sepsis-related Organ Failure Assessment.

Table 2. Sites of infection and microorganisms isolated in septic patients.

Characteristics	Septic shock (n = 72)	Severe sepsis (n = 22)
Infection site, no. of patients		
Respiratory tract	23	8
Intra-abdominal/pelvis	11	1
Urinary tract	8	5
Vascular	7	2
Central nervous system	3	3
Other sources	19	3
Unknown	1	0
Bacteremia	39	11
Isolates, no. of patients		
Gram positive	37	9
Gram negative	18	9
Miscellaneous	5	0
Candida	1	0
Unknown	11	4

Table 3. Differentially expressed genes between septic patients and healthy donors.

	Gene Name	Fold change	p
UPREGULATED	MMP8	25.76	<.0001
	ARG1	22.48	< .0001
	S100A12	21.40	< .0001
	SLPI	9.80	< .0001
	S100A9	8.49	< .0001
	MMP9	7.02	< .0001
	IL10	6.85	< .0001
	ELANE	6.36	.0002
	TNFAIP6	5.52	< .0001
	AIM2	5.21	< .0001
	CD274	4.55	.0003
	S100A8	3.14	.0038
	FKBP5	2.96	< .0001
	IL4R	2.27	< .0001
	PGF	2.09	.0038
	MYD88	2.07	< .0001
	ADAM17	1.95	< .0001
	FUT4	1.41	.0013
	CASP1	1.36	.0041
DOWNREGULATED	CCL2	0.09	< .0001
	CD247	0.16	< .0001
	IL4	0.22	< .0001
	NCR1	0.23	.0001
	CD4	0.24	< .0001
	MS4A1	0.24	.0001
	FLT3LG	0.25	< .0001
	CD8B	0.27	< .0001
	CD3G	0.27	< .0001
	IL8	0.32	.0001
	CSF1R	0.34	.0005
	IL6	0.42	.0023
	NLRP1	0.47	< .0001
	NOS2	0.49	.0142
	KITLG	0.51	.0023
	IL12A	0.72	.0108

Fold changes represent medians of the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ values. Two-tailed Mann-Whitney U-test.

SUPPLEMENTAL TABLE

Table S1. Antibodies used for flow cytometry

Cell sample	Panel	Reactivity	Conjugate	Supplier
Whole blood	WBC differential	CytoDiff Panel		Beckman Coulter
	DC	Lin 1	FITC	BD Biosciences
		CD141	PE	Miltenyi Biotech
		HLA-DR	ECD	Beckman Coulter
		CD123	PerCP-Cy5.5	BD Biosciences
		CD11b	PC7	Beckman Coulter
		CD1c	APC	Miltenyi Biotech
		CD11c	Alexa 700	BD Biosciences
		CD33	APC-Alexa 750	Beckman Coulter
		CD34	VioBlue	Miltenyi Biotech
		CD45	Krome Orange	Beckman Coulter
	Mono / M-MDSC	HLA-DR	PE-CF594	BD Biosciences
		CD115	PerCP 5.5	BD Biosciences
		CD14	PC7	Beckman Coulter
		CD16	APC-Alexa 700	Beckman Coulter
		CD3	V450	BD Biosciences
		CD335	BV421	BioLegend
	mHLA-DR	HLA-DR	FITC	Beckman Coulter
		IgG1	FITC	Beckman Coulter
		CD14	PC7	Beckman Coulter
	PBMC	PBMC / G-MDSC	CD14	PE
HLA-DR			PE-CF594	BD Biosciences
CD3			PC7	Beckman Coulter
CD16			APC-Alexa 700	Beckman Coulter
CD15			Pacific Blue	Beckman Coulter
CD45			Krome Orange	Beckman Coulter

	G-MDSC Phenotype	CD66b	FITC	Beckman Coulter
		CD35	PE	BD Biosciences
		CD11b	PerCP 5.5	BD Biosciences
		CD63	PC7	BD Biosciences
		CD16	APC-Alexa 700	Beckman Coulter
		CD15	Pacific Blue	Beckman Coulter
		CD45	Krome Orange	Beckman Coulter
	T-cell Proliferation	CD2	PC7	Beckman Coulter
		CD4	Alexa 700	BD Biosciences
		CD8	APC	Beckman Coulter

SUPPLEMENTAL FIGURES LEGENDS

Figure S1. Gating strategy for myeloid cells subpopulations, monocytic- and granulocytic-Myeloid-derived suppressor cells.

(A) Definition of dendritic cells subsets. Peripheral blood from healthy donors or septic patients was stained for Lin 1 (lineage 1, CD3/CD14/CD19/CD20/CD56), CD141, HLA-DR, CD123, CD11b, CD1c, CD11c, CD33, CD34 and CD45. Plasmacytoid (pDC), CD1c^{pos} and CD141^{pos} myeloid dendritic cells (mDC) were gated as depicted.

(B) Definition of monocyte subsets. Peripheral blood from healthy donors or septic patients was stained for HLA-DR, CD115, CD14, CD16, CD3, CD335 and CD45. After exclusion of CD14^{neg}HLA-DR^{neg} granulocytes (1) and CD3^{pos}/CD335^{pos} lymphocytes and NK cells, the three main monocyte subsets were gated as depicted. For the gating of CD14^{pos}HLA-DR^{low/neg}/monocytic myeloid derived suppressor cells (M-MDSCs), HLA-DR threshold was defined in a cohort of healthy donors.

(C) Definition of low-density granulocytes (LDGs)/granulocytic (G)-MDSCs. Freshly isolated PBMCs were stained for CD14, HLA-DR, CD3, CD16, CD15 and CD45. CD3^{pos} T cells were colored in blue. CD14^{pos} monocytes were colored in orange. Finally, CD14^{neg}CD15^{pos} LDGs/G-MDSCs were colored in green.

(D) Definition of granulocyte subsets. After Ficoll density centrifugation, the PBMC fraction including LDGs and the pellet including high-density granulocytes (HDGs) were stained for CD66b, CD35, CD11b, CD63, CD16, CD15 and CD45. After exclusion of monocytes and eosinophils, CD15^{pos} granulocytes were divided into CD11b^{neg}CD16^{neg} promyelocytes (PM), CD11b^{pos}CD16^{neg} myelocytes (M), CD11b^{pos}CD16^{low} metamyelocytes (MM) and CD11b^{pos}CD16^{pos} matures polymorphonuclear cells (PMN) (2).

The gating strategies are shown for representative samples.

Figure S2. Monocyte HLA-DR expression

(A) HLA-DR expression on CD14^{pos} monocytes. Mean fluorescence intensities obtained with anti-HLA-DR antibody (dark) vs. isotypic control (white) after gating on peripheral CD14^{pos} monocytes. Histograms showing representative healthy donor (HD) and septic patient (Sepsis).

(B) HLA-DR expressed as the ratio of mean fluorescence intensity (rMFI) obtained with anti-HLA-DR antibodies vs. isotypic control after gating on the three monocytic subsets in 21 HD (white boxes) and 28 septic patients (grey boxes).

(C) Peripheral CD14^{pos}HLA-DR^{low/neg} cells count and proportion of CD15^{pos} low density granulocytes (LDGs) among PBMCs according to Gram stain. Box = interquartile range and median, whiskers = range, points = outlying values; comparisons between groups were performed using Mann-Whitney *U* test. *** p<.001.

Figure S3. Dendritic cells and lymphocyte subpopulations in septic patients

(A) Comparison of circulating dendritic cells subsets between septic patient (n=33) and healthy donors (HD, n=26), as determined by flow cytometry. (B) Lymphocyte subsets count was determined on a white blood cells differential by flow cytometry in 88 septic patients and 44 HD. The ratio of *CD247* (CD3ζ) to *CD3G* (CD3γ) expression was determined on whole blood mRNA by qRT-PCR (TLDA) in 15 HD and 29 septic patients. (C) Plasma levels of IL10 and IL12 were determined using a multiplex Luminex assay in 10 HD and 23 septic patients. The ratio of *IL10* to *IL12* expression was determined on whole blood mRNA by qRT-PCR (TLDA) in 15 HD and 29 septic patients. Box = interquartile range and median, whiskers = range, points = outlying values; comparisons between groups were performed using Mann-Whitney *U* test. ** p<0.01, **** p<0.0001. Ly, lymphocytes; mDC, myeloid dendritic cells; pDC, plasmacytoid dendritic cells.

Figure S4. CD14^{pos} monocytes and low-density granulocytes suppress *in vitro* T cell proliferation in septic patients.

Fresh PBMC obtained from septic patients were magnetically depleted of CD14^{pos} monocytes (PBMC–Mono), of CD15^{pos} low-density granulocytes (PBMC–LDGs), or not depleted (PBMC), and stimulated with anti-CD3/anti-CD28 antibodies after CFSE labeling. CD4^{pos} and CD8^{pos} T cell proliferation was determined at day 4 by flow cytometry. Representative histograms of 8 independent experiments.

Figure S5. Low-density granulocytes have decreased FSC and SSC

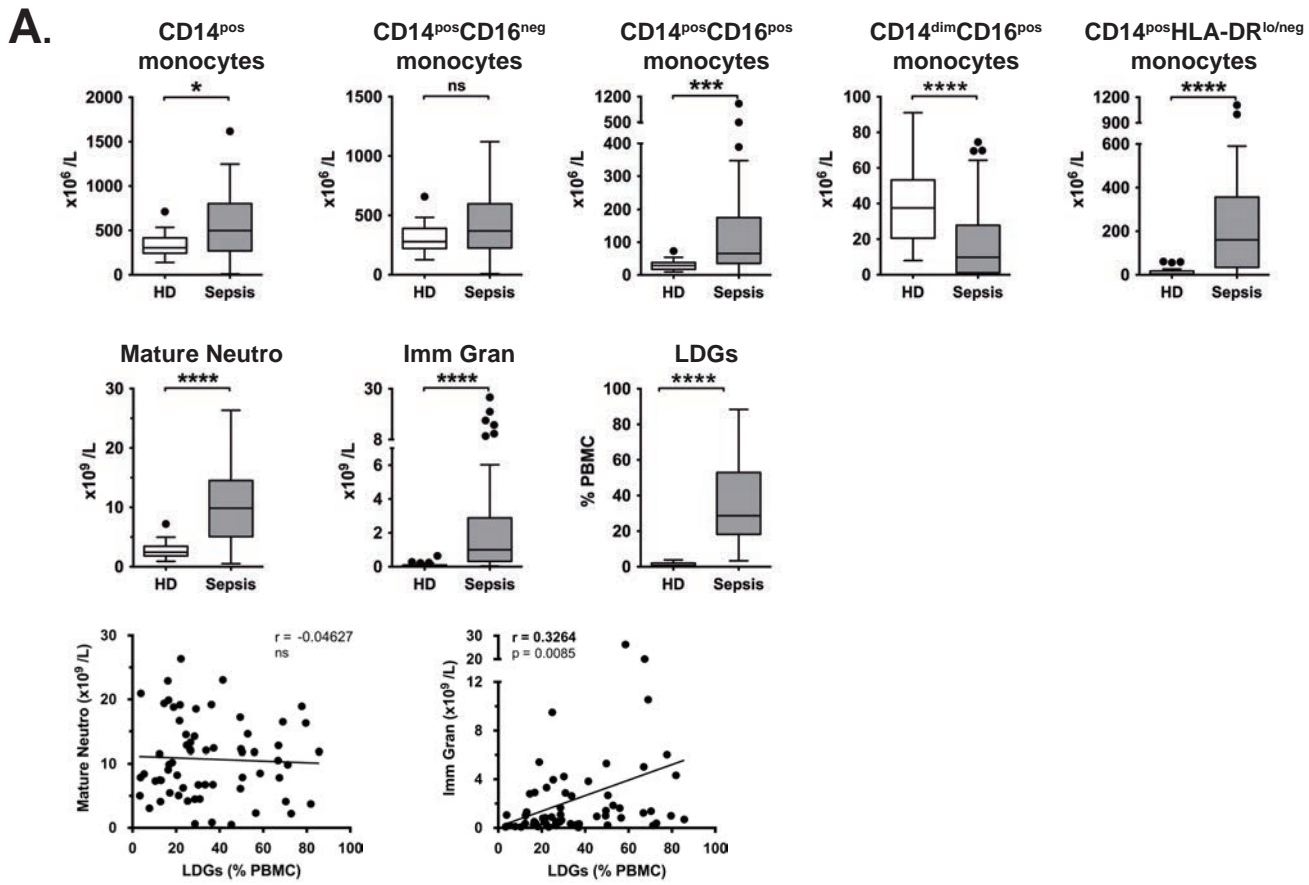
(A) Low-density granulocytes (LDGs) have decreased side and forward scatters (SSC and FSC) than high density granulocytes (HDGs). SSC/FSC plots showing structure and size of low-density granulocytes (LDGs) compared to high-density granulocytes (HDGs) in a representative septic patient. HDGs and LDGs were gated on the basis of their CD15 expression within density-segregated interface and pellet cells, respectively.

(B) FSC and SSC histograms comparing LDGs and HDGs in a representative septic patient.

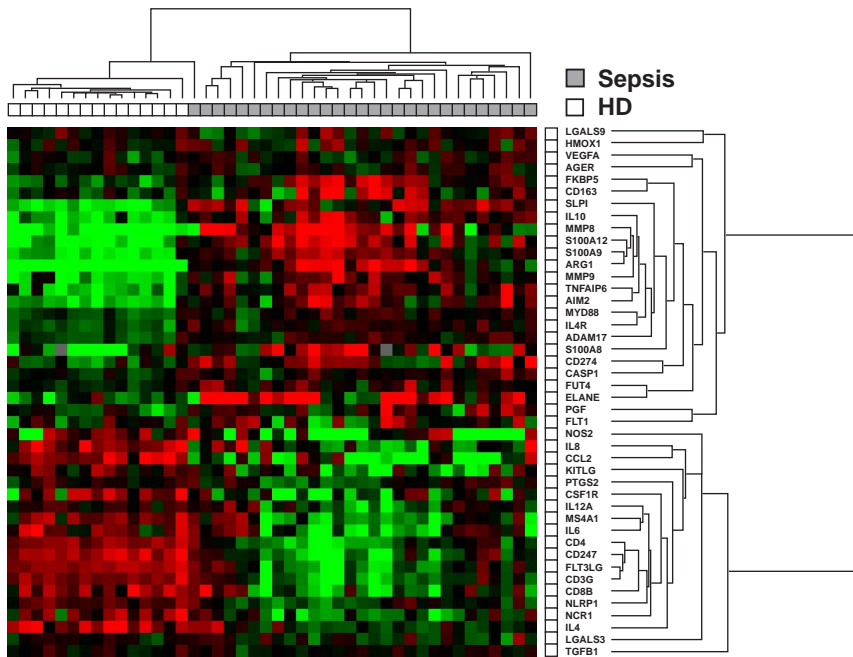
(C) Expression of myeloid markers by LDGs. The level of expression of myeloid markers on LDGs (dark histograms) or negatively stained cells (white histograms) was determined by flow cytometry.

SUPPLEMENTAL REFERENCES

1. Abeles RD, McPhail MJ, Sowter D, Antoniadou CG, Vergis N, Vijay GKM, Xystrakis E, Khamri W, Shawcross DL, Ma Y, Wendon JA, Vergani D. CD14, CD16 and HLA-DR reliably identifies human monocytes and their subsets in the context of pathologically reduced HLA-DR expression by CD14^{hi}/CD16^{neg} monocytes: Expansion of CD14^{hi}/CD16^{pos} and contraction of CD14^{lo}/CD16^{pos} monocytes in acute liver fail. *Cytometry* 2012;81A:823–834.
2. van Lochem EG, van der Velden VHJ, Wind HK, Marvelde te JG, Westerdal NAC, van Dongen JJM. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: Reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. *Cytometry* 2004;60B:1–13.



B.



C.

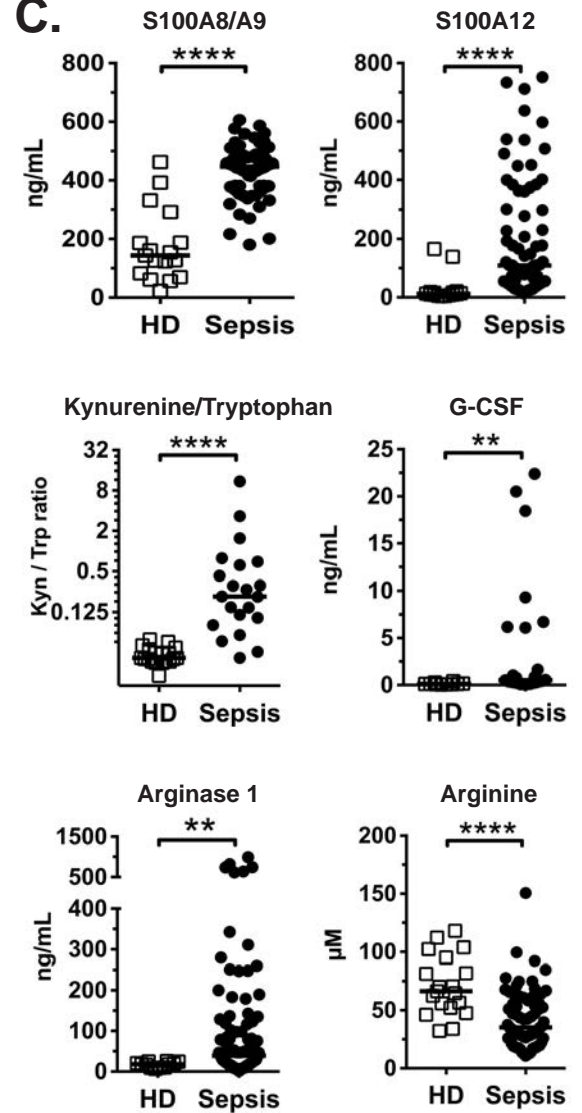
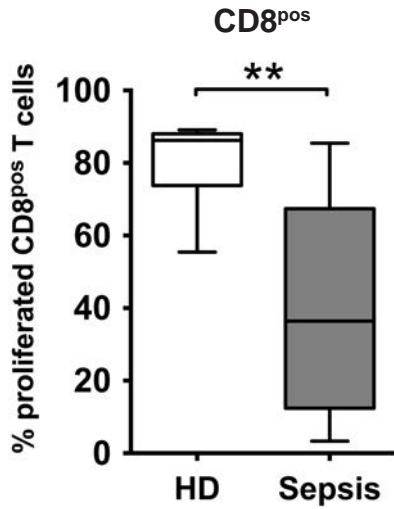
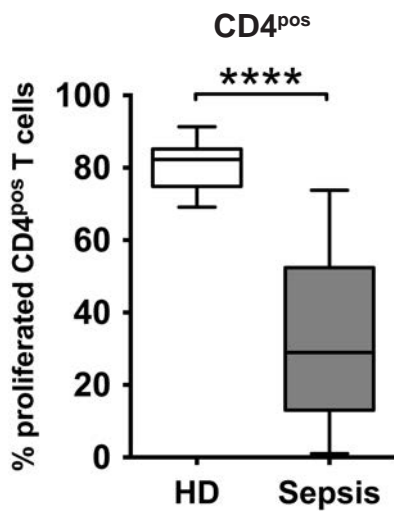
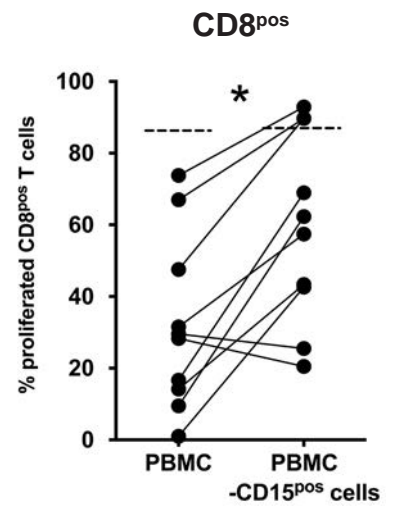
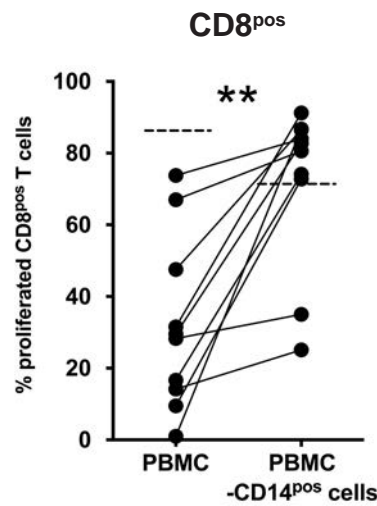
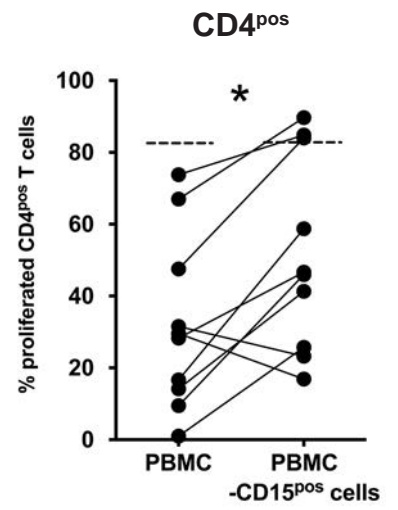
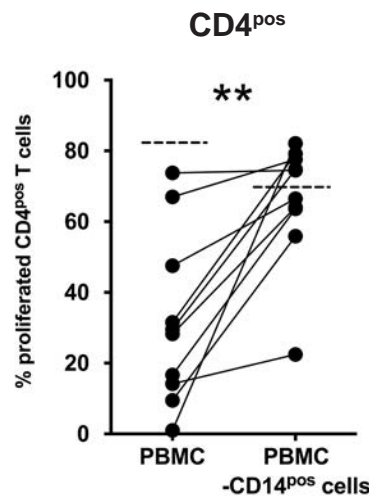
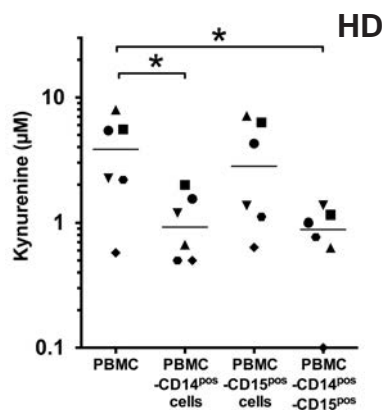
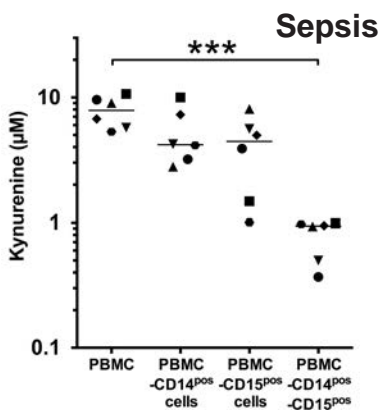
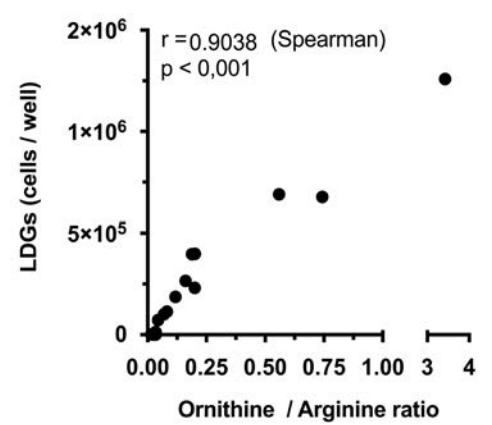
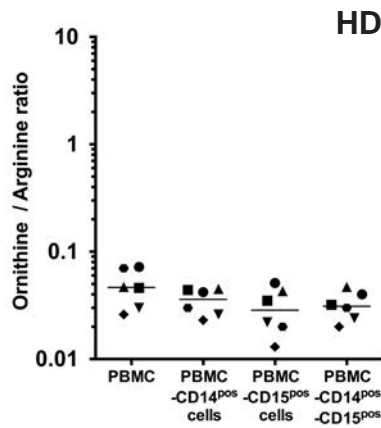
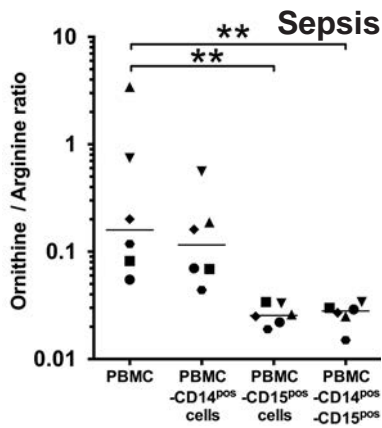


Figure 1

A.**B.****C.****Figure 2**

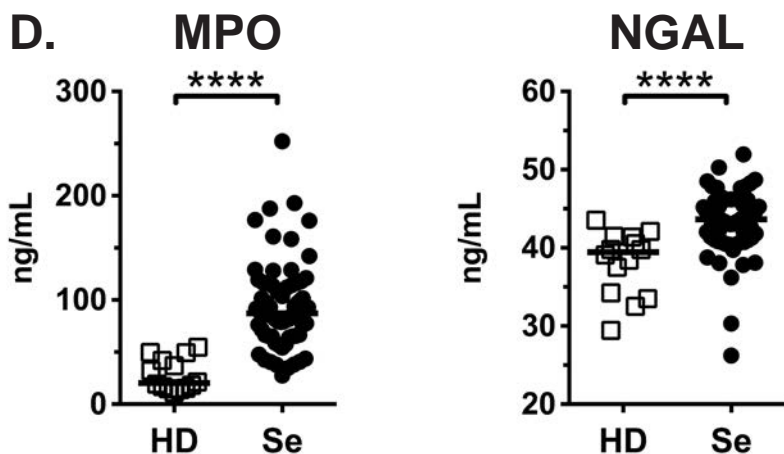
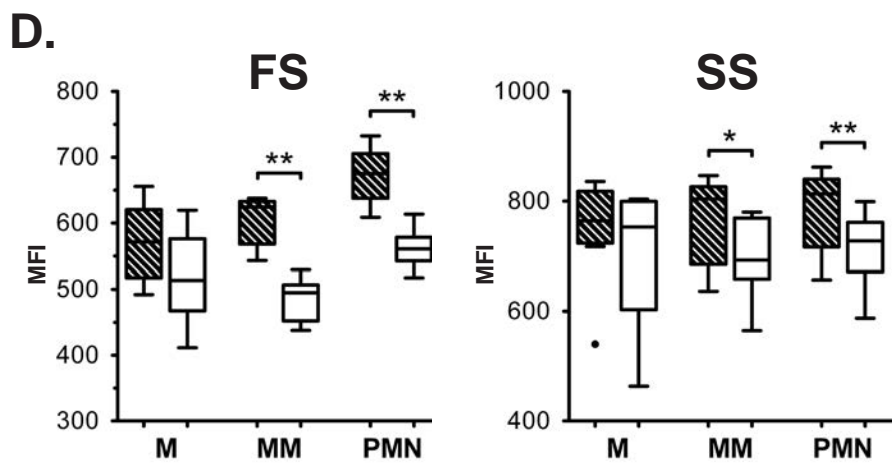
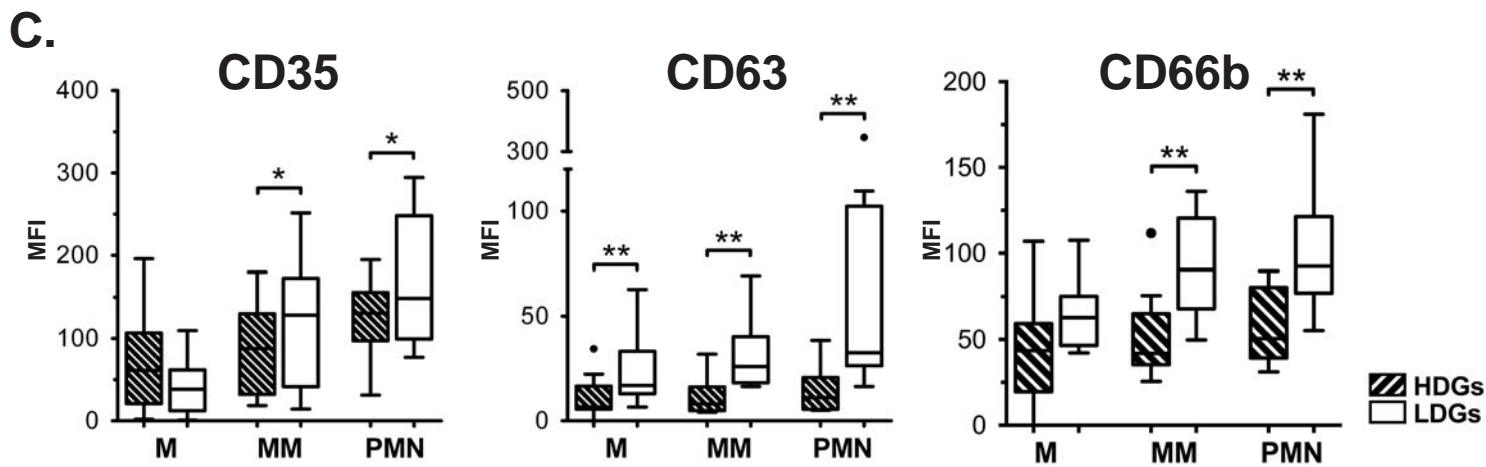
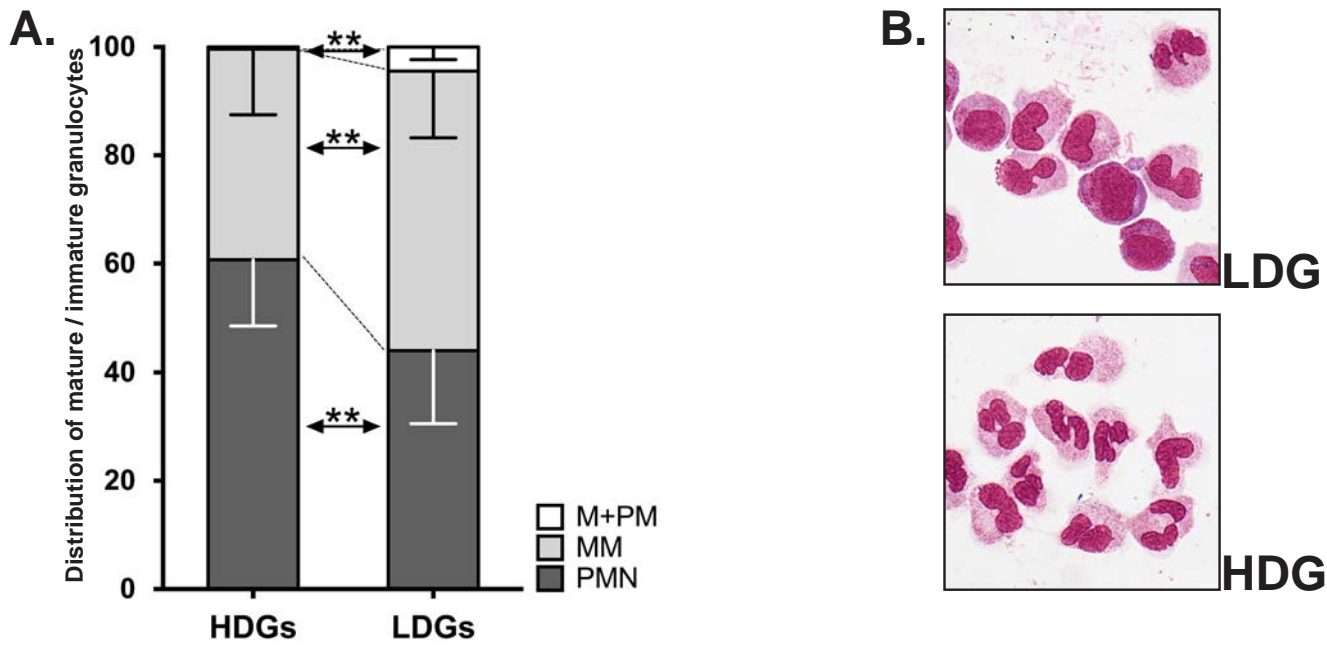
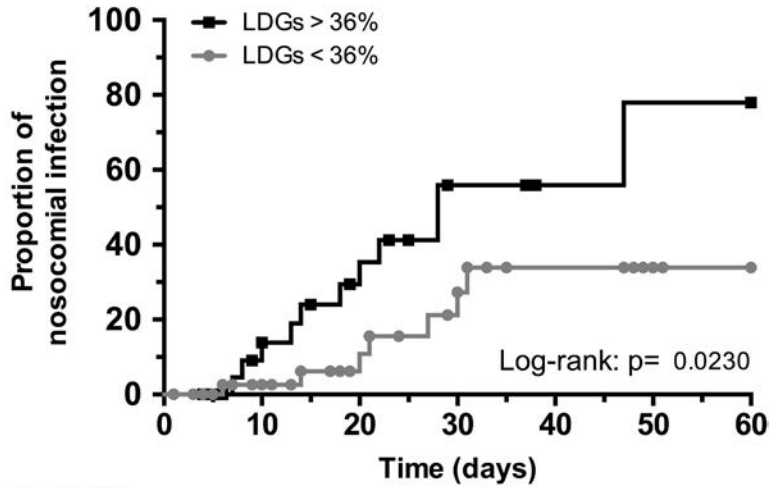
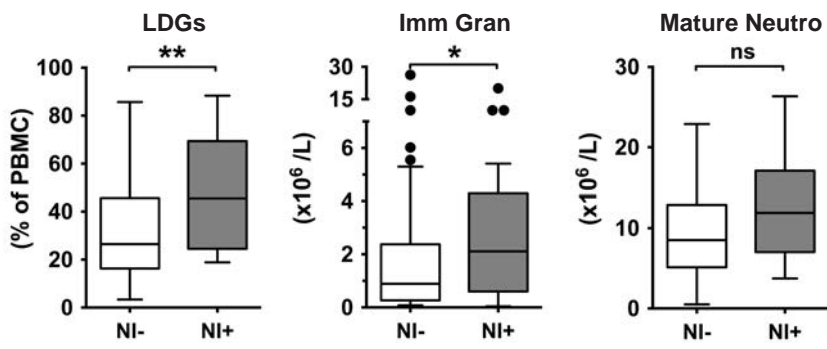
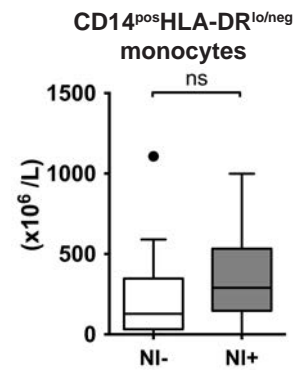
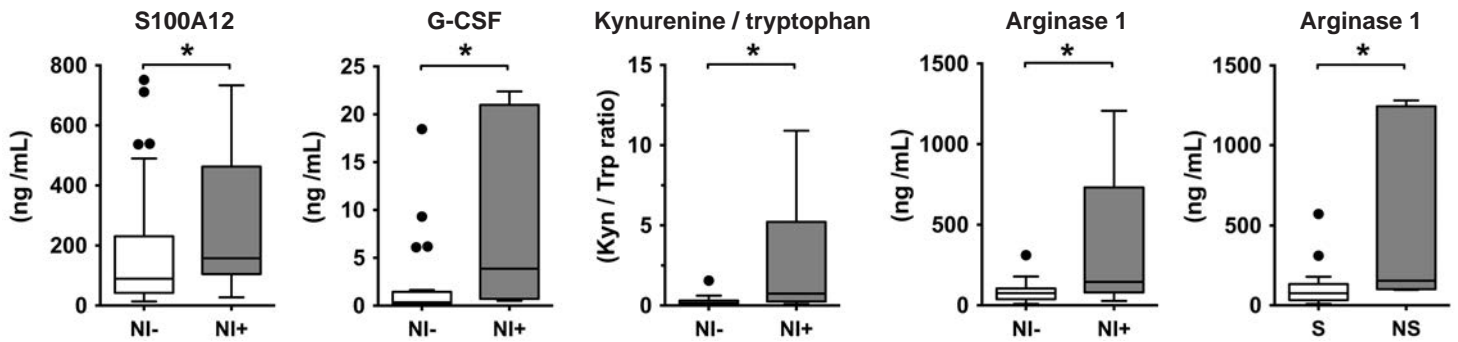


Figure 3

A.

Numbers at risk

LDGs < 36%	45	33	20	13	8	3	1
LDGs > 36%	26	19	12	6	3	2	1

B.**C.****Figure 4**

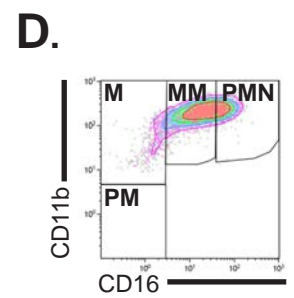
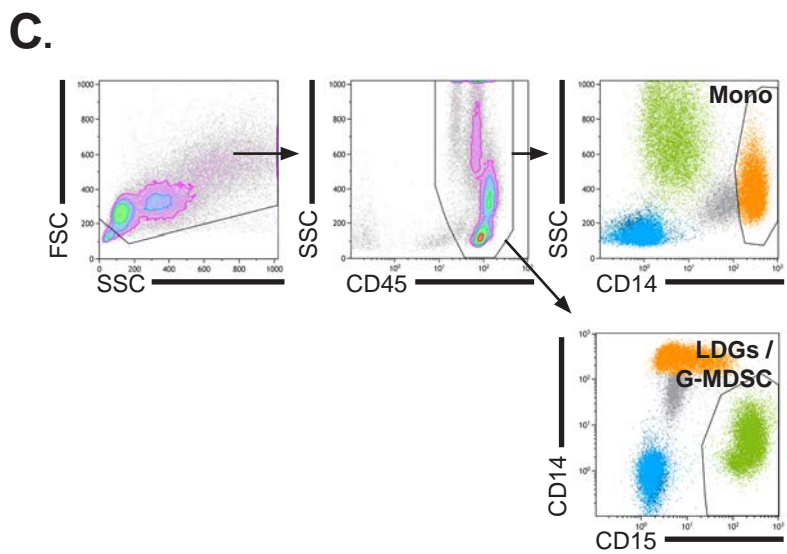
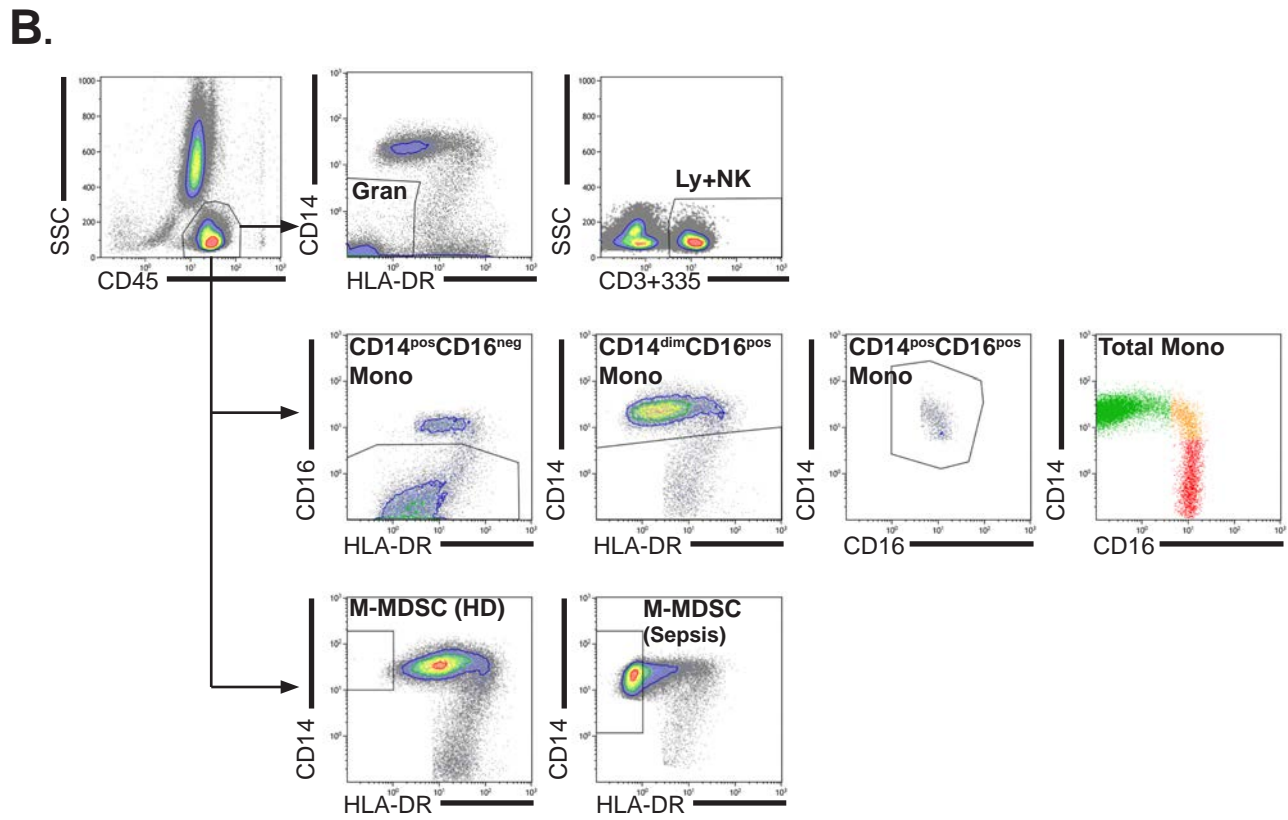
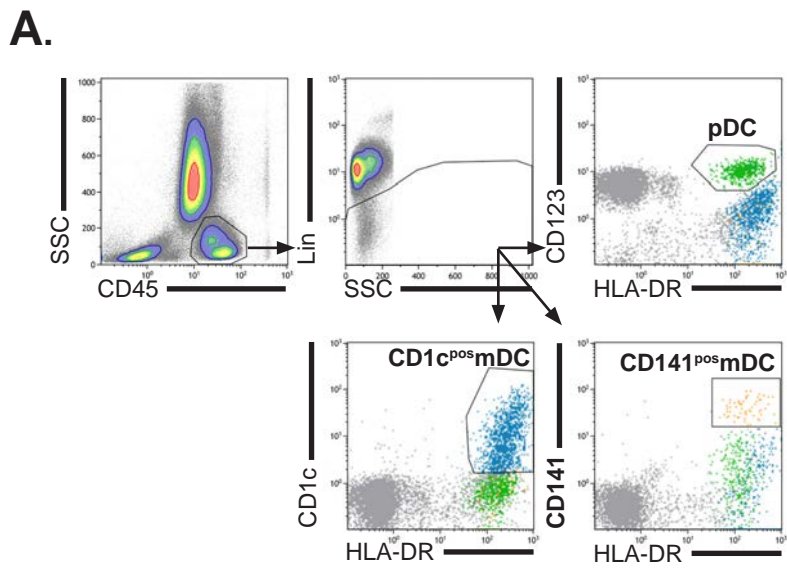
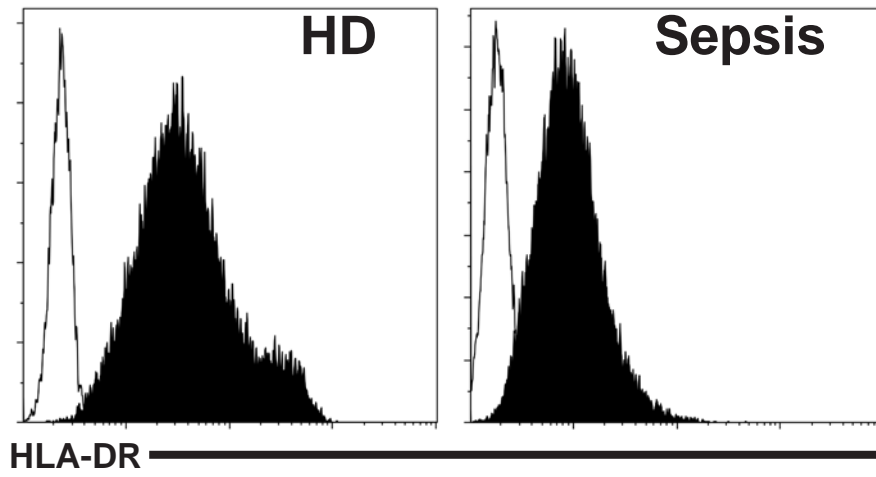
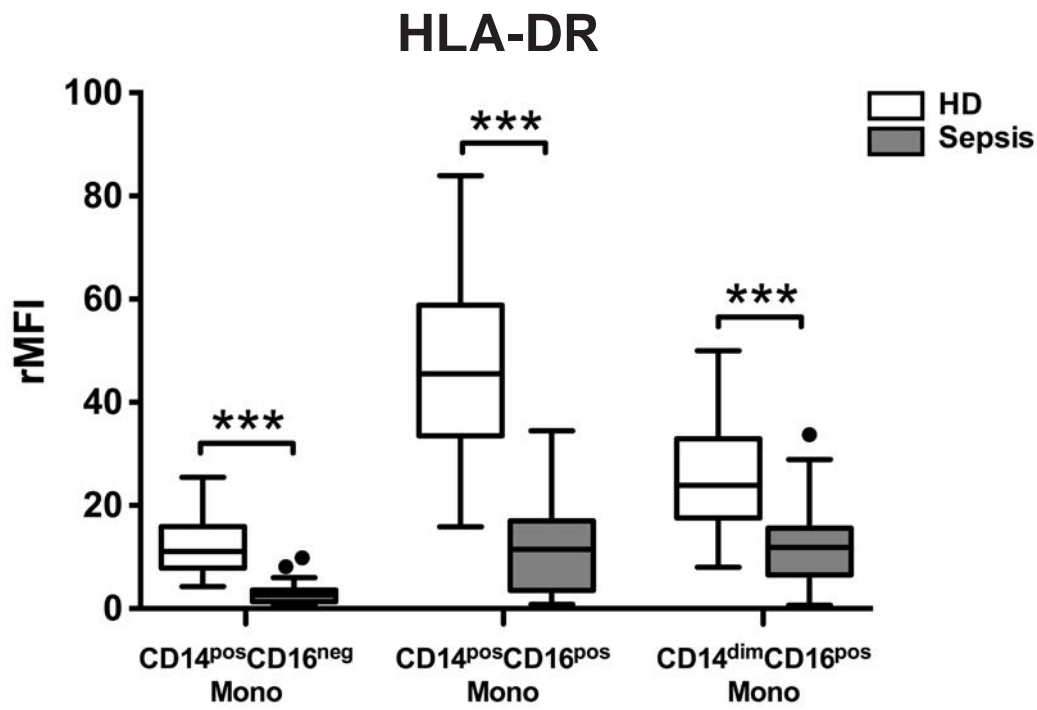
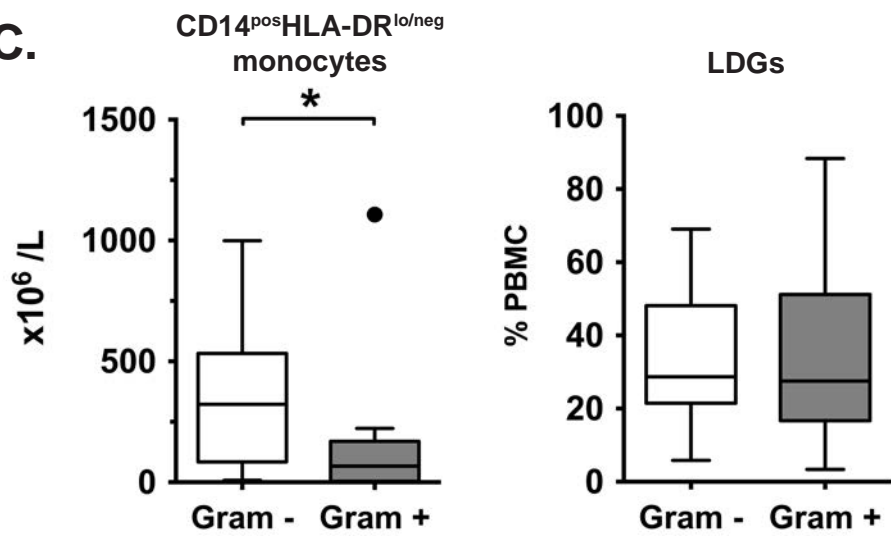


Figure S1

A.**B.****C.****Figure S2**

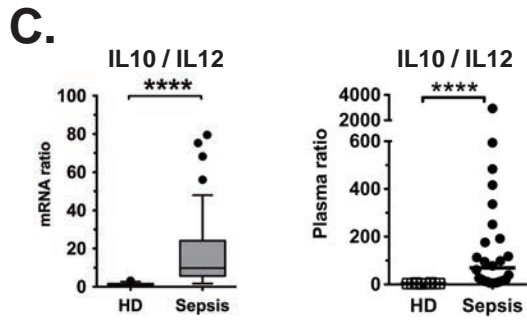
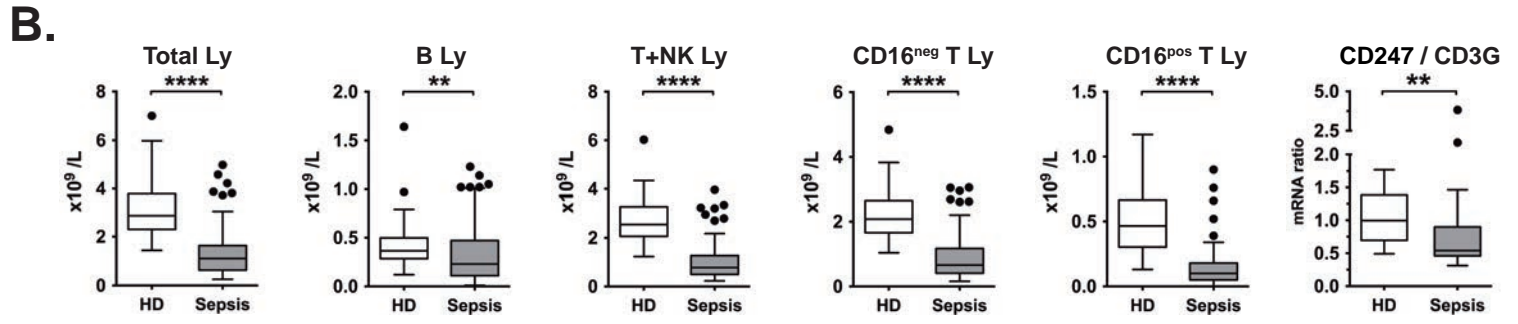
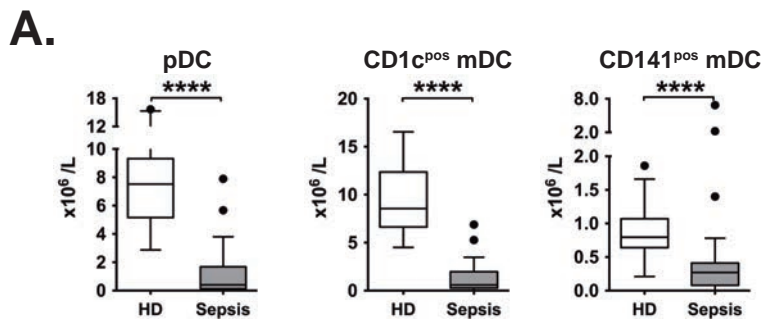


Figure S3

PBMC

PBMC-CD14^{pos} cells

PBMC-CD15^{pos} cells

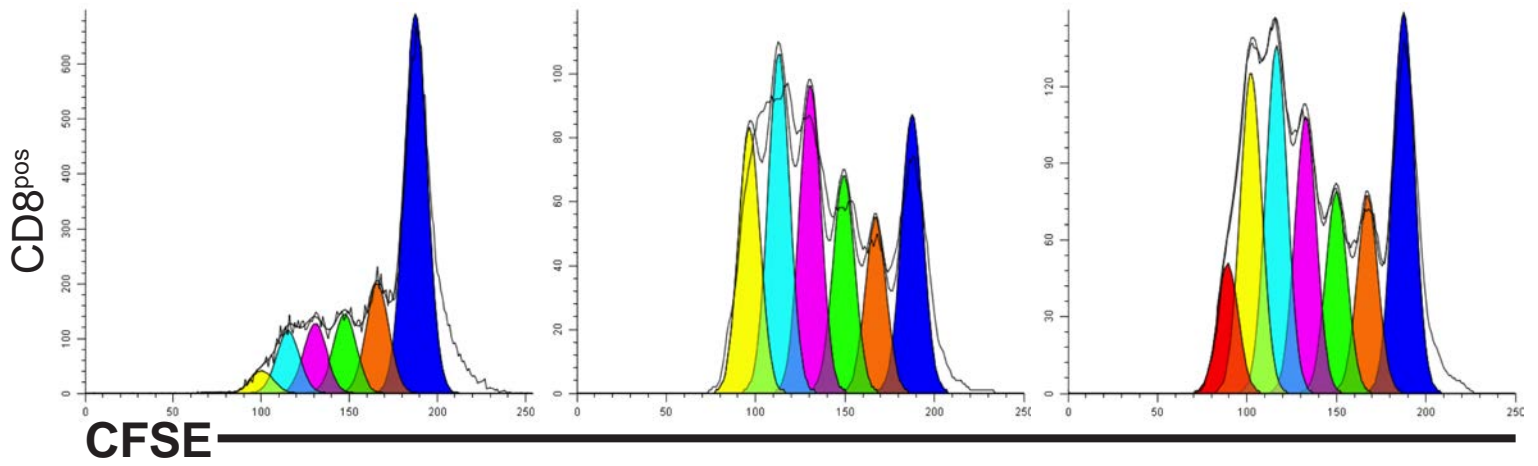
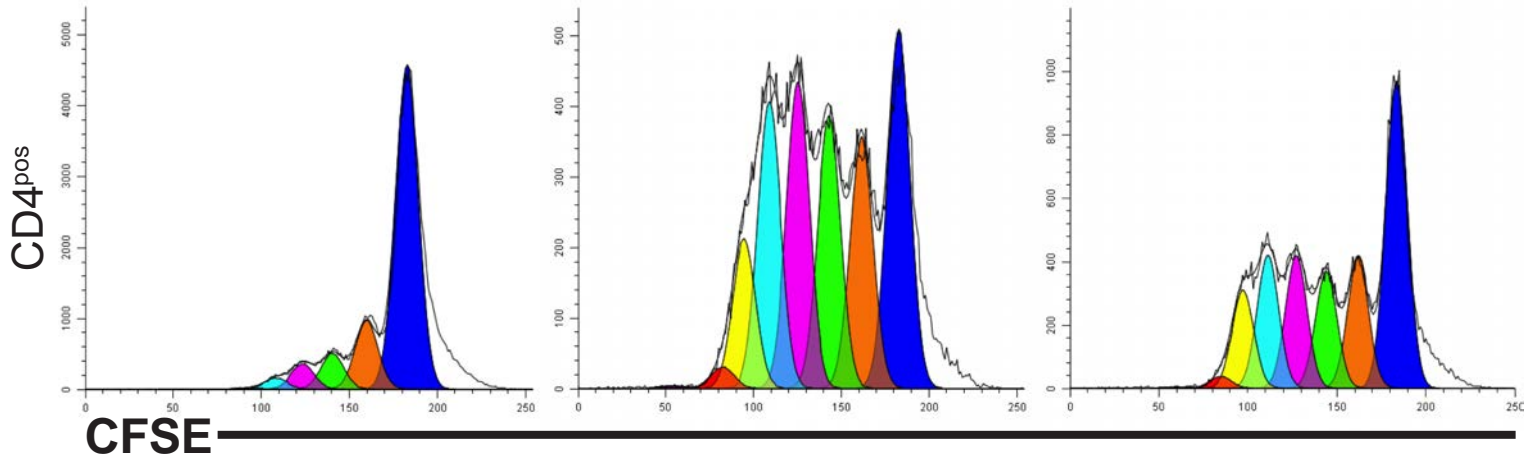


Figure S4

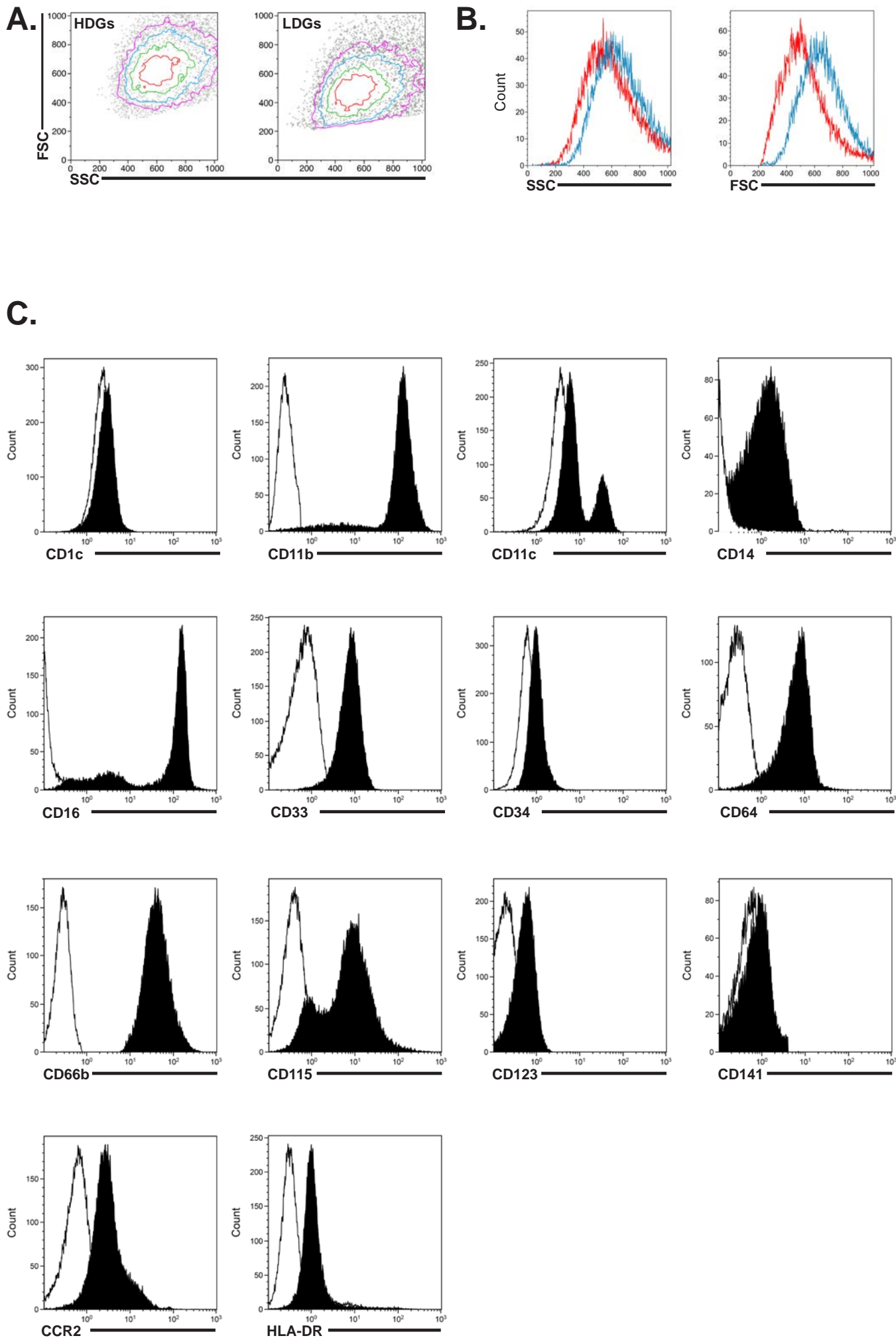


Figure S5

Article 4. La dysfonction lymphocytaire T au cours des lymphomes B diffus à grandes cellules implique l'expansion de cellules suppressives d'origine myéloïde exprimant IL-10, PD-L1, and S100A12

T-cell defect in Diffuse Large B-cell Lymphomas involves expansion of myeloid-derived suppressor cells expressing IL-10, PD-L1, and S100A12

Imane Azzaoui, Fabrice Uhel, Delphine Rossille, Celine Pangault, Joelle Dulong, Jerome Le Priol, Thierry Lamy, Roch Houot, Steven Le Gouill, Guillaume Cartron, Pascal Godmer, Krime Bouabdallah, Noel Milpied, Karin Tarte, Thierry Fest and Mikael Roussel

Article en révision favorable à Blood

Ce travail, présente les résultats de l'étude de l'origine, des fonctions suppressives et de l'impact clinique des MDSC au cours du lymphome B diffus à grandes cellules (DLBCL), et a constitué, en comparaison au choc septique, un modèle d'inflammation chronique.

Nous avons pu montrer qu'il existait, dans le sang circulant de patients atteints de DLBCL un profil d'expression génique caractérisé par une signature de type anti-inflammatoire, une sous-représentation des voies d'activation lymphocytaires T, et un enrichissement de l'expression des gènes MDSC. Le nombre de M-MDSC (CD14⁺HLA-DR^{low/-}) et G-MDSC (Lin⁻HLA-DR⁻CD33⁺CD11b⁺) était significativement augmenté. Seul le nombre de M-MDSC était corrélé au score IPI (*International prognostic index*), à la survie sans événements et au nombre de Treg circulants. Par ailleurs, nous avons pu montrer que la prolifération des lymphocytes T était restaurée par la déplétion des monocytes CD14⁺ *in vitro*. L'inhibition de la prolifération des lymphocytes T était induite par l'expression de PD-L1 et la production d'IL-10 et S100A12 par les M-MDSC, mais pas par l'arginase 1 ni par une activité IDO.

Nous avons ainsi pu montrer que les MDSC participaient à l'immunodépression au cours des DLBCL, mais que les mécanismes mis en jeu étaient différents de ceux observés au cours du sepsis.

T-cell defect in Diffuse Large B-cell Lymphomas involves expansion of myeloid derived suppressor cells expressing IL-10, PD-L1, and S100A12

Imane Azzaoui,¹ Fabrice Uhel,² Delphine Rossille,^{1,3,4,5} Celine Pangault,^{1,3,4,5} Joelle Dulong,^{1,3,4,5} Jerome Le Priol,¹ Thierry Lamy,^{3,4,5,6} Roch Houot,^{3,4,5,6} Steven Le Guill, ⁷ Guillaume Cartron,⁸ Pascal Godmer,⁹ Krime Bouabdallah,¹⁰ Noel Milpied,¹⁰ Karin Tarte,^{1,3,4,5} Thierry Fest^{1,3,4,5} and Mikael Roussel^{1,3,4,5}

¹ CHU de Rennes, Pôle Biologie, Rennes, France

² CHU de Rennes, Maladies Infectieuses et Réanimation Médicale, Rennes, France

³ INSERM, UMR U917, Equipe Labellisée Ligue Contre le Cancer, Rennes, France

⁴ Université Rennes 1, UMR917, Rennes, France

⁵ EFS Bretagne, Rennes, France

⁶ CHU de Rennes, Service d'Hématologie Clinique, Rennes, France

⁷ CHU de Nantes, Service d'Hématologie Clinique, Nantes, France

⁸ CHU de Montpellier, Service d'Hématologie Clinique, Montpellier, France

⁹ CHU de Vannes, Service d'Hématologie Clinique, Vannes, France

¹⁰ CHU de Bordeaux, Service d'Hématologie Clinique, Bordeaux, France

Short title: M-MDSCs in DLBCL

Corresponding author:

Karin Tarte, INSERM U917, Faculté de Médecine, 2 Avenue du Pr Léon Bernard, F-35043 Rennes France, E-mail: karin.tarte@univ-rennes1.fr, Phone: +33 (0) 223 234 512, fax: +33 (0) 223 234 958; or Thierry Fest, INSERM U917, Faculté de Médecine, 2 Avenue du Pr Léon Bernard, 35043 Rennes Cedex, France, E-mail: thierry.fest@univ-rennes1.fr, Phone: +33 (0) 299 284 127, Fax: +33 (0) 299 284 152; or Mikael Roussel, Laboratoire Hématologie, CHU Pontchaillou, 2 rue Henri Le Guilloux, 35033 Rennes Cedex, France, E-mail: mikael.roussel@chu-rennes.fr, Phone: +33 (0) 299 289 142, Fax: +33 (0) 299 284 152.

Scientific section: LYMPHOID NEOPLASIA

Text word count: 3797

Abstract word count: 188

Number of figures and tables: 7

Number of references: 62

Key points

- Expansion of circulating monocytic myeloid derived suppressor cells (MDSC) correlates with clinical outcome in patients with DLBCL.
- Mechanisms of MDSC-dependent T-cell inhibition in DLBCL are related to IL-10, PD-L1, and S100A12.

Abstract

In diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), the number of circulating monocytes and neutrophils represents an independent prognostic factor. These cells include monocytic and granulocytic myeloid derived suppressor cells (M- and G- MDSCs) defined by their ability to suppress T-cell responses. MDSCs are a heterogeneous population described in inflammatory or infectious diseases as well as in numerous tumors including multiple myeloma, chronic lymphocytic leukemia and DLBCL. However, their mechanisms of action remain unclear. We broadly assessed the presence and mechanisms of suppression of MDSC subsets in DLBCL. By gene expression profiling, a myeloid suppressive signature was identified in the peripheral blood of DLBCL patients. Accordingly, we identified in a cohort of 56 DLBCL patients an increase in circulating G-MDSC ($\text{Lin}^{\text{neg}}\text{HLADR}^{\text{neg}}\text{CD33}^{\text{pos}}\text{CD11b}^{\text{pos}}$) and M-MDSC ($\text{CD14}^{\text{pos}}\text{HLA-DR}^{\text{low}}$) counts. Interestingly, only M-MDSC number correlated with the IPI score, with event-free survival (EFS), and with the number of circulating T_{reg} . Furthermore, T-cell proliferation was restored after monocyte depletion. Myeloid-dependant T-cell suppression was attributed to a release of IL-10 and S100A12 and an increase of PD-L1 but not on arginase 1 nor IDO. In summary, we identified MDSC subsets expanded in DLBCL as well as new mechanisms of immunosuppression in DLBCL.

Introduction

Diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) is the most common non-Hodgkin lymphoma, accounting for around 40% of new cases. Although DLBCL is recognized as a single entity by the World Health Organization, several subgroups with different outcomes have been described.¹ Despite introduction of immunotherapy, treatment failure is observed in around 40% of DLBCL, emphasizing the need for prognostic biomarkers.² The International Prognostic Index (IPI), with variants, still considered the standard prognostic factor for DLBCL, stratifies patients at diagnosis. However, this score does not take into account biological differences among subgroups.³⁻⁵ Various cytokines (soluble PD-L1,⁶ CxCL10,⁷ IL-10)⁷, tumor characteristics (cell of origin,⁸ LMO2,⁹ MYC-, BCL2- and BCL6-rearrangements)¹⁰ and components from the tumor microenvironment (CD3^{pos}, CD4^{pos} and Foxp3 tumor infiltrating T cells,^{11,12} CD68^{pos} myeloid cells) evaluated at the time of diagnosis represent additional prognostic factors.^{2,13,14} Recently, an increase in circulating neutrophil¹⁵ or monocyte^{16,17} counts, combined with a decrease in lymphocytes count (so-called LMR: lymphocyte to monocyte ratio and NLR: neutrophil to lymphocyte ratio) have been proposed as independent prognostic markers in the Rituximab era.

Specific granulocyte and monocyte subsets recognized as myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) have demonstrated their immunosuppressive functions in cancers and inflammatory diseases.^{18,19} These cells are immature, arise from the myeloid lineage, and are defined by their immunosuppressive function. Human MDSCs, a heterogeneous population with a lack of specific marker, belong to 2 major types: granulocytic (G-MDSC, Lin^{neg}HLADR^{neg}CD33^{pos}CD11b^{pos}) and monocytic (M-MDSC, CD14^{pos}HLA-DR^{low}). Various additional markers (including CD116, CD124, VEGF-R, CD11c, CD11b, CD274) have been associated with these cells.¹⁹

Interestingly, these markers are likely regulated through various stimuli depending on the tumor type.²⁰ MDSC induction and expansion are mediated by a combination of soluble factors (including VEGF, GM-CSF, M-CSF, S100A8/A9, IL-4, IL-6, IL-10) produced by tumor and/or surrounding cells such as stromal cells, T cells or macrophages.¹⁹ These factors essentially trigger activation of the STAT3, STAT6 and STAT1 family, leading to expression of genes involved in the blockade of the myeloid differentiation or in immune regulation. These suppressive mechanisms converge to impair effector T cell and NK cell functions and contribute to polarization of macrophages towards a M2 anti-inflammatory phenotype. In human, various mechanisms have been described including *i*) Regulatory T cells (T_{reg}) expansion, *ii*) depletion of T-cell metabolism-essential amino acids by expression of arginase 1 (ARG1) or indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), *iii*) production of reactive oxygen species (ROS) by expression of NADPH oxidase (*NOX2*), and *iv*) IL-10, TGF β release and PD-L1 expression.^{20,21}

In most solid cancers studied (melanoma, renal, lung or prostate cancer, hepatocellular carcinoma), although both G- and M-MDSCs were increased, a predominance of G-MDSC was mostly detected.^{22,23} However, using a model which allowed separate study of G- and M-MDSC in tumor-bearing mice, Haverkamp *et al.* demonstrated that M-MDSC was the most suppressive subset and that loss of G-MDSC didn't not alter tumor incidence.²⁴ An enrichment in circulating MDSCs has been described in various lymphoid malignancies such as myeloma,²⁵ T-cell lymphoma,²⁶ chronic lymphocytic leukemia (CLL)²⁷ and DLBCL.^{28,29} However, G-MDSC have never been studied in DLBCL, and only arginase 1 expression has been evaluated as a mechanism of M-MDSC-mediated immunosuppression.^{28,29} Here, we hypothesized that the increase in neutrophils and monocytes in peripheral blood of

DLBCL patients might be related to an increase of G- and M- MDSCs. We found, using gene expression profiling (GEP), a myeloid suppressive signature in DLBCL's peripheral blood. Accordingly, we identified an expansion in circulating G-MDSC and M-MDSC counts. Interestingly, M-MDSCs were immunosuppressive and correlated with the IPI score as well as with event-free survival (EFS). Finally, we pointed out IL-10, PD-L1, and S100A12 as MDSC-related mechanisms of suppression in DLBCL.

Methods

Samples

Two cohorts of patients were used in this study. For GEP, 75 DLBCL patients at diagnosis from the GOELAMS 075 clinical trial (clinicaltrials.gov: NCT00561379) and 87 matched healthy donors (HD) were enrolled. This cohort was already published by our group.⁶ Then, a prospective cohort was set with 56 DLBCL patients at diagnosis (BMS-LyTRANS study). Patients with previous corticosteroid treatment were excluded from this study. Forty-five age-matched HD were also enrolled. Clinical characteristics of DLBCL patients enrolled in this second cohort are listed in Table 1. The research protocol was conducted under French legal guidelines and fulfilled the requirements of the local institutional ethics committee.

Whole blood GEP

Whole blood was collected into PAXgeneTM Blood RNA tubes (Becton Dickinson BD Biosciences, San Jose, CA, USA) ensuring blood stabilization and stored at -80°C before RNA extraction. High-quality total RNA was hybridized onto Affymetrix GeneChip® Human Exon 1.0 ST oligonucleotide arrays (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) according to manufacturer's instructions. Microarray Quality Control was assessed using Affymetrix Expression Control v1.1. Raw data were pre-filtered as follows: only core-annotated probesets were selected. The DABG (Detection Above Background) summary file was generated for the RMA normalized data using Affymetrix Power Tools. DABG calculates the p value that the intensities in a probeset could have been observed by chance in a background distribution. A probeset was defined as present if its DABG p value was less than 5% in at least 50% of the samples in at least one condition. A transcript was preserved if at least

50% of the core probesets of the transcript were present. Pre-filtered data were RMA-normalized with adjustment for GC content and probesets were mean-summarized to transcripts (Partek® Genomics Suite™ version 6.5, Partek Inc., St Louis, MO, USA). Unsupervised analysis using hierarchical clustering analysis (HCA) was performed on the normalized data. Differentially expressed genes were identified by the Mann-Whitney non-parametric test, with adjustment for multiple testing using the Benjamini-Hochberg False Discovery Rate set at 5%. Interpretation of the functional roles was established using Ingenuity Pathway Analysis (IPA) (Ingenuity® Systems) based on the two gene lists identified on the HCA as over- or under-expressed in DLBCL patients compared to HD. Canonical pathways analysis identified the pathways from the IPA knowledge database that were most significant to the data set (FDR $p < 5\%$). Gene Set Enrichment Assay (GSEA) was performed using the BROAD Institute GSEA software (<http://www.broad.mit.edu/gsea/>) on the DLBCL dataset using a panel of genes that we defined as related to myeloid suppressive cells based on literature knowledge (Supplementary Table 1).³⁰

Quantitative real-time PCR

Total RNA was extracted using PAXgene blood RNA kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). cDNA was then generated using Multiscribe® Reverse Transcriptase and High-Capacity cDNA reverse Transcription kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). For quantitative RT-PCR, we used custom designed Taqman® array microfluidic cards and the Taqman Universal Master Mix from Applied Biosystems (Invitrogen). Gene expression was measured by the ABI Prism 7900HT Sequence Detection System. 18S, CDKN1B and ELF1 were determined as appropriate internal standard genes using TaqMan endogenous control assays and geNorm algorithm analysis. For each

sample, the CT value for the gene of interest was determined, normalized to the geometric mean value of the 3 housekeeping genes, and compared to the median value obtained from healthy donors using the 2-ddCT method. Results were expressed as ratio of DLBCL mean and HD mean of each gene.

Fluorescent flow cytometry analysis

Blood samples were collected on heparin tubes. White blood cell (WBC) differentials were performed using Cytodiff™ panel (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) on 50µL of blood as previously described.³¹ Flow cytometry analysis of M-MDSCs, G-MDSCs and dendritic cells was performed on whole blood (300µL/tube) with the antibody panels described in Supplementary Table 2. Absolute counts were obtained by using Flow-Count beads (Beckman Coulter). An erythrocytes lysis (Uti-Lyse Dako, Carpinteria, CA, USA) was performed before analysis by flow cytometry (Navios, Beckman Coulter). G-MDSCs and M-MDSCs were identified as shown in Supplementary Figure 1 using Kaluza software (Beckman Coulter). Regulatory T cells (T_{Reg}) and tumor circulating B-cells were defined on blood mononuclear cells (PBMC) after density gradient centrifugation (lymphocyte separation medium, Eurobio, CourtaBoeuf, France). On T_{Reg} panel, cells were fixed and permeabilized using FOXP3 staining kit (BD Biosciences). Results were expressed as absolute values (10⁶ or 10⁹ cells/L), percentages or in mean fluorescence intensity (MFI).

Cytokines and enzymes assessment

Concentration of IL-10 (eBioscience, San Diego, CA, USA), TGF-β1 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), S100A8/9, S100A12 and Arginase I (Hycult Biotech, Ude, The Netherlands) in the plasma or culture supernatants were measured by enzyme-

linked immunosorbent assay (ELISA), according to manufacturer's recommendations. Finally, arginase I and IDO activities were evaluated by the ornithine to arginine and tryptophan to kynurenine ratio, respectively. Plasma from heparin tube specimens were stored at -80°C until high-performance liquid chromatography (HPLC).³²

T-cell proliferation assay after monocyte depletion

Fresh PBMC from DLBCL patients or HDs were separated into two fractions. The first fraction was positively depleted for residual erythrocytes using glycophorin A beads, (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) while the second fraction was depleted for erythrocytes and monocytes (CD14 microbeads, Miltenyi Biotec). The purity was higher than 97%. The two negative fractions (PBMC and PBMC-CD14^{pos}) were labeled with 0.2 μM carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE; Interchim, Montlucon, France). PBMC and PBMC-CD14^{pos} were plated in triplicate in 96-well round-bottom plates (Corning Costar, Corning, NY, USA) with RPMI 1640 medium enriched with 10% of human serum AB (Biowest, Courtaboeuf, France) and 1% penicillin-streptomycin (Gibco, Saint Aubin, France). Then, cells were stimulated with soluble anti-CD3 (0.6 μmL , Sanquin, Amsterdam, The Netherlands) and anti-CD28 (0.6 μmL , Sanquin) and cultured at 37°C in 5% CO_2 and 100% humidity during 4 days. CFSE dilution was assessed by flow cytometry and analyzed with ModFit LT software (Verity Software House, Topsham, ME, USA). Results were expressed by the proliferation index (PI).

T-cell proliferation assay with inhibitors

Cryopreserved PBMC from DLBCL patients depleted for residual erythrocytes were CFSE labeled and then plated in triplicate at 10^6 cells/mL in RPMI 1640 medium enriched with 10% of human serum AB, 1% penicillin-streptomycin in 96-well round-bottom plates and incubated at 37°C during 30 minutes with or without different neutralizing antibodies: anti-IL10 (10µg/mL, R&D systems); anti-S100A12 (10µg/mL, Acris, San Diego, CA, USA) and anti-PD1 (20µg/mL, clone 3.1 given by Professor Daniel Olive)³³ or with chemical analogues: L-1MT (1mM, Sigma-Aldrich, Diegem, Belgium)³⁴ and nor-NOHA (20mM, Enzo Life Sciences, Antwerpen, Belgium). At the concentration employed, nor-NOHA inhibited >80% of the arginase 1 activity on a positive control (data not shown). Thereafter, cells were stimulated with soluble anti-CD3 and anti-CD28 and incubated at 37°C in 5% CO₂ and 100% humidity during 4 days. CFSE dilution was assessed by flow cytometry and analyzed with ModFit LT software. Results were expressed as the percentage of proliferation of inhibitor-treated cells to control (anti-IgG1 isotype, 10µg/mL, R&D or medium plus vehicle).

Statistical analysis

Statistical analyses were performed with GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) using Spearman correlation, Wilcoxon or Mann-Whitney tests as appropriate.

Results

A myeloid regulatory GEP is detected in DLBCL peripheral blood

GEP was evaluated using the Affymetrix Human Exon 1.0 ST Array on 76 DLBCL patients and 87 HD. Following pre-filtering, the 11,302 remaining probesets (PS) were classified by an unsupervised hierarchical clustering. Sixty-five out of 76 DLBCL were clustered together with a set of 6,792 upregulated PS and a set of 4,510 downregulated PS compared to HD (Figure 1A). To further identify which immune response pathways were affected in DLBCL, these PS were filtered, highlighting 564 up- and 495 down-regulated PS in DLBCL compared to HD ($p < 0.05$ and $|FC| > 1.5$). These PS were further separately analyzed with IPA (Figure 1B). Within the 20 most represented pathways in DLBCL, we identified an innate immune response signature (TLR-, IL8-, IL6-, LPS-, TREM1-, NO/ROS- signaling), as well as an anti-inflammatory response (IL-10 signaling). On the other hand, a significant under-representation of pathways involved in T-cell activation (ICOS-ICOSL-, T cell receptor-, CD28-, CTLA4- signaling, regulation of IL-2 expression) was also revealed (Figure 1B). Finally, by GSEA, we found in our DLBCL cohort a significant enrichment for a list of myeloid genes known to be upregulated in MDSCs ($p = 0.03$) (Supplemental Table 1 and Figure 1C). Altogether these results were in favor of a myeloid regulatory signature in DLBCL.

MDSCs are more frequent in DLBCL peripheral blood

We next focused on the quantitative modifications of myeloid cells in the peripheral blood of DLBCL patients. A new prospective cohort was set up with 56 DLBCL patients at diagnosis (BMS-LyTRANS study) as well as 45 HDs. We noticed a significant increase in the monocyte- (mean: 0.55 vs $0.35 \times 10^9/L$, $p = 0.002$),

neutrophil- (mean: 4.48 vs 2.53x10⁹/L, p<0.0001), and immature granulocyte- counts (mean: 0.22 vs 0.07x10⁹/L, p=0.0003) obtained on a regular complete blood count in DLBCL patients compared to HD, whereas the total white blood cell (WBC) counts were not different (Figure 2A). Tumor circulating B-cells were detected in 9 out of 40 studied cases (22.5%) with a mean at 0.59x10⁹/L representing 0.16% to 25.3% of the WBC (data not shown). No correlation was found between tumor circulating cells and monocytes or granulocytes (data not shown). We found in patients with high risk (HR, aalPI≥3) disease a decrease of the LMR and an increase of the NLR, when compared to low risk (LR) patients (p=0.044 and 0.033, respectively) (Figure 2B).

As described in solid tumors²² and multiple myeloma,²⁵ both granulocytes and monocytes compartment contain MDSC subsets. In CLL²⁷ and DLBCL^{28,29} only M-MDSCs were already detected in patients. Thus, we next evaluated the absolute count of circulating MDSCs and identified, in whole blood, G-MDSC (Lin^{neg}CD123^{low}HLA-DR^{neg}CD33^{pos}CD11b^{pos}) and M-MDSC (CD14^{pos}HLA-DR^{low}). MDSC counts were significantly increased in DLBCL compared to HD samples with a mean of 22.93 vs 7.96x10⁶/L (p=0.001) for G-MDSC and 33.94 vs 6.94x10⁶/L (p=0.01) for M-MDSC (Figure 2C). Interestingly, G-MDSCs and M-MDSCs correlate with immature granulocyte and monocyte counts (p<0.0001 and p=0.03), respectively (Figure 2C). No correlation was found between G-MDSC and M-MDSC counts (data not shown). Finally, only M-MDSCs were increased in HR- compared to LR- DLBCL (p=0.049), and were associated with a worse EFS (p=0.034, HR=0.19) (Figure 2D). As the regulatory myeloid compartment in peripheral blood also includes dendritic cells, we assessed the 3 subsets of dendritic cells (so called pDC, cDC type 1: CD141^{pos} or cDC type 2: CD1c^{pos}).³⁵ These cell types were significantly decreased in

DLBCL when compared to HD, without correlation with any types of MDSC (Supplemental Figure 2).

M-MDSCs from DLBCL patients suppress T-cell response

MDSC immunosuppressive activities lead to a T-cell proliferation blockade or apoptosis. Noteworthy T-cell count and the ratio of *CD3 ζ* (CD247) to *CD3 γ* mRNA were decreased in DLBCL ($p=0.01$ and $p=0.0009$, respectively) (Figure 3A). Given the fact that *i*) in DLBCL, only M-MDSCs were correlated with prognostic, and *ii*) this subset has been described to be the dominant suppressive population of MDSC,²⁴ we evaluated the suppressive capability of the monocyte fraction. We noticed that *CD8^{pos}* T lymphocytes issued from DLBCL patients proliferated less than those from HDs in response to polyclonal activation ($p=0.01$) (Figure 3B). Interestingly, when *CD14^{pos}* monocytes were depleted from PBMC, the proliferation index (PI) ratio (monocyte-depleted PBMC to PBMC) increased in DLBCL patients whereas it decreased in HDs, demonstrating a specific suppressive activity for monocytes in lymphoma patients (Figure 3B).

In DLBCL, M-MDSC suppressive activity is independent from arginase I and IDO activities

In B-cell malignancies, arginase 1 and IDO activities were reported in DLBCL²⁹ and CLL,²⁷ respectively. MDSCs mediate T-cell suppression through various mechanisms.²¹ Therefore, we compared in DLBCL and HD peripheral bloods, the gene expression of 5 key enzymes (*ARG1*, *IDO1*, *NOS2*, *HO-1* and *PTGS2*) involved in MDSC biology. Among those, only *ARG1* was significantly increased in DLBCL ($p=0.003$). *IDO1* although not significant, shows a trend of upregulation (1.8 fold) in

DLBCL (Figure 4A). To evaluate arginase 1 and IDO activities, we measured the concentration of arginine and tryptophan as well as their degradation products, ornithine and kynurenine, respectively. Arginase 1 and IDO activities were increased in DLBCL ($p=0.02$ and $p=0.04$, respectively) (Figure 4B). Finally, we quantified the plasma arginase 1 enzyme by ELISA and found increased levels in DLBCL patients compared to HDs (mean at 171.1 vs 37.6 ng/mL, $p<0.0001$) (Figure 4C). Then, based on the presence or absence of suppressive monocytes, 2 groups of DLBCL were constituted and we showed that in DLBCL the proliferation of $CD4^{pos}$ and $CD8^{pos}$ cells issued from PBMC was not increased in the presence of arginase or IDO inhibitors regardless of the presence of M-MDSCs (Figure 4D). Interestingly, arginase 1 in plasma did not correlate with M-MDSCs, but correlated instead with the number of immature granulocytes, which contains G-MDSC³⁶ ($r=0.33$, $p=0.049$) (Figure 4E).

IL-10, PDL-1 and S100A12 are involved in M-MDSC suppressive activity

Because of the lack of correlation between M-MDSCs and arginase 1 or IDO in DLBCL, we sought for additional mechanisms of immunosuppression already described for MDSCs, including T_{reg} induction, IL10 and $TGF\beta$ release as well as PD-L1 expression.²¹ First, we found that T_{reg} and $CD14^{pos}DR^{low}$ counts correlated in DLBCL patients ($r=0.5$, $p=0.039$) (Figure 5A). Then, we compared, the expression of genes encoding the expression of immunosuppressive molecules in the peripheral blood of DLBCL patients and HD. Unlike *TGFB1* and *S100A8*, *IL10*, *S100A9*, and *S100A12* were significantly overexpressed in DLBCL. In addition, although not significant, *CD274/PD-L1* expression was also increased in DLBCL by 1.85 fold (Figure 5B). Interestingly, although the expression of PD-L1 on monocytes was

increased in DLBCL ($p=0.03$) (Figure 5C), *CD274* expression did not correlate with the circulating malignant B-cell count (data not shown). Similarly, at the protein level, IL-10 was increased in the peripheral blood of DLBCL patients ($p<0.001$), a trend was also noticed for S100A12 ($p=0.052$) but not for TGF- β 1 nor S100A8/A9 (Figure 5D). We thus evaluated the levels of IL-10 and S100A12 in culture supernatants from stimulated PBMC, depleted or not from CD14^{pos} cells. These molecules were decreased after CD14^{pos} depletion ($p<0.05$) (Figure 5E). Finally, we analyzed the percentage of proliferating T cells after CD3/CD28 stimulation in the presence of various blocking antibodies (IL-10, PD-1 and S100A12). Based on the presence or absence of suppressive monocytes, 2 groups of DLBCL were constituted (Figure 6). In the group of patients with MDSC cells, neutralizing IL-10, PDL-1 and S100A12 resulted in an increase of CD4 and/or CD8 T-cell proliferation.

Discussion

Circulating MDSCs have been described in various solid tumors with, in most cases, a predominance of G-MDSC.^{22,23} Regarding lymphoid neoplasias, both G- and M-MDSCs are increased in Hodgkin lymphoma and in multiple myeloma.^{25,37,38} Few studies were conducted on B-cell lymphomas or CLL, and focused exclusively on the M-MDSC subtype.^{27-29,39} Since the majority of blood biomarkers in DLBCL are linked to tumor microenvironment and in particular to myeloid cell biology,^{6,7,14-17} further characterization of the MDSC compartment is highly relevant in this disease. Our aim was thus to characterize the various MDSC subsets in peripheral blood from DLBCL patients.

As previously described we found an increase in neutrophils and monocytes count, whereas the number of lymphocytes was reduced. This was also reflected in the GEP on DLBCL patients whole blood by an overexpression of myeloid-related genes and a downregulation of lymphoid-related genes, irrespective of GC or ABC subtypes. Additionally, we found an enrichment in pathways involved in innate immunity (TLR-, IL8-, IL6-, LPS-, TREM1-, NO/ROS- signaling) or in the anti-inflammatory response (IL-10 signaling).

By flow cytometry, we found higher counts of G-MDSCs ($\text{Lin}^{\text{neg}}\text{CD123}^{\text{low}}\text{HLA-DR}^{\text{neg}}\text{CD33}^{\text{pos}}\text{CD11b}^{\text{pos}}$). During the preparation of this manuscript and in agreement with our results, an expansion of myeloid cells with a G-MDSC phenotype has been reported in a small cohort of DLBCL (n=5).⁴⁰ In our study, G-MDSCs did not correlated to clinical outcome, nor to T_{reg} count. Additionally, the suppressive fraction of granulocyte was recently identified as remaining granulocytes in the PBMC fraction after density cell separation and called low density neutrophils.⁴¹ In DLBCL,

G-MDSCs were detected only in whole blood but were absent from PBMC (data not shown). Thus, we focused our attention to M-MDSCs.

M-MDSCs ($CD14^{pos}HLA-DR^{low}$) were expanded in DLBCL patients, in concordance with 2 other studies with altogether 41 DLBCL patients.^{28,29} Finally, an additional monocyte subset ($CD14^{pos}CD16^{pos}$) was found increased in DLBCL although partially overlapping with the $CD14^{pos}HLA-DR^{low}$ cells (data not shown). Whether, this subset has suppressive function is controversial. For some authors, these cells produce the anti-proliferative cytokine IL-10 or induce T_{reg} ,⁴²⁻⁴⁴ whereas for other authors, they highly express HLA-DR and release pro-inflammatory cytokine TNF- α .⁴⁵ One explanation might be their heterogeneity and gating challenge by flow cytometry. Thus the $CD14^{pos}CD16^{pos}$ compartment may contain different subsets including $CD14^{pos}HLA-DR^{low}$ monocytes. Interestingly, in our DLBCL patients, $CD14^{pos}CD16^{pos}$ cells expressed low levels of HLA-DR, a hallmark of MDSCs (data not shown). Altogether, our results were in favor of an increase in various MDSC subsets in DLBCL, with a clinical relevance for the $CD14^{pos}HLA-DR^{low}$ population. In contrast to most solid tumors, where G-MDSCs are the most frequent population of MDSC,²³ M-MDSCs are preeminent in lymphoid disease.^{27-29,39} Moreover, M-MDSC were recently described, as the most suppressive subset of MDSC in tumor-bearing mice.²⁴ In DLBCL, we have shown that $CD14^{pos}$ cells exerted a suppressive activity on T cells and that depletion of those $CD14^{pos}$ cells could restore T cells functions and therefore proliferative activity.

In lymphoid malignancies, arginase 1 and IDO are 2 mechanisms of suppression which have been already described.^{27,29} However in our study, neither arginase 1, nor IDO activity were involved in the MDSC suppressive activity. The plasma levels of arginase 1 were highly increased and correlated to the number of

immature granulocytes, but didn't have any relationship with the M-MDSC subset. Consequently, arginase 1 might be released by granulocytes but is not responsible for the M-MDSC suppressive activity. Two previous papers already reported an expansion of M-MDSCs in DLBCL. The first one did not demonstrate functionally the suppressive activity of these cells, which is yet essential for the MDSC characterization.²⁸ The second one did not focus on DLBCL but rather involved a large variety of non-Hodgkin's lymphomas. Moreover, the functional assays were limited and did not explore other mechanisms of T-cell suppression than arginase 1.²⁹

These results prompted us to seek for additional suppressive mechanisms in MDSCs from DLBCL. Release of IL-10, TGF- β and activation of the PD-L1/PD-1 axis are known MDSC mechanisms of suppression.⁴⁶⁻⁴⁹ Interestingly, in DLBCL we and others have shown that IL-10 and sPD-L1 can be elevated compared to HDs.^{6,50} Herein, we demonstrated that the M-MDSCs suppressive activity was mediated by a release of IL-10 by CD14^{pos} cells and an expression of PD-L1 on monocytes surface, and that these suppressive activities were reversed by neutralizing antibodies.⁵¹ We demonstrated that S100A12 was also responsible for T-cell suppression in DLBCL. In accordance with this finding, S100A8, S100A9 and S100A12 are expressed in MDSCs from hepatocellular and colorectal carcinomas,^{52,53} and S100 proteins, among other abilities, enhance the suppressive activity of MDSCs via an increase in ROS production.⁵⁴⁻⁵⁶ The number of T_{reg}, another regulatory subset of T-cell proliferation, also correlated with CD14^{pos}HLA-DR^{low} monocytes count, but not with G-MDSC count. Taken altogether, our results indicate that several regulatory mechanisms might be involved by MDSCs to block the immune response in DLBCL patients.

Here, we demonstrated that M-MDSCs are the predominant MDSC subset and are associated with a poor prognosis in DLBCL. Our study may also point out the potential interest of MDSCs as targets in future therapeutic trials on DLBCL patients. Controlling the expansion and accumulation of MDSCs or blocking their suppressive functions, for instance by CSF-R1 targeting⁶², may represent promising approaches in cancer therapy.

Acknowledgments

This work was supported by a research grant from the National Institute of Cancer (INCa Recherche Translationnelle 2010), and by the Groupe Ouest-Est des Leucémies et des Autres Maladies du Sang (GOELAMS) and the LYSA group. MR is a recipient of a fellowship from the Nuovo-Soldati Foundation. We are thankful for the clinicians of the BREHAT network and to the French Blood Bank (EFS) of Rennes for providing samples. The authors acknowledge the Centre de Ressources Biologiques (CRB-santé) of Rennes (BB-0033-00056, <http://www.crbsante-rennes.com>) for managing samples. Affymetrix microarrays were processed in the Microarray Core Facility of the Institute of Research on Biotherapy, CHRU-INSERM-UM1 Montpellier, <http://irb.chu-montpellier.fr/>. We are grateful to Professor Daniel Olive (INSERM 1068, Marseille, France) for the gift of the neutralizing anti-PD-1.

Authors contributions

IA: designed and performed experiments, analyzed data, and contributed to writing; FU: designed and performed experiments and analyzed data; DR, CP, JD, JLP: analyzed data; TL, RH, SLG, GC, PD, KB, NM: provided samples; KT, TF: raised the funds, designed and supervised research, analyzed data and contributed writing; MR: designed and supervised research, analyzed data, and wrote the paper. All authors revised the manuscript.

Conflict-of interest disclosure

All authors declare no conflicts of interest.

Reference

1. World Health Organization: Classification of Tumor of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: 2008.
2. Vaidya R, Witzig TE. Prognostic factors for diffuse large B-cell lymphoma in the R(X)CHOP era. *Annals of Oncology*. 2014;25(11):2124–2133.
3. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*. 1993;329:987–994.
4. Sehn LH, Gascoyne RD. Diffuse large B-cell lymphoma: optimizing outcome in the context of clinical and biologic heterogeneity. *Blood*. 2015;125(1):22–32.
5. Zhou Z, Sehn LH, Rademaker AW, et al. An enhanced International Prognostic Index (NCCN-IPI) for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the rituximab era. *Blood*. 2014;123(6):837–842.
6. Rossille D, Gressier M, Damotte D, et al. High level of soluble programmed cell death ligand 1 in blood impacts overall survival in aggressive diffuse large B-Cell lymphoma: results from a French multicenter clinical trial. *Leukemia*. 2014;28(12):2367–2375.
7. Charbonneau B, Maurer MJ, Ansell SM, et al. Pretreatment circulating serum cytokines associated with follicular and diffuse large B-cell lymphoma: A clinic-based case-control study. *Cytokine*. 2012;60(3):882–889.
8. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000;403(6769):503–511.
9. Alizadeh AA, Gentles AJ, Alencar AJ, et al. Prediction of survival in diffuse large B-cell lymphoma based on the expression of 2 genes reflecting tumor and microenvironment. *Blood*. 2011;118(5):1350–1358.
10. Horn H, Ziepert M, Becher C, et al. MYC status in concert with BCL2 and BCL6 expression predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2013;121(12):2253–2263.
11. Coutinho R, Clear AJ, Mazzola E, et al. Revisiting the immune microenvironment of diffuse large B-cell lymphoma using a tissue microarray and immunohistochemistry: robust semi-automated analysis reveals CD3 and FoxP3 as potential predictors of response to R-CHOP. *Haematologica*. 2015;100(3):363–369.
12. Keane C, Gill D, Vari F, et al. CD4(+) tumor infiltrating lymphocytes are prognostic and independent of R-IPI in patients with DLBCL receiving R-CHOP chemo-immunotherapy. *Am J Hematol*. 2013;88(4):273–276.
13. Lenz G, Wright G, Dave SS, et al. Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. *N Engl J Med*. 2008;359(22):2313–2323.
14. Riihijarvi S, Fiskvik I, Taskinen M, et al. Prognostic influence of macrophages in patients with diffuse large B-cell lymphoma: a correlative study from a Nordic phase II trial. *Haematologica*. 2015;100(2):238–245.
15. Troppan K, Deutsch A, Gerger A, et al. The derived neutrophil to lymphocyte ratio is an independent prognostic factor in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *British Journal of Cancer*. 2014;110(2):369–374.
16. Wilcox RA, Ristow K, Habermann TM, et al. The absolute monocyte and lymphocyte prognostic score predicts survival and identifies high-risk patients in diffuse large-B-cell lymphoma. *Leukemia*. 2011;1–8.
17. Tadmor T, Bari A, Sacchi S, et al. Monocyte count at diagnosis is a prognostic parameter in diffuse large B-cell lymphoma: results from a large multicenter

- study involving 1191 patients in the pre- and post-rituximab era. *Haematologica*. 2014;99(1):125–130.
18. Solito S, Marigo I, Pinton L, et al. Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity in human cancers. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2014;1319(1):47–65.
 19. Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(3):162–174.
 20. Parker KH, Beury DW, Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-Derived Suppressor Cells: Critical Cells Driving Immune Suppression in the Tumor Microenvironment. *Advances in Cancer Research*; 2015.
 21. Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(4):253–268.
 22. Greten TF, Manns MP, Korangy F. Myeloid derived suppressor cells in human diseases. *Int Immunopharmacol.* 2011;11(7):802–807.
 23. Youn J-I, Kumar V, Collazo M, et al. Epigenetic silencing of retinoblastoma gene regulates pathologic differentiation of myeloid cells in cancer. *Nature Immunology.* 2013;14(3):211–220.
 24. Haverkamp JM, Smith AM, Weinlich R, et al. Myeloid-derived suppressor activity is mediated by monocytic lineages maintained by continuous inhibition of extrinsic and intrinsic death pathways. *Immunity.* 2014;41(6):947–959.
 25. Görgün GT, Whitehill G, Anderson JL, et al. Tumor-promoting immune-suppressive myeloid-derived suppressor cells in the multiple myeloma microenvironment in humans. *Blood.* 2013;121(15):2975–2987.
 26. Wilcox RA, Feldman AL, Wada DA, et al. B7-H1 (PD-L1, CD274) suppresses host immunity in T-cell lymphoproliferative disorders. *Blood.* 2009;114(10):2149–2158.
 27. Jitschin R, Braun M, Büttner M, et al. CLL-cells induce IDOhi CD14+HLA-DRlo myeloid-derived suppressor cells that inhibit T-cell responses and promote TRegs. *Blood.* 2014;124(5):750–760.
 28. Tadmor T, Fell R, Polliack A, Attias D. Absolute monocytosis at diagnosis correlates with survival in diffuse large B-cell lymphoma-possible link with monocytic myeloid-derived suppressor cells. *Hematol Oncol.* 2013;31(2):65–71.
 29. Lin Y, Gustafson MP, Bulur PA, et al. Immunosuppressive CD14+HLA-DRlow/-monocytes in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2011;117(3):872–881.
 30. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005;102(43):15545–15550.
 31. Roussel M, Benard C, Ly-Sunnaram B, Fest T. Refining the white blood cell differential: the first flow cytometry routine application. *Cytometry A.* 2010;77(6):552–563.
 32. Tattevin P, Monnier D, Tribut O, et al. Enhanced indoleamine 2,3-dioxygenase activity in patients with severe sepsis and septic shock. *J. Infect. Dis.* 2010;201(6):956–966.
 33. Thibult M-L, Mamessier E, Gertner-Dardenne J, et al. PD-1 is a novel regulator of human B-cell activation. *Int Immunol.* 2013;25(2):129–137.
 34. Maby-El Hajjami H, Amé-Thomas P, Pangault C, et al. Functional alteration of the lymphoma stromal cell niche by the cytokine context: role of indoleamine-2,3 dioxygenase. *Cancer Research.* 2009;69(7):3228–3237.
 35. Eckert C, Klein N, Kornek M, Lukacs-Kornek V. The complex myeloid network of the liver with diverse functional capacity at steady state and in inflammation.

- Front Immunol.* 2015;6:179.
36. Solito S, Falisi E, Diaz-Montero CM, et al. A human promyelocytic-like population is responsible for the immune suppression mediated by myeloid-derived suppressor cells. *Blood.* 2011;118(8):2254–2265.
 37. Romano A, Parrinello NL, Vetro C, et al. Circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical outcome in Hodgkin Lymphoma patients treated up-front with a risk-adapted strategy. *British Journal of Haematology.* 2015;168(5):689–700.
 38. Brimnes MK, Vangsted AJ, Knudsen LM, et al. Increased level of both CD4+FOXP3+ regulatory T cells and CD14+HLA-DR/low myeloid-derived suppressor cells and decreased level of dendritic cells in patients with multiple myeloma. *Scand J Immunol.* 2010;72(6):540–547.
 39. Giannoni P, Pietra G, Travaini G, et al. Chronic lymphocytic leukemia nurse-like cells express hepatocyte growth factor receptor (c-MET) and indoleamine 2,3-dioxygenase and display features of immunosuppressive type 2 skewed macrophages. *Haematologica.* 2014;99(6):1078–1087.
 40. Gustafson MP, Lin Y, Maas ML, et al. A method for identification and analysis of non-overlapping myeloid immunophenotypes in humans. *PLoS ONE.* 2015;10(3):e0121546.
 41. Sagiv JY, Michaeli J, Assi S, et al. Phenotypic Diversity and Plasticity in Circulating Neutrophil Subpopulations in Cancer. *Cell Rep.* 2015;10(4):562–573.
 42. Liu B, Dhanda A, Hirani S, et al. CD14⁺⁺CD16⁺ Monocytes Are Enriched by Glucocorticoid Treatment and Are Functionally Attenuated in Driving Effector T Cell Responses. *The Journal of Immunology.* 2015;194(11):5150–5160.
 43. Cros J, Cagnard N, Woollard K, et al. Human CD14^{dim} Monocytes Patrol and Sense Nucleic Acids and Viruses via TLR7 and TLR8 Receptors. *Immunity.* 2010;33(3):375–386.
 44. Skrzeczyńska-Moncznik J, Bzowska M, Loseke S, et al. Peripheral blood CD14^{high} CD16⁺ monocytes are main producers of IL-10. *Scand J Immunol.* 2008;67(2):152–159.
 45. Belge KU, Dayyani F, Horelt A, et al. The Proinflammatory CD14⁺CD16⁺DR⁺⁺ Monocytes Are a Major Source of TNF. *The Journal of Immunology.* 2002;168(7):3536–3542.
 46. Huang B, Pan P-Y, Li Q, et al. Gr-1⁺CD115⁺ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Research.* 2006;66(2):1123–1131.
 47. Ghiringhelli F, Puig PE, Roux S, et al. Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell proliferation. *J Exp Med.* 2005;202(7):919–929.
 48. Filipazzi P, Valenti R, Huber V, et al. Identification of a New Subset of Myeloid Suppressor Cells in Peripheral Blood of Melanoma Patients With Modulation by a Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulation Factor-Based Antitumor Vaccine. *J Clin Oncol.* 2007;25(18):2546–2553.
 49. Chikamatsu K, Sakakura K, Toyoda M, et al. Immunosuppressive activity of CD14⁺ HLA-DR⁻ cells in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Sci.* 2012;103(6):976–983.
 50. Gupta M, Han JJ, Stenson M, et al. Elevated serum IL-10 levels in diffuse large B-cell lymphoma: a mechanism of aberrant JAK2 activation. *Blood.* 2012;119(12):2844–2853.

51. Nguyen LT, Ohashi PS. Clinical blockade of PD1 and LAG3 —potential mechanisms of action. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(1):45–56.
52. Zhao F, Hoechst B, Duffy A, et al. S100A9 a new marker for monocytic human myeloid-derived suppressor cells. *Immunology*. 2012;136(2):176–183.
53. Höchst B, Schildberg FA, Sauerborn P, et al. Activated human hepatic stellate cells induce myeloid derived suppressor cells from peripheral blood monocytes in a CD44-dependent fashion. *J. Hepatol*. 2013;59(3):528–535.
54. Bresnick AR, Weber DJ, Zimmer DB. S100 proteins in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2015;15(2):96–109.
55. Meijer B, Gearry RB, Day AS. The Role of S100A12 as a Systemic Marker of Inflammation. *International Journal of Inflammation*. 2012;2012(2):1–6.
56. Lim SY, Raftery MJ, Goyette J, Hsu K, Geczy CL. Oxidative modifications of S100 proteins: functional regulation by redox. *Journal of Leukocyte Biology*. 2009;86(3):577–587.
57. Ostrand-Rosenberg S, Sinha P. Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *J Immunol*. 2009;182(8):4499–4506.
58. Meyer C, Sevko A, Ramacher M, et al. Chronic inflammation promotes myeloid-derived suppressor cell activation blocking antitumor immunity in transgenic mouse melanoma model. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108(41):17111–17116.
59. Gros A, Turcotte S, Wunderlich JR, et al. Myeloid Cells Obtained from the Blood but Not from the Tumor Can Suppress T-cell Proliferation in Patients with Melanoma. *Clin Cancer Res*. 2012;18(19):5212–5223.
60. Khaled YS, Ammori BJ, Elkord E. Increased levels of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in peripheral blood and tumour tissue of pancreatic cancer patients. *J Immunol Res*. 2014;2014:879897.
61. Arber DA, George TI. Bone marrow biopsy involvement by non-Hodgkin's lymphoma: frequency of lymphoma types, patterns, blood involvement, and discordance with other sites in 450 specimens. *Am J Surg Pathol*. 2005;29(12):1549–1557.
62. Xu J, Escamilla J, Mok S, et al. CSF1R Signaling Blockade Stanches Tumor-Infiltrating Myeloid Cells and Improves the Efficacy of Radiotherapy in Prostate Cancer. *Cancer Research*. 2013;73(9):2782–2794.

Figure Legends

Figure 1. A myeloid transcriptomic signature is detected in blood of DLBCL patients. (A) Hierarchical clustering of 76 DLBCL and 87 HD. After raw data normalization and pre-filtering, 11,302 probesets (PS) were classified by an unsupervised hierarchical clustering. Up- (yellow) and down-regulated (orange) genes lists were separately analyzed by IPA for canonical pathways. (B) Genes were filtered ($p < 0.05$ and $|FC| > 1.5$) before IPA analysis. The top 20 significant pathways are shown for both gene lists. (C) GSEA plot in the studied cohort for a list of gene involved in MDSCs (see Supplemental Table 1). Genes were ranked by signal to noise ratio.

Figure 2. MDSC-like subsets accumulate in peripheral blood of DLBCL patients but only monocytic subsets correlate with the clinical status of DLBCL patients. (A) Neutrophils, immature granulocytes (Imm Gran), monocytes as determined on a complete blood count, and WBC counts are shown for 45 healthy donors (HD) and 56 DLBCLs. Box and Whisker plots with the 10-90 percentiles and the outliers are shown. (B) DLBCL patients were separated in low- (LR, $n=16$) or high-risk (HR, $n=34$) group based on the aalPI score (< 3 and ≥ 3 , respectively). Lymphocyte to monocyte (LMR) and neutrophil to lymphocyte (NLR) ratio are shown. (C) Left: G-MDSC and M-MDSC counts were performed in 23 HDs and 31 DLBCLs. Right: Correlation (Spearman) between G-MDSC and imm Gran, and between M-MDSC and monocytes. (D) For 29 DLBCL samples, clinical information was available. Top: Patients were separated in a low- (LR, $n=12$) or high-risk (HR, $n=17$) group based on the aalPI score (< 3 and ≥ 3 , respectively). M-MDSCs are shown for these groups. Bottom: Patients were split up between high- ($n=14$) and low- ($n=15$) count of M-MDSC (with a threshold at the mean count) and the event-free survival probability was calculated for both groups with a log-rank test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figure 3. M-MDSCs are immunosuppressive in DLBCL. (A) Left: T-cell count. Right: ratio of $CD3\zeta$ to $CD3\gamma$ mRNA evaluated by RT-qPCR (TLDA). Box and Whisker plots with the 10-90 percentiles and the outliers are shown. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. (B) Activated CFSE-labeled T lymphocytes were cultured in presence

(PBMC) or absence (PBMC - CD14^{pos}) of autologous monocyte isolated from DLBCL patients and HDs. Left: Proliferation analysis of CFSE-labelled T cells proliferation, representative of one DLBCL patient. Right: proliferation index for CD4^{pos} (top) and CD8^{pos} (bottom) cells in presence (PBMC) of autologous monocyte or after monocyte depletion (PBMC - monocyte) are represented on Box and Whisker plots with the 10-90 percentiles and the outliers (n=10 DLBCL and n=8 HD). ns: non significant * p<0.05.

Figure 4. Arginase 1 and IDO are not M-MDSCs mechanisms of immunosuppression in DLBCL. (A) Expression of *ARG1*, *IDO1*, *NOS2*, *HO-1* and *PTGS2* was evaluated by TLDA on 17 DLBCLs and 15 HDs. The relative gene expression (mRNA) of PBMC from DLBCL and HD was compared (ratio of the mean expression on DLBCL to the mean expression on HD). (B) Arginase 1 and IDO activities were evaluated by HPLC with the ratio ornithine to arginine and kynurenine to tryptophan, respectively (n=31 DLBCL and 21 HD). (C) Arginase 1 in plasma was evaluated by ELISA (n=43 DLBCL and 33 HD). * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001. (D) Percentage of increase or decrease in T-cell proliferation (proliferation index) between treated (L-1MT or nor-NOHA) and untreated cells, evaluated for CD4^{pos} and CD8^{pos} cells by CFSE labeling (n=8 DLBCL for L-1MT and n=7 for nor-NOHA). DLBCL patients were classified into groups without (Gr.1, n=5) or with (Gr.2, n=2 or 3) suppressive monocytes. The classification was based on suppressive assay or a number of CD14^{pos}HLADR^{low} at more than 3 fold the mean. (E) Correlation of plasma arginase 1 and M-MDSC count (left) or immature granulocytes (Imm gran) count (right) in DLBCL peripheral blood (n=36 DLBCL).

Figure 5. In DLBCL, IL-10, PD-L1 and S100A9/12 are expressed by monocytes. (A) Correlation of the regulatory T cells (T_{reg}) and M-MDSC (CD14^{pos}DR^{low}) counts in DLBCL peripheral blood (n=17). (B) Expression of the immunomodulatory genes *IL10*, *TGFβ1*, *CD274*, *S100A8*, *S100A9*, *S100A12* one patients whole blood, evaluated by TLDA. The relative gene expression (mRNA) of PBMC from DLBCL and HD was compared (ratio of the mean expression on DLBCL to the mean expression on HD) (n=17 DLBCL and 15 HD). (C) Mean fluorescence intensity (MFI) of PD-L1 on monocytes surface by flow cytometry (n=20 DLBCL and 10 HD). (D) Cytokines detection by ELISA in HD (n=8) and DLBCL plasma: IL10 (n=45), TGF-β

(n=14), S100A8/9 (n=14), S100A12 (n=14). (E) Cytokines (IL10 and S100A12) detection by ELISA in supernatants of PBMC not depleted (+) or depleted (-) for CD14^{pos} cells (n=13 DLBCL). * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

Figure 6. IL-10, PDL-1 and S100A12 are involved in M-MDSC suppressive activity in DLBCL. DLBCL patients were classified into groups without (Gr.1, n=5) or with (Gr.2, n=4) suppressive monocytes based on suppressive assay or a number of CD14^{pos}HLADR^{low} at more than 3 fold the mean. The percentage of increase or decrease in T-cell proliferation (proliferating index) between cells treated by blocking antibodies (anti -IL-10, -PD-1 and -S100A12) and an irrelevant antibody is shown for CD4^{pos} and CD8^{pos} cells. * p<0.05.

Table 1: Patients characteristics of the BMS-LyTRANS cohort

BMS-LyTRANS cohort (n=56)	
Average age, years	54.4
Male, n (%)	30 (53.6)
Female, n (%)	26 (46.4)
IPI, n (%)	
0 to 1	19 (33.9)
2	11 (19.6)
3	19 (33.9)
4 to 5	7 (12.5)
Cell of origin, n (%)	
GCB	13 (59)*
Non-GCB	9 (41)*
Unknown	34

*: percentage among cases with results

Supplemental Figure Legends

Supplemental Figure 1. Gating strategy for MDSCs numeration.

Peripheral blood from healthy donors or DLBCL patients were stained *i)* with lin 1 (lineage1, CD3/CD14/CD19/CD20/CD56), HLA-DR, CD33, CD11b and CD123 (top) for G-MDSC and *ii)* with CD3, CD335, CD115, CD14 and HLA-DR (bottom) for M-MDSC. After red blood cells lysis, counting beads were added before flow cytometry analysis. The gating strategy employed is shown for a representative sample. For G-MDSC counting, Lin1^{neg}HLA-DR^{neg/low} cells were gated on WBC (defined on CD45 expression), then basophils (CD123^{pos}) were excluded. Within the remaining cell, G-MDSCs expressed both CD33 and CD11b and are colored in red on a CD45/SSC (side scatter) biaxial plot. For M-MDSC counting, a PBMC gate was drawn on a CD45/SSC biaxial plot, then T and NK cells were excluded using CD3 and CD335, finally monocytes (CD115^{pos}) were selected. Within this population the fraction of M-MDSCs expressed CD14^{pos} and HLA-DR^{low}. HLA-DR^{low} threshold was defined on a cohort of healthy donors.

Supplemental Figure 2. Dendritic cells are decreased in DLBCL peripheral blood.

pDC (Lin^{neg}HLA-DR^{pos}CD123^{pos}CD141^{neg}CD1c^{neg}), cDC type 1 (Lin^{neg}HLA-DR^{pos}CD123^{neg}CD141^{pos}CD1c^{neg}) and cDC type 2 (Lin^{neg}HLA-DR^{pos}CD123^{neg}CD141^{neg}CD1c^{pos}) counts were performed on 21 HD and 33 DLBCL. * p<0.05, *** p<0.001.

Supplemental Table 1. Gene list for the GSEA

Gene
ARG1
NOS2
AGER
IL4R
CSF1R
CD163
FLT1
MMP9
ADAM17
LGALS9
LGALS3
NLRP1
IDO1
PTGS2
S100A8
S100A9
S100A12
IL4
IL6
IL10
TGFB1
SLPI
FUT4
ELA2
MMP8
AIM2
HO-1
CD274
NCF1
CYBB
CD80
TNFRSF1B
TGFB1
CCR2
FKBP5
CSF2
ADORA2B
IL8
TFNAIP6
CD33
CD34
CD31
CD13
CD14
ITGAM
FUT4
CAECAM8
CEBPB
SLC7A2
SLC7A11
SLC3A2
PTGER4
CX3CR1
CXCR4
IL13
MPO
ITGA4
SELPLG
ICAM1
TFRC
SELL
CXCL1
CXCL5
CXCL12
HIF1A
STAT3
STAT1
STAT6
MYD88

Supplemental Table 2. Antibodies used in this study

Cell isolation	Panel	Antigen	Fluorochrome	Company
Whole Blood	DC / G-MDSC	Lin1	FITC	BD Biosciences
		CD141	PE	Miltenyi Biotech
		HLA-DR	ECD	Beckman Coulter
		CD123	PC5.5	Beckman Coulter
		CD11b	PC7	Beckman Coulter
		CD1c	APC	Miltenyi Biotech
		CD33	APC-Alexa750	Beckman Coulter
		CD34	Vioblu	Miltenyi Biotech
		CD45	Krome Orange	Beckman Coulter
	Monocyte / M-MDSC	PDL-1	FITC	BD Biosciences
		HLA-DR	PE-CF594	BD Biosciences
		CD115	PerCp5.5	BD Biosciences
		CD14	PC7	Beckman Coulter
		CD16	APC-Alexa700	Beckman Coulter
		CD3	V450	BD Biosciences
CD335		BV421	Biologend	
CD45		Krome Orange	Beckman Coulter	
PBMC	T_{reg}	CD25	PE	BD Biosciences
		CD4	ECD	Beckman Coulter
		CD127	AlexaFluor674	BD Biosciences
		CD3	PC7	Beckman Coulter
		FOXP3	AlexaFluor488	BD Biosciences
		IgG1	PE	BD Biosciences
	Tumor circulating B-cells	IgG1	AlexaFluor488	BD Biosciences
		Kappa	FITC	DAKO
		Lambda	PE	DAKO
		CD44	APC	BD Biosciences
		CD20	Pacific Blue	Beckman Coulter
		CD19	PC7	Beckman Coulter
		CD10	APC-Alexa700	Beckman Coulter
		CD38	PC5.5	Beckman Coulter
		CD45	Krome Orange	Beckman Coulter

Figure 1

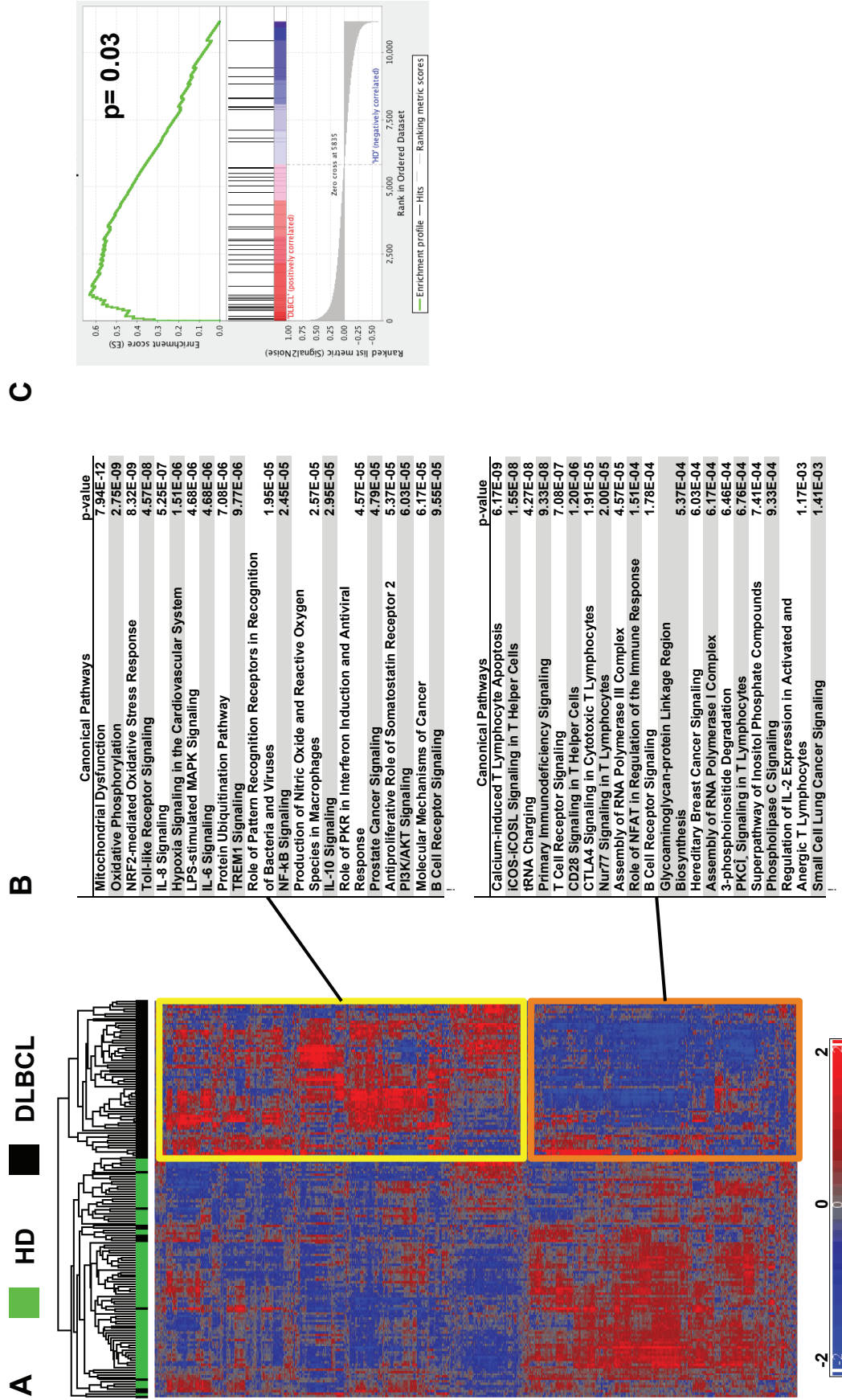


Figure 2

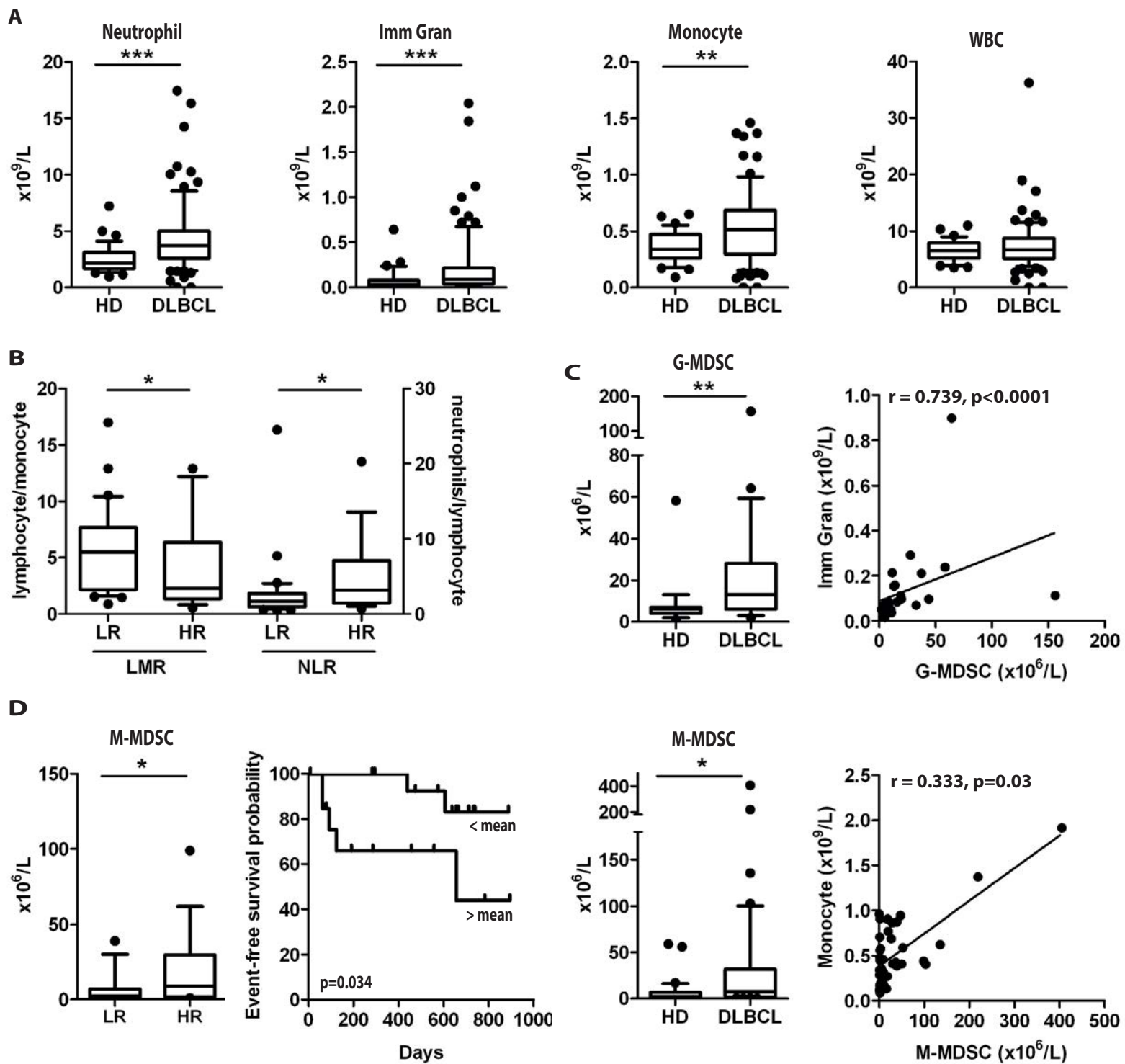


Figure 3

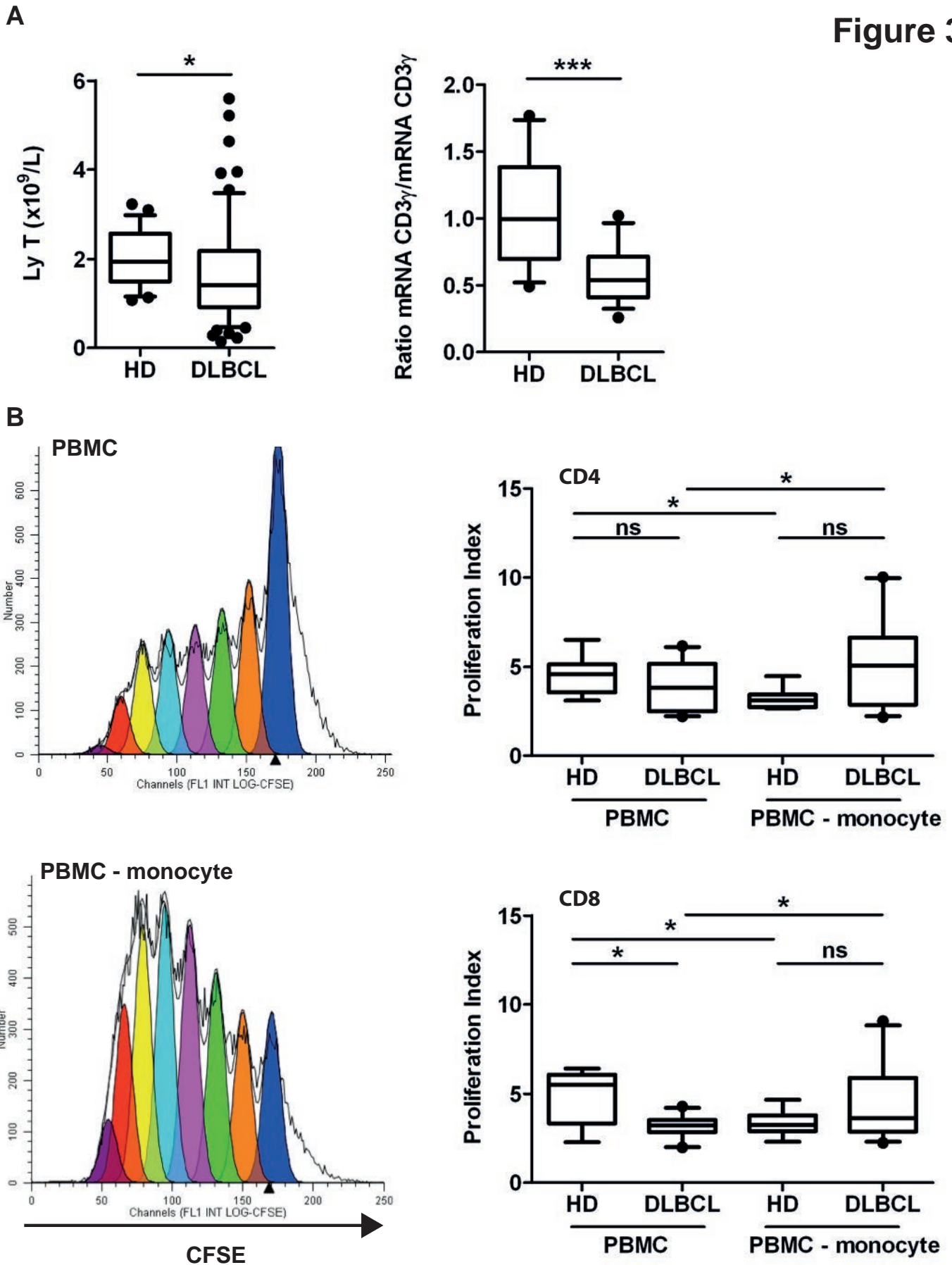


Figure 4

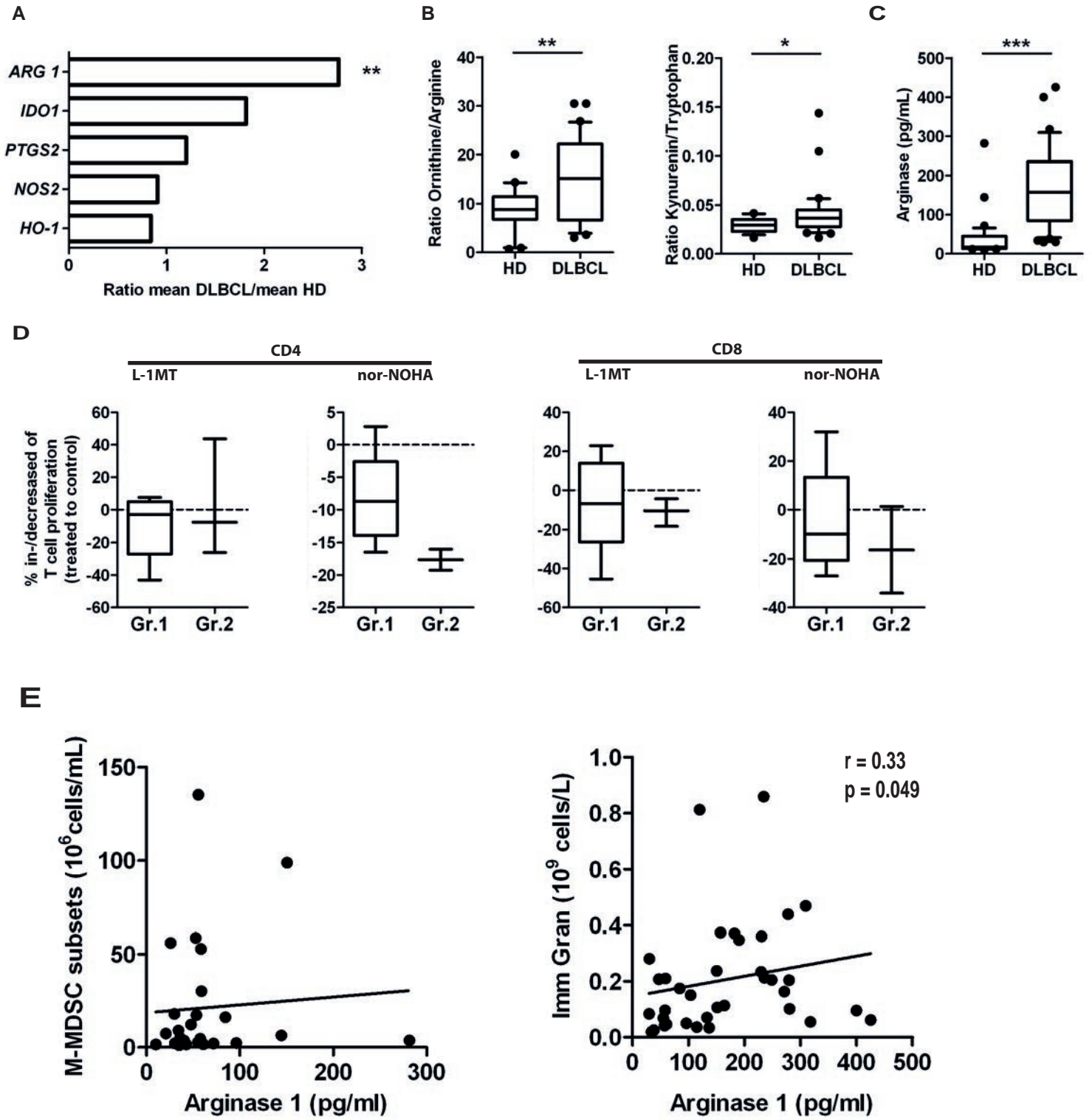


Figure 5

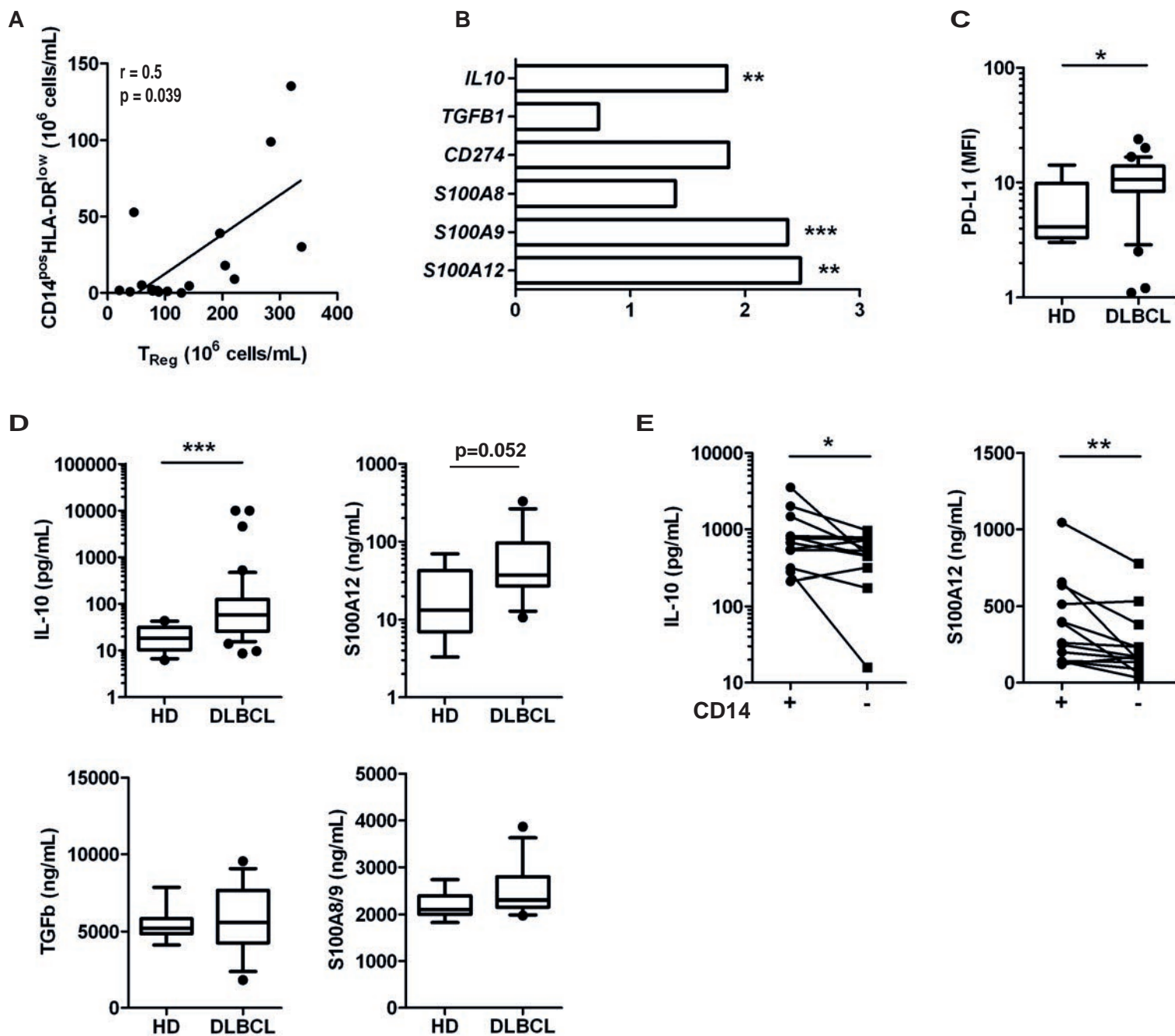
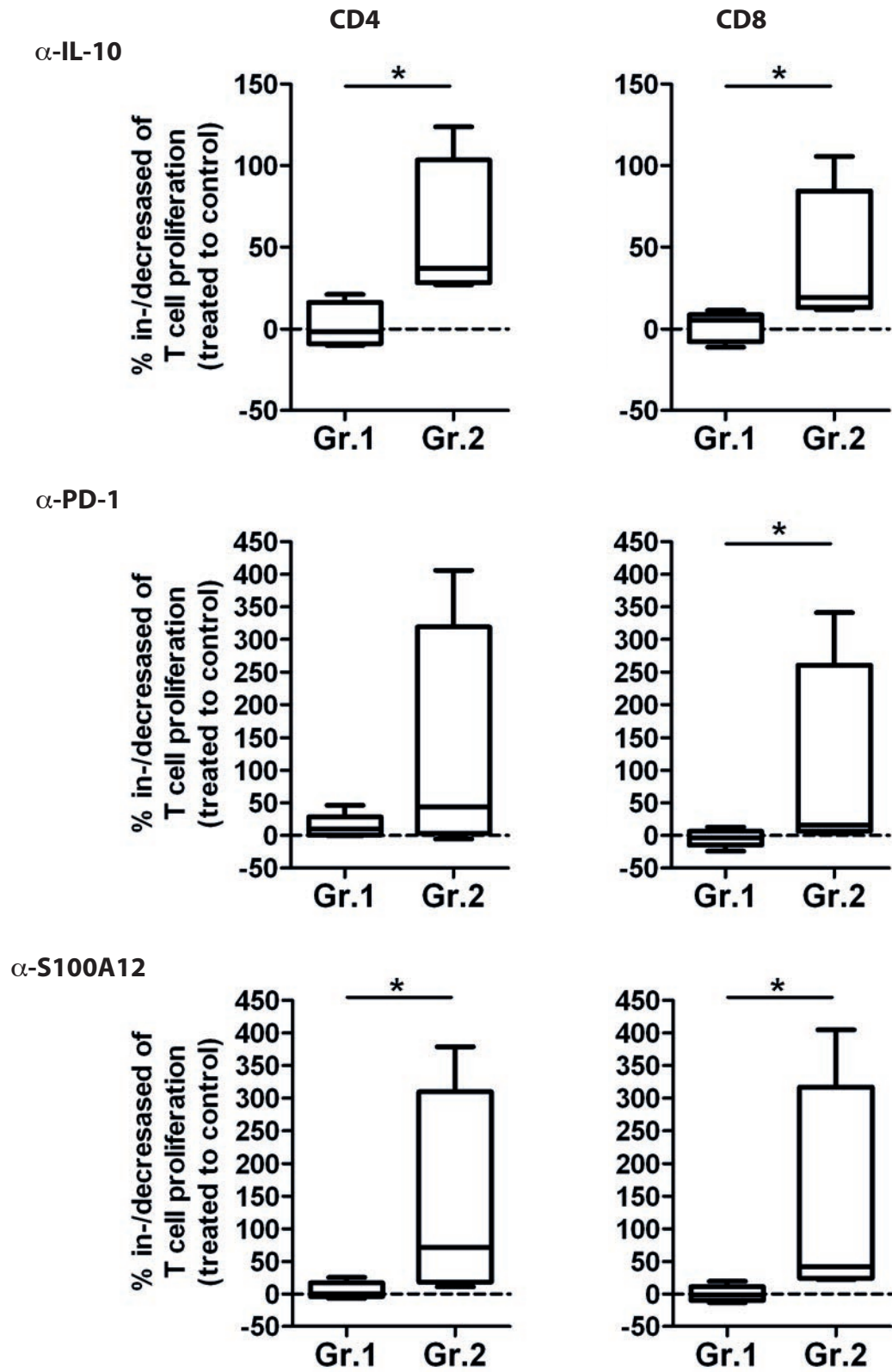
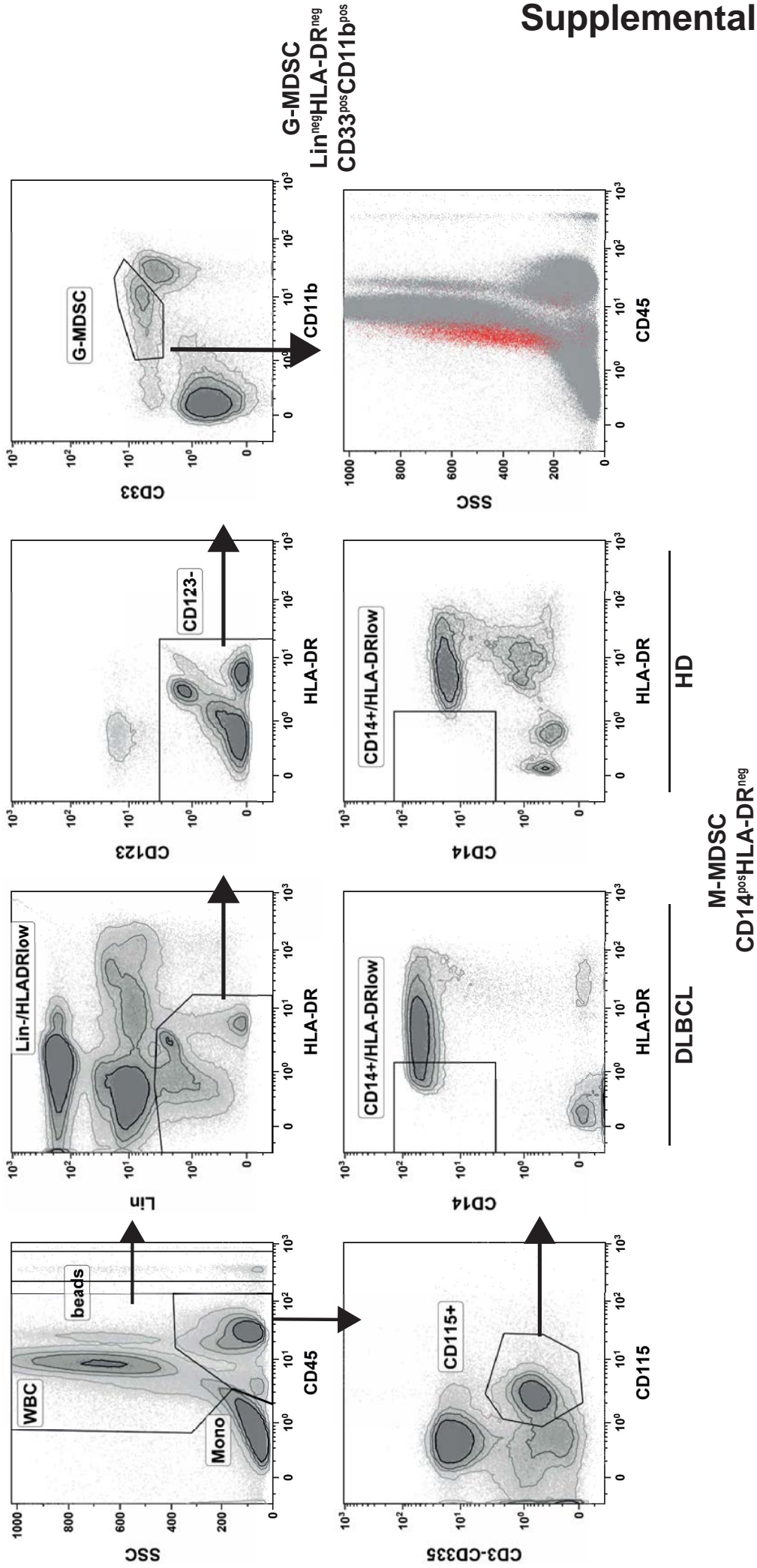


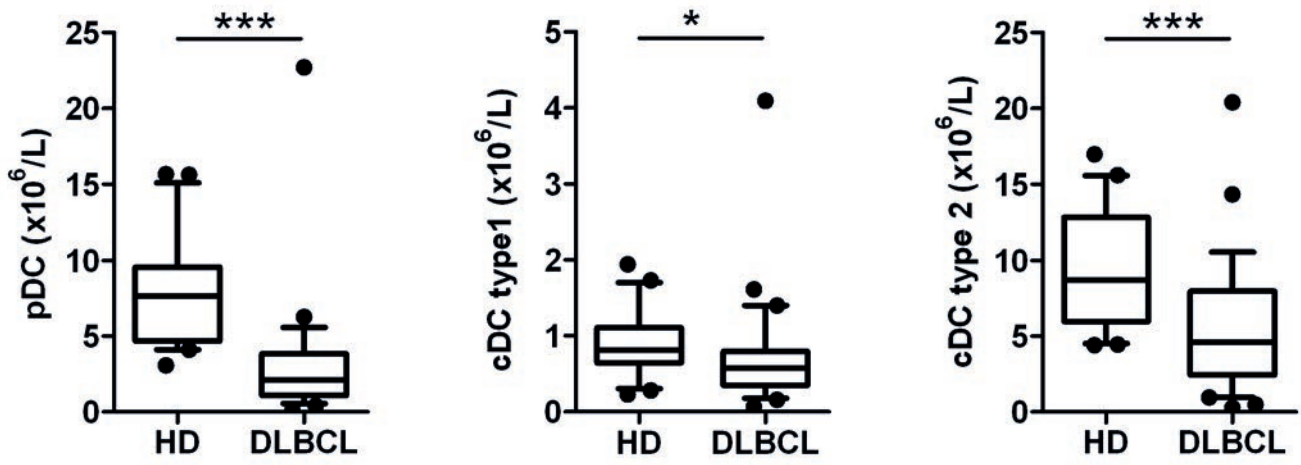
Figure 6



Supplemental Figure 1



Supplemental Figure 2



Article 5. Dysfonction immunitaire après chirurgie cardiaque avec circulation extracorporelle : Effets bénéfiques du maintien de la ventilation mécanique

Immune Dysfunction After Cardiac Surgery with Cardiopulmonary Bypass: Beneficial effects of maintaining mechanical ventilation

Baptiste Gaudriot*, Fabrice Uhel*, Murielle Grégoire, Arnaud Gacouin, Sebastien Biedermann, Antoine Roisne, Erwan Flecher, Yves Le Tulzo, Karin Tarte, and Jean-Marc Tadié

Shock. 2015 Sep;44(3):228-33

Ce travail, présente les résultats de l'étude de l'effet du maintien de la ventilation mécanique sur la dysfonction immunitaire induite par la chirurgie cardiaque avec circulation extracorporelle (CEC). Il constitue une extension de l'étude des dysfonctions immunitaires à un contexte d'agression non-infectieuse.

Nous avons pu montrer que la chirurgie cardiaque induisait une réponse immunitaire caractérisée par une augmentation des concentrations plasmatiques de TNF- α , ainsi que des signes d'immunodépression, à savoir une lymphopénie, une augmentation des concentrations plasmatiques d'IL-10 et une diminution de l'expression monocytaire d'HLA-DR. Le maintien de la ventilation mécanique permettait de diminuer les taux plasmatiques post-opératoires de TNF- α et d'IL-10 et de limiter la lymphopénie, mais n'avait en revanche pas d'impact sur le compartiment myéloïde.

Nous avons ainsi pu montrer que le maintien de la ventilation mécanique au cours de la chirurgie cardiaque sous CEC pourrait permettre de diminuer la défaillance immunitaire post-opératoire.

IMMUNE DYSFUNCTION AFTER CARDIAC SURGERY WITH CARDIOPULMONARY BYPASS: BENEFICIAL EFFECTS OF MAINTAINING MECHANICAL VENTILATION

Baptiste Gaudriot,* Fabrice Uhel,^{†‡§} Murielle Gregoire,^{||} Arnaud Gacouin,^{†‡}
Sebastien Biedermann,* Antoine Roisne,* Erwan Flecher,^{||}
Yves Le Tulzo,^{†‡§} Karin Tarte,^{§||} and Jean-Marc Tadié^{†‡§}

*CHU Rennes, Anesthésie-Réanimation; [†]CHU Rennes, Maladies Infectieuses et Réanimation Médicale;
and [‡]Inserm, CIC-1414; [§]Biosit; and ^{||}Inserm, U917, Faculté de Médecine, Université Rennes I;
and ^{||}CHU Rennes, Chirurgie Cardio-thoracique et Vasculaire, Rennes, France

Received 23 Mar 2015; first review completed 8 Apr 2015; accepted in final form 26 May 2015

ABSTRACT—Cardiac surgery with cardiopulmonary bypass (CPB) induces postoperative immunosuppression and impaired pulmonary function. Maintaining mechanical ventilation (MV) during CPB improves pulmonary function and diminishes postoperative systemic inflammation. However, there are no data about the influence of maintaining MV during CPB on postoperative immune dysfunction. **Methods:** Fifty patients were prospectively divided into two groups: without MV during bypass (n = 25) and dead space MV with positive end-expiratory pressure (n = 25). PaO₂ (arterial oxygen tension)/F_IO₂ (inspired oxygen fraction) ratio, CXCL10 (C-X-C motif chemokine 10), CCL2 (chemokine ligand 2), tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin 10 (IL-10), human leukocyte antigen-DR antigen (HLA-DR), monocytic myeloid-derived suppressor cells (Mo-MDSCs, CD14⁺HLA-DR^{lo/-} monocytes), and blood cell count were collected before and after surgery. **Results:** Cardiopulmonary bypass induced a marked immunosuppression with a significant increase in plasmatic levels of TNF- α and IL-10 and a significant decrease in HLA-DR monocytic expression. The postoperative proportion of Mo-MDSCs was subsequently significantly increased. Maintaining MV during CPB significantly improved PaO₂/F_IO₂ ratio and decreased postoperative plasmatic levels of TNF- α and IL-10 compared with patients without MV during CPB. Furthermore, nonventilated patients had a lower lymphocyte count after surgery compared with patients with MV during CPB. **Conclusion:** Our study suggests that maintaining MV during CPB for cardiac surgery decreases postoperative immune dysfunction and could be an interesting strategy to diminish the occurrence of postoperative nosocomial infection without hampering the surgical procedure. However, these findings have to be confirmed in a clinical trial using the incidence of nosocomial infection as an endpoint.

KEYWORDS—Cardiac surgery, cardiopulmonary bypass, immune dysfunction, mechanical ventilation, myeloid derived suppressor cells

INTRODUCTION

Cardiopulmonary bypass (CPB) during cardiac surgery induces a systemic inflammatory response associated with an immune dysregulation and a significant pulmonary dysfunction (1–5). These two phenomena have been well characterized. First, the inflammatory response, usually attributed to surgical trauma, contact of blood with artificial surfaces, and ischemia-reperfusion injury, is responsible for a postoperative immunodepression. Mekontso et al. (3) have shown that bactericidal activity of polymorphonuclear neutrophils (PMNs) against *Staphylococcus aureus* was decreased after cardiac surgery. In a prospective study, Chalk et al. (6) have also reported a dysfunction of pulmonary macrophages after CPB. In particular, they have described an early impairment of lung cellular immune response, which could promote the development of postoperative pneumonia. Along these lines, a downregulation of human leukocyte antigen-DR antigen (HLA-DR) expression on monocytes and an increase in plasma interleukin 10 (IL-10)

associated with the occurrence of nosocomial infections have been reported (4, 6, 7). Second, CPB induces a pulmonary dysfunction, which ranges from a temporary and clinically insignificant reduction in arterial oxygenation to a life-threatening injury manifested as acute respiratory distress syndrome (ARDS). This phenomenon is of multifactorial sources, but one of the main mechanisms is the occurrence of atelectasis during surgery (8–15). Atelectasis has been associated with lung injury and release of cytokines (tumor necrosis factor α [TNF- α]) by shear forces on alveoli and small airways (12–15). However, it is not clear whether this injury is due to a recruitment/derecruitment phenomenon (i.e., atelectrauma) or whether it might by itself lead to the release of cytokines (15–17). Nevertheless, addition of a positive end-expiratory pressure (PEEP) during CPB for cardiac surgery diminished the occurrence of atelectasis and the postoperative inflammatory response without hampering the surgical progress (10–12).

Because maintaining mechanical ventilation (MV) with PEEP during CPB diminishes postoperative inflammation, a relationship between pulmonary dysfunction and postoperative immunosuppression should be investigated. We thus conducted a prospective study to investigate the effects of maintaining lung ventilation during CPB in patients undergoing cardiac surgery on postoperative immune dysfunction using IL-10 and HLA-DR as major endpoints. We also investigated the CD14⁺HLA-DR^{lo/-} monocytes, which have been described as immunosuppressive

Address reprint requests to Jean-Marc Tadié, MD, PhD, Service des Maladies Infectieuses et Réanimation Médicale, Hôpital Pontchaillou, 2 rue Henri Le Guilloux, 35033 Rennes Cedex 9, France. E-mail: jeanmarc.tadie@chu-rennes.fr.

B.G. and F.U. equally contributed to this work.

This work was supported by a Fondation de l'Avenir grant (Recherche médicale appliquée).

DOI: 10.1097/SHK.0000000000000416

Copyright © 2015 by the Shock Society

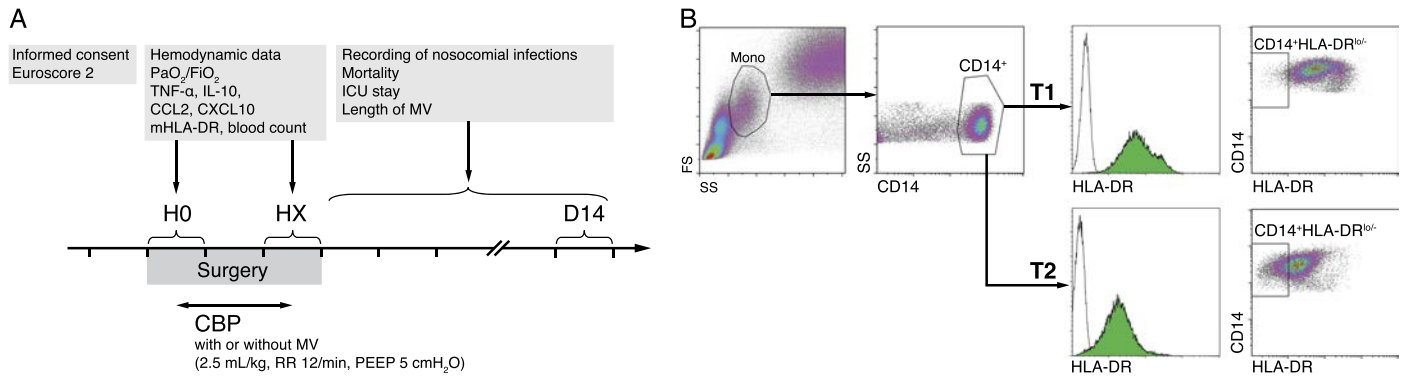


FIG. 1. **Design of the study and gating strategy for HLA-DR monocytic expression measurement.** A, Design of the study. B, Following an initial FS/SS discrimination of the monocytic subset, CD14⁺ monocytes were gated, and HLA-DR MFI was measured before (T1) and after CPB (T2). Selected areas represent mean channel fluorescence for FITC anti-HLA-DR. Unfilled histograms are isotype control results from the same sample. As Mo-MDSCs in humans were previously described as CD14⁺HLA-DR^{lo/-} monocytes, we also quantified the proportion of this subset among CD14⁺ monocytes. FS indicates forward scatter; mHLA-DR, monocytic expression of HLA-DR; R, respiratory rate; SS, side scatter.

monocytic myeloid-derived suppressor cells (Mo-MDSCs) in humans (18–20), before and after CPB.

MATERIALS AND METHODS

Patient population

All patients were older than 18 years and were scheduled for cardiac surgery using CPB (valve replacement and/or coronary artery bypass grafting [CABG]).

Exclusion criteria were as follows: systemic steroid therapy, chronic lung diseases (including chronic obstructive or restrictive pulmonary diseases), left ventricular dysfunction (left ventricular ejection fraction <50%), and the need for vasopressor or inotropic agents before surgery.

Anesthesia, CPB, and surgical procedure

General anesthesia was induced with propofol and sufentanil 0.3 µg/kg and was followed by cisatracurium 0.15 mg/kg for muscular relaxation. Anesthesia, muscle relaxation, and analgesia were respectively maintained with inhaled sevoflurane during off-pump surgery or propofol infusion during CPB and boluses of atracurium and sufentanil. For baseline ventilation, the patients received volume-controlled ventilation with a tidal volume of 8 mL/kg of predicted body weight and a ventilatory frequency of 10 to 15 per minute (end-tidal carbon dioxide between 34 and 38 mmHg). Inspired oxygen fraction (FiO₂) was 0.50, inhalation-to-exhalation ratio was 1:2, and the level of PEEP was 5 cmH₂O.

During CPB, two settings were used depending on the surgeon in charge: (i) absence of MV (and no PEEP) by disconnecting the tracheal tube from the ventilator (MV⁻ group) and (ii) dead space ventilation using tidal volume of 2.5 mL/kg (predicted body weight) with 5 cmH₂O PEEP (MV⁺ group). After CPB, ventilatory parameters were turned back to baseline settings, and no recruitment maneuvers were performed before oxygenation determination. Ratio of arterial oxygen tension (PaO₂) to FiO₂ was obtained before surgery (after induction of anesthesia) and 3 h after the end of CPB in the surgical intensive care unit (ICU; under baseline MV settings). We took advantage of the different ventilatory settings that are commonly used by the surgeon and the anesthetist in charge; consequently, the patients were not randomized in the different ventilatory settings for the purpose of this study. The study was approved by our local ethics committee. Patients were informed of the observational nature of the study and gave their consent. The design of the study is summarized in Figure 1A.

Study procedures.—Blood samples treated with heparin were collected for all patients immediately after induction of anesthesia (T1) and within an hour following the end of intervention (T2). The delay between blood sampling and the beginning of laboratory procedures was less than 1 h. Plasma samples were stored at -80°C until use.

Flow cytometry.—The level of HLA-DR expression on monocytes was measured on whole blood using fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-HLA-DR (HLA-DR-FITC; Beckman Coulter, Beckman Coulter, Miami, Fla) with isotype- and fluorophore-matched control to confirm binding specificity, and phycoerythrin-cyanin-7 anti-CD14 antibody (CD14-PC7; Beckman Coulter). Samples were run on a flow cytometer (Navios; Beckman Coulter), and data were analyzed using Kaluza software (Beckman Coulter). Monocytes were characterized on the basis of their CD14 expression (see Fig. 1B for gating strategy).

Enzyme-linked immunosorbent assay.—Tumor necrosis factor α, IL-10, C-X-C motif chemokine 10 (CXCL10), and chemokine ligand 2 (CCL2) were quantified

by DuoSet enzyme-linked immunosorbent assay (R&D Systems, Abingdon, UK) in peripheral blood plasma according to the manufacturer instructions.

Data collection.—The following data were collected: age, body mass index (BMI), central venous pressure (CVP), and mean pulmonary arterial pressure (mPAP) before and after CPB, PaO₂/FiO₂ ratio before and after CPB, type of heart surgery (valvular replacement, CABG, or mixed), surgery duration, and ICU and hospital length of stay. The occurrence of postoperative infections (nosocomial infections) within 14 days was also recorded and defined as previously described (21). Lastly, blood cell count with differential (including lymphocyte, PMN, and monocyte counts) was collected before and after surgery.

Statistical analysis

Quantitative variables were expressed as median and interquartile range (IQR). Differences observed between groups were analyzed using the nonparametric Mann-Whitney *U* test. In each group, differences between pre- (T1) and post-CPB times (T2) were analyzed using the Wilcoxon matched-pairs signed rank test. Correlations between two continuous variables were investigated using the nonparametric Spearman rank correlation test. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 5 (GraphPad Prism Software Inc, San Diego, Calif) at a significance level of *P* < 0.05.

RESULTS

Patients' characteristics

Fifty patients completed the study. The baseline characteristics are given in Table 1. No difference was found between the two groups except for BMI.

Effects of maintaining MV during CPB on pulmonary function

The effects of MV on outcome as well as clinical parameters are summarized in Table 2. Of note, maintaining MV during CPB did not influence procedure duration.

TABLE 1. Baseline characteristics of patients before CPB

	MV ⁻ (n = 25)	MV ⁺ (n = 25)	<i>P</i>
Age, y	75 (65–79)	73 (69–80)	0.79
Surgery			
Valvular replacement	17	8	
CABG	5	9	
Mixed (valvular and CABG)	3	8	
BMI, kg/m ²	26 (23–28)	30 (27–33)	0.007
Euroscore II	2.2 (1.4–2.9)	2.3 (1.4–3.3)	0.6
CVP before CPB, mmHg	7 (6–10)	10 (7–12)	0.15
mPAP before CPB, mmHg	23 (20–24)	19 (11–25)	0.28
PaO ₂ /FiO ₂ ratio before CPB	326 (225–381)	240 (173–320)	0.07

TABLE 2. Effects of MV on outcome and clinical parameters

	MV ⁻ (n = 25)	MV ⁺ (n = 25)	P
CVP after CPB, mmHg	8 (6–11)	11 (8–12)	0.16
mPAP after CPB, mmHg	19 (18–27)	21 (16–24)	0.74
Pao ₂ /Fio ₂ ratio after CPB	276 (199–360)	242 (211–310)	0.34
CPB duration, min	61 (52–76)	54 (48–68)	0.32
Surgery duration, min	170 (148–210)	150 (139–182)	0.3
ICU stay, d	3 (3–6)	3 (3–5)	0.59
Hospital stay, d	10 (4–16)	10 (4–13)	0.52
Postoperative infections	5 (20%)	2 (8%)	0.5

Maintaining MV during CPB significantly improved postoperative Pao₂/Fio₂ ratio (+6% in ventilated patients vs. -15% in nonventilated patients, $P = 0.005$; Fig. 2A). No difference was found between the two groups regarding hemodynamic parameters (CVP and mPAP) before and after CPB (Table 1). Lastly, MV duration, length of stay in ICU, and hospital stay were not different between the two groups.

Plasmatic levels of CXCL10 and CCL2 were significantly increased after cardiac surgery (Fig. 2B). No difference was found between patients with and without MV during CPB (Fig. 2C).

CPB during cardiac surgery decreased HLA-DR expression, increased CD14⁺HLA-DR^{lo/-} monocytes count, and induced IL-10 and TNF- α production

A significant decrease in HLA-DR expression occurred after CPB (mean fluorescence intensity [MFI], 7.3 [IQR, 5.4–9.3]

before vs. 2.8 [IQR, 2.3–3.4] after; $P < 0.001$; Fig. 3A). Cardiopulmonary bypass was subsequently associated with a significant increase in CD14⁺HLA-DR^{lo/-} monocytes (10.3% of CD14⁺ monocytes [IQR, 3.9%–17.4%] before vs. 29.5% [IQR, 20.9%–40.9%] after; $P < 0.0001$). Tumor necrosis factor α and IL-10 levels were higher after surgery (respectively, 45.24 pg/mL [IQR, 43.14–48.47 pg/mL] before vs. 48.47 pg/mL [IQR, 43.14–56.14 pg/mL] after; $P = 0.0183$, and 66.77 pg/mL [IQR, 62.78–72.95 pg/mL] before vs. 114.7 pg/mL [IQR, 86.55–153.9 pg/mL] after; $P < 0.0001$; Fig. 3B). White blood cell counts were also modified after surgery, compared with white blood cells before CPB: we found a significant increase in PMN count (4.42/ μ L [IQR, 3.31–5.22/ μ L] before vs. 8.58/ μ L [IQR, 6.47–12.69/ μ L] after; $P < 0.0001$) and a significant decrease in lymphocyte count (1.69/ μ L [IQR, 1.34–2.205/ μ L] before vs. 1.3/ μ L [IQR, 0.9–1.625/ μ L] after; $P < 0.0001$), whereas monocyte count remained unchanged (0.63/ μ L [IQR, 0.53–0.795/ μ L] before vs. 0.63/ μ L [IQR, 0.39–0.9/ μ L] after; not statistically significant; Fig. 3C). Lastly, there was a significant inverse correlation between postoperative levels of IL-10 and lymphocytes count (Fig. 3D).

Effects of maintaining MV during CPB on immune parameters

Patients ventilated during CPB showed lower levels of TNF- α and IL-10 compared with nonventilated patients (44.2 pg/mL [IQR, 42.1–48.5 pg/mL] and 98.7 pg/mL [IQR, 86.5–129.0 pg/mL] vs. 53.5 pg/mL [IQR, 48.4–64.4 pg/mL] and 129.1 pg/mL [IQR, 89.0–198.7 pg/mL], $P < 0.05$ and $P < 0.05$ respectively; Fig. 4A). Furthermore, nonventilated patients had a lower

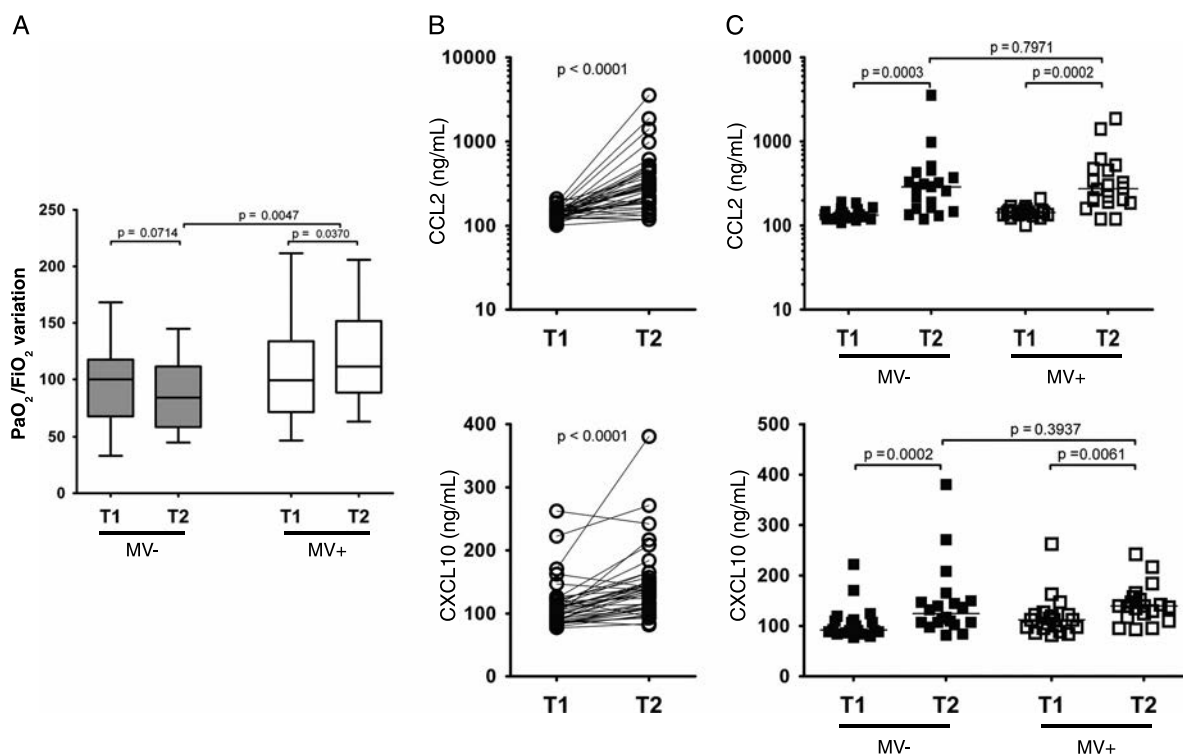


FIG. 2. Effects of maintaining MV during CPB on pulmonary function. A, Variation of Pao₂/Fio₂ ratio between pre- (T1) and post-CPB time (T2) in patients with (MV⁺) and without (MV⁻) MV during CPB. B, Plasma levels of CCL2 and CXCL10 before (T1) and after (T2) CPB. C, Plasma levels of CCL2 and CXCL10 according to maintenance (MV⁺) or not (MV⁻) of MV during CPB. Boxes represent median, 25th, and 75th percentiles. Whiskers represent fifth and 95th percentiles. Bars on dot plots represent medians. P values were obtained using Mann-Whitney U test for comparisons between MV⁺ and MV⁻ groups, and Wilcoxon matched-pairs signed rank test for comparisons between T1 and T2 periods within each group. T1, before CPB; T2, after CPB.

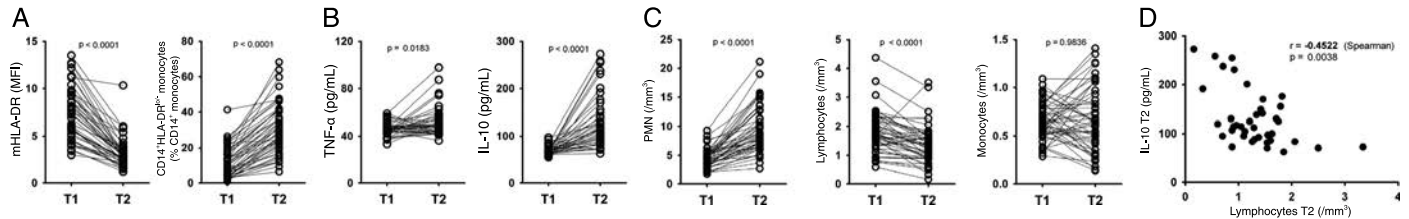


FIG. 3. Immunological effect of CPB during cardiac surgery. A, HLA-DR expression on CD14⁺ monocytes determined by flow cytometry and proportion of CD14⁺HLA-DR^{lo} monocytes among CD14⁺ monocytes, before (T1) and after (T2) CPB. B, Plasma levels of TNF- α and IL-10 before (T1) and after (T2) CPB. C, Number of circulating PMNs, lymphocytes, and monocytes before (T1) and after (T2) CPB. D, Correlation between circulating lymphocyte count and plasma level of IL-10 after CPB (T2). *P* values were obtained using Wilcoxon matched-pairs signed rank test for comparisons between T1 and T2 periods. Correlations were investigated using the nonparametric Spearman rank correlation test. mHLA-DR indicates Monocytic expression of HLA-DR; T1, before CPB; T2, after CPB.

lymphocyte count after surgery compared with patients ventilated during CPB (1.05/ μ L [IQR, 0.88–1.465/ μ L] vs. 1.48/ μ L [IQR, 1.128–1.74/ μ L], respectively, *P* = 0.04; Fig. 4B). Lymphocyte count remained significantly lower 48 h after surgery (0.73/ μ L [IQR, 0.59–1.05/ μ L] vs. 1.36/ μ L [IQR, 0.96–1.47/ μ L], *P* < 0.05; Fig. 4C).

No significant difference was found in HLA-DR downregulation between the two groups (MFI [T2 – T1], –4.3 [IQR, –6.7 to –2.4] in nonventilated patients vs. –3.8 [IQR, –5.0 to –2.8] in ventilated patients; not statistically significant; Fig. 4D). Consequently, CD14⁺HLA-DR^{lo/-} monocytes count was not different between the two groups (32.23% of CD14⁺ monocytes [IQR, 24.23%–40.40%] in nonventilated patients vs. 24.87% [IQR, 15.81%–41.73%] in ventilated patients; *P* = 0.2; Fig. 4E).

DISCUSSION

Our results suggested that maintaining MV during cardiac surgery with CPB could be of interest to decrease postoperative immunosuppression. We found that patients ventilated during CPB had lower postoperative levels of immunosuppressive IL-10 and proinflammatory TNF- α and a higher postoperative lymphocytes count. However, the proportion of CD14⁺HLA-DR^{lo/-} monocytes was not statistically different between both groups. These beneficial effects on postoperative immunosuppression could be related to an enhancement in pulmonary function because maintaining MV during CPB abolished the postoperative decrease in PaO₂/FIO₂ ratio.

First, cardiac surgery with CPB induced postoperative immunosuppression. This effect has been well characterized, and previous studies have demonstrated that HLA-DR expression was significantly decreased, and IL-10 was increased after cardiac surgery (4, 5, 18). The loss of HLA-DR expression on

monocyte, which indicates their functional deactivation, had previously been described after cardiac surgery and sepsis (5), and the persistence of this alteration is associated with severity, nosocomial infection, and death (7, 22). Interleukin 10 is an immunosuppressive cytokine that could be involved in HLA-DR downregulation (23), and an increase in TNF- α has been shown to be counterbalanced by early expression of anti-inflammatory IL-10 (24). Thus, strategies that could decrease postoperative IL-10 levels could be of interest to decrease postoperative infectious complications. In agreement, we found that total lymphocyte count was significantly decreased after cardiac surgery in nonventilated patients compared with patients ventilated during CPB. Lymphopenia has been associated with immune dysfunction during septic shock, and it has been shown that low absolute lymphocyte counts were predictive of postoperative sepsis (25, 26). In a recent retrospective study, Drewry et al. (27) have demonstrated that persistent lymphopenia after sepsis predicted mortality and could be a valuable biomarker of immunosuppression because lymphopenia predicted an increased risk of secondary infection. Lastly, we found an increased number of CD14⁺HLA-DR^{lo/-} monocytes after cardiac surgery. This phenotype is consistent with a Mo-MDSC phenotype. To our knowledge, no study has previously reported this finding. Myeloid-derived suppressor cells comprise a heterogeneous population of immature myeloid cells at different stages of differentiation (19, 20). Although many subtypes of MDSCs have been described in mice and humans, they can be classified into two major subsets: a Mo-MDSC population (CD14⁺HLA-DR^{lo/-}) and a granulocytic MDSC population ([CD3, CD19, CD56, CD14]⁻CD15⁺HLA-DR⁻). Those cells have been shown to be increased in critically ill patients and associated with a poor prognosis (28). This finding raises the question of targeting those cells to reduce immunosuppression after cardiac surgery. However, as

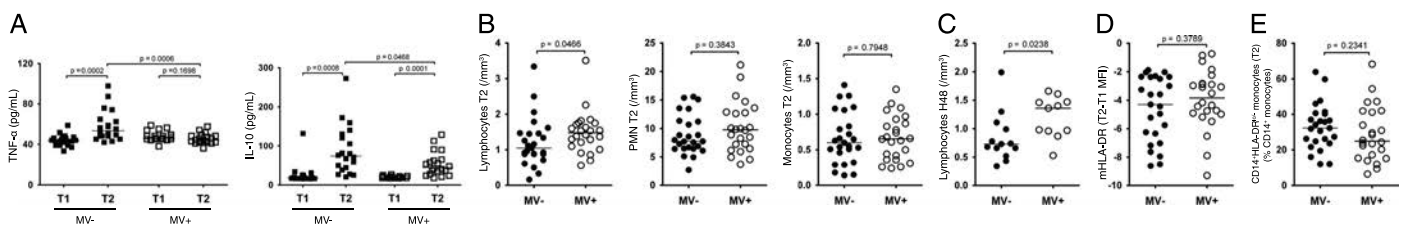


FIG. 4. Immunological effect of maintaining MV during CPB. A, Plasma levels of TNF- α and IL-10; (B) number of circulating PMNs, lymphocytes, and monocytes; (C) number of circulating lymphocytes at day 2; (D) expression of HLA-DR on CD14⁺ monocytes; and (E) percentage of CD14⁺HLA-DR^{lo/-} monocytes according to maintenance (MV⁺) or not (MV⁻) of MV during CPB. Bars on dot plots represent medians. *P* values were obtained using Mann-Whitney *U* test for comparisons between MV⁺ and MV⁻ groups, and Wilcoxon matched-pairs signed rank test for comparisons between T1 and T2 periods within each group. mHLA-DR indicates monocytic expression of HLA-DR; T1, before CPB; T2, after CPB.

the proportion of CD14⁺-HLA-DR^{lo/-} monocytes was not different between both groups, MV does not seem to have any impact on HLA-DR expression.

Because we found significantly lower TNF- α and IL-10 plasma levels, as well as an increased lymphocyte count in ventilated patients compared with nonventilated patients during CPB, we assume that maintaining MV during CPB may decrease both proinflammatory and compensatory anti-inflammatory responses by preventing lung injury and/or atelectasis.

Indeed, we found that maintaining MV during CPB improved postoperative index of oxygenation. This result was expected, and several studies have already demonstrated the beneficial effects of MV with PEEP during cardiac surgery with CPB (10–12). As previously reported, postoperative plasmatic levels of CXCL10 and CCL2 were significantly increased (29). C-X-C motif chemokine 10 is involved in acute lung injury and ARDS and induces neutrophils migration into the lung (30). In particular, a recent study has shown that CXCL10 and its receptor CXCR3 were critical factors for the exacerbation of the pathology of ARDS (31). Chemokine ligand 2 has been shown to be involved in neutrophils recruitment during ARDS. In a mouse model of ARDS, neutralization of this chemokine significantly decreased the severity of lung injury (32). Our ventilation strategy did not have a significant influence on post-CPB increased permeability edema because postoperative levels of CCL2 and CXCL10 were similar in ventilated and nonventilated patients with a similar count of PMN. Thus, we believe that maintaining ventilation during CPB decreases rather the occurrence of post-CPB atelectasis, which has been regarded as a main cause of post-CPB lung injury (13, 14). Furthermore, we found that maintaining MV during CPB significantly decreased postoperative levels of TNF- α . Tumor necrosis factor α is released by a large number of pulmonary cells including alveolar macrophages and epithelial cells including pulmonary cells (alveolar macrophages and pulmonary epithelial cells) and has been considered as a marker of lung injury (15, 33). Occurrence of atelectasis when MV is discontinued during CPB (13, 14, 34) could generate alveolar injury and inflammation in the surrounding lung tissue (16), which could be worsened by MV after CPB (i.e., atelectrauma). Alternatively, hypoxia associated with atelectasis may be injurious and has been associated with an increased wet-to-dry ratio in an animal study (15, 17).

Limitations

This study has several limitations. First, it is an observational study, and the lack of randomization may have induced some bias. We found a difference between two groups with a significantly higher BMI in the ventilated group and a nearly statistically significant difference in baseline PaO₂/FIO₂ ratio. Despite BMI having been described as a risk factor for early onset of severe pulmonary dysfunction after surgery (35), we still found that PaO₂/FIO₂ ratio was improved in ventilated patients. Second, in contrast to murine MDSCs, human MDSCs are not so clearly defined because of the lack of specific markers. Although CD14⁺-HLA-DR^{lo/-} phenotype is consistent with a Mo-MDSC phenotype, *in vitro* studies would be required to confirm the suppressive properties of those cells after CPB (20).

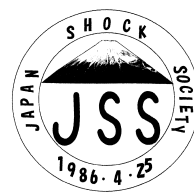
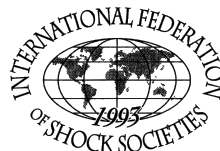
ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Eric Barr for his careful review of the manuscript.

REFERENCES

- Hadley JS, Wang JE, Michaels LC, Dempsey CM, Foster SJ, Thiemermann C, Hinds CJ: Alterations in inflammatory capacity and TLR expression on monocytes and neutrophils after cardiopulmonary bypass. *Shock* 27:466–473, 2007.
- Rankin JS, Oguntolu O, Binford RS, Trochtenberg DS, Muhlbaier LH, Stratton CW: Management of immune dysfunction after adult cardiac surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg* 142:575–580, 2011.
- Mekontso-Dessap A, Honoré S, Kirsch M, Plonquet A, Fernandez E, Touqui L, Farcet JP, Soussy CJ, Loisanse D, Delclaux C: Blood neutrophil bactericidal activity against methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* during cardiac surgery. *Shock* 24:109–113, 2005.
- Tepaske R, Velthuis H, Oudemans-van Straaten HM, Heisterkamp SH, van Deventer SJ, Ince C, Eysman L, Kesecioglu J: Effect of preoperative oral immune-enhancing nutritional supplement on patients at high risk of infection after cardiac surgery: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 358: 696–701, 2001.
- Wilhelm W, Grundmann U, Rensing H, Werth M, Langemeyer J, Stracke C, Dhingra D, Bauer M: Monocyte deactivation in severe human sepsis or following cardiopulmonary bypass. *Shock* 17:354–360, 2002.
- Chalk K, Meisel C, Spies C, Volk T, Thuenemann K, Linneweber J, Wernecke KD, Sander M: Dysfunction of alveolar macrophages after cardiac surgery and postoperative pneumonia? An observational study. *Crit Care* 17:R285, 2013.
- Muehlstedt SG, Lyte M, Rodriguez JL: Increased IL-10 production and HLA-DR suppression in the lungs of injured patients precede the development of nosocomial pneumonia. *Shock* 17:443–450, 2002.
- Ng CS, Arifi AA, Wan S, Ho AM, Wan IY, Wong EM, Yim AP: Ventilation during cardiopulmonary bypass: impact on cytokine response and cardiopulmonary function. *Ann Thorac Surg* 85:154–162, 2008.
- Zupancich E, Paparella D, Turani F, Munch C, Rossi A, Massaccesi S, Ranieri VM: Mechanical ventilation affects inflammatory mediators in patients undergoing cardiopulmonary bypass for cardiac surgery: a randomized clinical trial. *J Thorac Cardiovasc Surg* 130:378–383, 2005.
- John LC, Ervine IM: A study assessing the potential benefit of continued ventilation during cardiopulmonary bypass. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 7:14–17, 2008.
- Loeckinger A, Kleinsasser A, Lindner KH, Margreiter J, Keller C, Hoermann C: Continuous positive airway pressure at 10 cm H₂O during cardiopulmonary bypass improves postoperative gas exchange. *Anesth Analg* 91:522–527, 2000.
- Tadié JM, Zegdi R, Trinquart L, Kurdi O, Journois D, Latremouille C, Diehl JL, Louis B, Fagon JY, Fabiani JN, et al.: Partitioning of exhaled NO in ventilated patients undergoing cardiac surgery. *Respir Physiol Neurobiol* 171:151–156, 2010.
- Magnusson L, Zengulis V, Wicky S, Tydén H, Thelin S, Hedenstierna G: Atelectasis is a major cause of hypoxemia and shunt after cardiopulmonary bypass: an experimental study. *Anesthesiology* 87:1153–1163, 1997.
- Verheij J, van Lingen A, Raijmakers PG, Spijksstra JJ, Girbes AR, Jansen EK, van den Berg FG, Groeneveld AB: Pulmonary abnormalities after cardiac surgery are better explained by atelectasis than by increased permeability edema. *Acta Anaesthesiol Scand* 49:1302–1310, 2005.
- Chu EK, Whitehead T, Slutsky AS: Effects of cyclic opening and closing at low- and high-volume ventilation on bronchoalveolar lavage cytokines. *Crit Care Med* 32:168–174, 2004.
- Retamal J, Bergamini BC, Carvalho AR, Bozza FA, Borzone G, Borges JB, Larsson A, Hedenstierna G, Bugego G, Bruhn A: Non-lobar atelectasis generates inflammation and structural alveolar injury in the surrounding healthy tissue during mechanical ventilation. *Crit Care* 18(5):505, 2014.
- Fukuse T, Hirata T, Nakamura T, Kawashima M, Hitomi S, Wada H: Influence of deflated and anaerobic conditions during cold storage on rat lungs. *Am J Respir Crit Care Med* 160(2):621–627, 1999.
- Sbrana S, Bevilacqua S, Buffa M, Spiller D, Parri MS, Gianetti J, de Filippis R, Clerico A: Post-reperfusion changes of monocyte function in coronary blood after extracorporeal circulation. *Cytometry B Clin Cytom* 65:14–21, 2005.
- Gabrilovich DI, Nagaraj S: Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 9(3):162–174, 2009.
- Greten TF, Manns MP, Korangy F: Myeloid derived suppressor cells in human diseases. *Int Immunopharmacol* 11(7):802–807, 2011.
- Tadié JM, Trinquart L, Jannié-Nartey C, Guerot E, Louis B, Fagon JY, Diehl JL, Delclaux C: Prediction of nosocomial infection acquisition in ventilated patients by nasal nitric oxide: proof-of-concept study. *Shock* 34:217–221, 2010.
- Le Tulzo Y, Pangault C, Amiot L, Guilloux V, Tribut O, Rivieux C, Camus C, Fauchet R, Thomas R, Dréno B: Monocyte human leukocyte antigen-DR transcriptional downregulation by cortisol during septic shock. *Am J Respir Crit Care Med* 169:1144–1151, 2004.

23. Fumeaux T, Pugin J: Role of interleukin-10 in the intracellular sequestration of human leukocyte antigen-DR in monocytes during septic shock. *Am J Respir Crit Care Med* 166:1475–1482, 2002.
24. Walley KR, Lukacs NW, Standiford TJ, Strieter RM, Kunkel SL: Balance of inflammatory cytokines related to severity and mortality of murine sepsis. *Infect Immun* 64:4733–4738, 1996.
25. Le Tulzo Y, Pangault C, Gacouin A, Guilloux V, Tribut O, Amiot L, Tattevin P, Thomas R, Fauchet R, Drénou B: Early circulating lymphocyte apoptosis in human septic shock is associated with poor outcome. *Shock* 18:487–494, 2002.
26. Lewis RT, Klein H: Risk factors in postoperative sepsis: significance of preoperative lymphocytopenia. *J Surg Res* 26(4):365–371, 1979.
27. Drewry AM, Samra N, Skrupky LP, Fuller BM, Compton SM, Hotchkiss RS: Persistent lymphopenia after diagnosis of sepsis predicts mortality. *Shock* 42:383–391, 2014.
28. Gey A, Tadie JM, Caumont-Prim A, Hauw-Berlemont C, Cynober L, Fagon JY, Terme M, Diehl JL, Delclaux C, Tartour E: Granulocytic myeloid-derived suppressor cells inversely correlate with plasma arginine and overall survival in critically ill patients. *Clin Exp Immunol* 180(2):280–288, 2015.
29. Beer L, Szerafin T, Mitterbauer A, Debreceni T, Maros T, Dworschak M, Roth GA, Ankersmit HJ: Low tidal volume ventilation during cardiopulmonary bypass reduces postoperative chemokine serum concentrations. *Thorac Cardiovasc Surg* 62:677–682, 2014.
30. Michalec L, Choudhury BK, Postlethwait E, Wild JS, Alam R, Lett-Brown M, Sur S: CCL7 and CXCL10 orchestrate oxidative stress-induced neutrophilic lung inflammation. *J Immunol* 168:846–852, 2002.
31. Ichikawa A, Kuba K, Morita M, Chida S, Tezuka H, Hara H, Sasaki T, Ohteki T, Ranieri VM, Dos Santos CC, et al.: CXCL10-CXCR3 enhances the development of neutrophil-mediated fulminant lung injury of viral and nonviral origin. *Am J Respir Crit Care Med* 187:65–77, 2013.
32. Williams AE, Chambers RC: The mercurial nature of neutrophils: still an enigma in ARDS? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 306(3):L217–L230, 2014.
33. Tremblay LN, Miatto D, Hamid Q, Govindarajan A, Slutsky AS: Injurious ventilation induces widespread pulmonary epithelial expression of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 messenger RNA. *Crit Care Med* 30:1693–1700, 2002.
34. Shim JK, Chun DH, Choi YS, Lee JY, Hong SW, Kwak YL: Effects of early vital capacity maneuver on respiratory variables during multivessel off-pump coronary artery bypass graft surgery. *Crit Care Med* 37(2):539–544, 2009.
35. Rady MY, Ryan T, Starr NJ: Early onset of acute pulmonary dysfunction after cardiovascular surgery: risk factors and clinical outcome. *Crit Care Med* 25:1831–1839, 1997.



Discussion et perspectives

Discussion et perspectives

Il y a 30 ans le choc septique était considéré comme une réaction inflammatoire exacerbée. Il y a 25 ans, commençait à émerger l'idée que si certains patients succombaient précocement à un excès d'inflammation, la majorité d'entre eux survivaient à cette phase précoce et mouraient tardivement des complications secondaires à un état d'immunodépression. Aujourd'hui, alors que l'immunothérapie révolutionne la prise en charge de nombreux cancers, nous ne disposons toujours pas de traitement spécifique du sepsis et le nombre de victimes ne fait que s'accroître. Si nous commençons aujourd'hui à apprécier la complexité de cette pathologie dans sa globalité, l'heure est venue de comprendre quels mécanismes en régissent l'évolution. L'étude de *Nagai* avait montré que la stimulation des cellules souches multipotentes de la moelle osseuse par les agonistes des TLR induisait un biais de différenciation vers la lignée myéloïde [85]. Aussi, nous a-t-il semblé pertinent de préciser par une approche globale le rôle et la place de ces cellules dans la dysfonction immunitaire du sepsis.

De nouveaux mécanismes de dysfonction immunitaire

La régulation de la disponibilité des acides aminés essentiels est l'un des mécanismes essentiels de régulation des fonctions immunitaires. Comme nous l'avons vu en introduction,IDO joue un rôle essentiel dans un grand nombre de processus physiologiques et pathologiques. Elle fait en particulier partie des mécanismes élémentaires d'inhibition de la prolifération lymphocytaire T partagés par de nombreux contingents myéloïdes suppressifs. Au cours de l'infection à VIH, elle est particulièrement impliquée dans la persistance de la défaillance immunitaire. Outre l'anergie lymphocytaire induite par la déplétion en tryptophane, elle provoque une déplétion des lymphocytes Th17 par l'intermédiaire de ses métabolites actifs, en particulier l'acide 3-hydroxyanthralinique, et favorise la translocation bactérienne digestive qui conduit à pérenniser l'état d'activation immunitaire [342].

Nous avons démontré que l'activité IDO systémique était fortement augmentée au cours du sepsis. Son activité était corrélée à la gravité du sepsis et associée à

une mortalité élevée. De façon intéressante, cette activité demeurait élevée 14 jours après le début de l'affection initiale, en accord avec l'idée que le sepsis induit une dysfonction immunitaire pérenne. Nous pouvons d'ores et déjà souligner le fait que ni la durée exacte ni les causes de la persistance de cette défaillance ne sont actuellement connues. Les quelques données cliniques dont nous disposons actuellement, faisant état d'un risque accru d'infection, de cancer ou de maladies cardio-vasculaires dans l'année qui suit, voire d'une surmortalité persistante 5 ans après l'affection initiale, laissent à penser que la dysfonction immunitaire persiste bien au-delà de la durée de suivi des études.

Nous avons par ailleurs montré d'une part que cette l'activité IDO n'était ni corrélée au degré d'expression d'HLA-DR sur les monocytes, ni à la proportion de Treg circulants, ni même à la profondeur de la lymphopénie, suggérant des mécanismes et voies de régulation différents . En revanche, nous avons pu montrer que les monocytes CD14⁺ étaient une source majeure de production d'IDO. Néanmoins, contrairement aux volontaires sains chez qui l'activité IDO peut être stimulée par les agonistes des TLR, seul l'IFN- γ demeurait capable d'induire une activité IDO dans les monocytes de patients septiques, suggérant une altération majeure de la voie de signalisation NF- κ B.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés au rôle de l'alarmine HMGB1 dans la dysfonction des polynucléaires neutrophiles au cours du sepsis. Il a en effet été montré que les polynucléaires neutrophiles chez les patients qui survivent à la phase initiale du sepsis voient leurs capacités bactéricides sévèrement altérées, et que cette dysfonction joue un rôle majeur dans l'acquisition d'infections nosocomiales [131]. HMGB1 est une protéine ambivalente, appartenant à la famille des alarmines, mais ayant également la particularité par l'intermédiaire de sa boîte A d'exercer des effets anti-inflammatoires [291]. Des données antérieures avaient noté que la persistance de concentrations plasmatiques d'HMGB1 élevées était significativement associée à la mortalité chez les patients de réanimation [343]. Dans un travail réalisé en collaboration avec *Jean-Marc Tadié* et l'équipe d'*Edward Abraham*, nous avons pu montrer tout d'abord avec un modèle murin de sepsis polymicrobien par CLP que la défaillance du burst oxydatif et des capacités de bactéricidie des polynucléaires neutrophiles est due en partie à un effet inhibiteur

d'HMGB1 sur la NADPH oxydase. Nous avons pu dans un second temps confirmer l'existence d'anomalies similaires chez les patients hospitalisés en réanimation qui ont survécu à un choc septique. Cette activité était rétablie par l'ajout d'un anticorps inhibiteur d'HMGB1, suggérant le rôle de cette alarmine dans la dysfonction des polynucléaires chez l'homme. Un anticorps anti-HMGB1 permettait de restaurer l'activité de la NADPH oxydase de polynucléaires neutrophiles de sujets sains préalablement exposés au plasma de patients septiques. Ces résultats soulignent d'une part le rôle d'HMGB1 dans la persistance de la défaillance immunitaire dans les suites d'un choc septique, d'autre part l'évolutivité de ses effets, initialement pro puis anti-inflammatoires. D'autre part, HMGB1 pourrait ainsi constituer une nouvelle cible thérapeutique dont l'inhibition permettrait de restaurer les capacités immunitaires des patients. Enfin, l'une des questions soulevées est de savoir si l'altération des capacités bactéricides des polynucléaires n'est pas le reflet d'une polarisation de leur phénotype vers un profil de type tolérogène.

Les cellules myéloïdes au cours du sepsis : Amies ou ennemies ? Victimes ou coupables ?

Les aspects anti-inflammatoires de la réponse immunitaire du sepsis ont largement été explorés sous l'angle de la défaillance : apoptose et anergie lymphocytaire, diminution des capacités des cellules présentatrices d'antigènes à induire une réponse adaptative efficace, impuissance des polynucléaires neutrophiles face aux agents bactériens. Au-delà de quelques données montrant une capacité préservée des monocytes à produire des cytokines anti-inflammatoires ou une relative résistance des Treg à l'apoptose, les mécanismes qui régissent et régulent cet état de défaillance immunitaire demeurent inconnus. Etant donnée l'orientation de la réponse immunitaire vers une tonalité myéloïde au détriment de la lignée lymphoïde, et le rôle majeur des sous-populations myéloïdes suppressives au cours des cancers, nous nous sommes intéressés au rôle, aux fonctions et à l'impact clinique des MDSC au cours du sepsis.

Nous avons pu montrer sur une cohorte de patients hospitalisés en réanimation pour un choc septique l'existence d'une signature transcriptomique et plasmatique de type myéloïde suppressive. Par une analyse cytométrique extensive du

compartiment myéloïde circulant, nous avons pu montrer d'une part que les monocytes CD14⁺ dont l'expression d'HLA-DR était diminuée, récemment rebaptisés M-MDSC, étaient effectivement responsables d'une inhibition de la prolifération lymphocytaire T *in vitro*. Cette sous-population cellulaire n'avait néanmoins pas d'impact sur le pronostic à long terme des patients. En revanche, nous avons pu mettre en évidence une population de granulocytes de faible densité, co-purifiée avec les cellules mononucléées après centrifugation sur gradient de densité. Ces cellules CD14⁻CD15⁺, identifiées comme étant des G-MDSC, étaient constituées d'une population hétérogène de cellules granuleuses de stades de maturité variées, et exprimant fortement les marqueurs de dégranulation. Ces cellules étaient également responsables d'une inhibition de la prolifération des lymphocytes T et à l'origine exclusive d'une activité arginase *in vitro*. La déplétion des cellules CD14⁺ et des cellules CD15⁺ permettait de restaurer partiellement la prolifération des lymphocytes T, confirmant le rôle majeur de ces cellules dans le phénomène d'anergie lymphocytaire.

De façon importante, nous avons pu montrer que l'expansion précoce des G-MDSC était associée à la survenue tardive d'infections nosocomiales. En accord avec une étude récente portant sur des malades de réanimation non-septiques, l'arginase 1 produite par les G-MDSC était également associée à la survenue d'infections nosocomiales et associée à la mortalité [268].

Ainsi, ce travail nous permet de faire émerger un nouveau paradigme : Au cours du sepsis, les cellules myéloïdes ne sont pas seulement victimes de la défaillance immunitaire, elles font surtout l'objet d'une redirection de leurs fonctions vers une activité régulatrice et immunosuppressive prolongée dans le temps. A l'instar de ce qui a déjà été décrit au cours des états inflammatoires chroniques, ce changement relève de deux mécanismes : d'une part l'accumulation de cellules immatures, en particulier provenant de la lignée granuleuse, et d'autre part, l'acquisition par les cellules myéloïdes matures de capacités suppressives. Parallèlement, l'arginase 1 produite par les G-MDSC émerge comme un nouveau mécanisme immunomodulateur au cours du sepsis.

De la spécificité de la réponse à l'agression

Un travail mené de façon parallèle sur une cohorte de patients atteints de DLBCL a permis de constater à l'inverse, malgré l'expansion une fois de plus des deux contingents cellulaires, le rôle prédominant des M-MDSC. En effet, seule l'expansion de ce sous-type cellulaire était associée au pronostic des malades. Contrairement au sepsis, leur mode d'action reposait non pas sur une activité arginase ou IDO mais sur la production d'IL-10 et S100A12 et l'expression de PD-L1. Ces résultats divergents sont le reflet de la grande variabilité des réponses myéloïdes face à deux contextes inflammatoires différents, l'un aigu, l'autre chronique, mais tous deux responsables d'altérations prolongées de la réponse immunitaire.

Nous nous sommes par ailleurs intéressés à la réponse immunitaire au cours de la chirurgie cardiaque sous circulation extracorporelle, constituant un modèle d'inflammation aiguë non-infectieuse, et au rôle protecteur du maintien de la ventilation mécanique au cours de la chirurgie. Des travaux précédents avaient montré que le maintien de la ventilation mécanique au cours de la circulation extracorporelle permettait de réduire la dysfonction pulmonaire au décours de l'intervention [344] mais les effets sur la dysfonction immunitaire postopératoire n'étaient à ce jour pas connus. Nous avons pu montrer que le maintien de la ventilation mécanique permettait de diminuer les taux plasmatiques post-opératoires de TNF- α et d'IL-10 et de limiter la lymphopénie, mais n'avait en revanche pas d'impact sur le compartiment myéloïde. En particulier, il ne permettait pas de limiter l'augmentation du nombre de monocytes CD14⁺HLA-DR^{low/-} induite par l'intervention. Ces premiers travaux nécessitent une poursuite de l'étude des altérations immunitaires induites par la chirurgie cardiaque et la circulation extracorporelle. De nouvelles expérimentations en cours viennent d'ores et déjà de confirmer que ces monocytes CD14⁺HLA-DR^{low/-} étaient bien responsables d'une inhibition de la prolifération lymphocytaire T *in vitro*. Leur impact clinique reste toutefois à démontrer.

Perspectives

Les travaux réalisés lors de cette thèse soulèvent de nombreuses questions et appellent de nouvelles investigations. Si l'adéquation du modèle murin à la physiopathologie du sepsis chez l'homme a souvent été mise en question, il reste néanmoins indispensable à une meilleure compréhension, d'une part car il permet l'étude de compartiments tissulaires peu accessibles chez l'homme, et d'autre part parce qu'il permet l'étude d'interventions thérapeutiques. L'étude de modèles de sepsis non létal suivi d'une infection secondaire opportuniste de type fongique par exemple doit permettre d'apporter une perspective plus proche de la physiopathologie du sepsis chez l'homme.

Nous venons de montrer qu'au cours du sepsis, les cellules myéloïdes jusque-là décrites comme "supprimées" sont en réalité elles-mêmes suppressives et jouent un rôle moteur dans la défaillance immunitaire. Se pose tout d'abord la question de la cinétique de ces populations dans le temps. Le caractère létal de l'excès d'inflammation au cours de la phase précoce du sepsis laisse à penser que ces cellules jouent initialement un rôle protecteur et homéostatique. La déplétion séquentielle de sous-populations cellulaires chez des souris transgéniques exprimant le récepteur de la toxine diphtérique (DTR) sous le contrôle de promoteurs de gènes myéloïdes spécifiques (tels que Ly6G pour les cellules granulocytaires, ou Ly6C pour les cellules monocytaires) pourrait permettre d'étudier le rôle spécifique de chacune à chaque phase du sepsis. Il serait par ailleurs intéressant d'étudier le devenir de ces cellules myéloïdes dans l'espace. Des approches à l'aide de cellules marquées pourraient permettre, par des techniques de microscopie intra-vitale de suivre le trafic de ces cellules au-delà du compartiment sanguin.

Enfin, une des questions essentielles est de savoir pourquoi cette défaillance immunitaire s'installe de façon aussi durable dans le temps. Au cours des cancers, il a été bien démontré que les cellules tumorales avaient la capacité de subvertir les cellules myéloïdes afin d'inhiber la réponse immunitaire, de favoriser leur développement et de promouvoir leur extension métastatique. Dans le cadre du sepsis, il faut se souvenir que la maladie infectieuse naît de la rencontre de l'hôte et d'un agent pathogène. Il serait intéressant de savoir si la persistance de la défaillance immunitaire ne pourrait pas être liée à une persistance de niches de

l'agent pathogène initial. A titre de comparaison, des travaux montrent que le granulome tuberculeux n'est peut-être pas seulement une façon de circonscrire l'infection, mais qu'il pourrait être entretenu et organisé par le bacille tuberculeux lui-même afin de favoriser sa survie et sa dissémination [345]. Une approche à l'aide de bactéries marquées pourrait permettre de suivre dans le temps les interactions entre l'agent pathogène initial et les cellules myéloïdes. Une seconde piste est l'émergence des infections opportunistes de type réactivations virales ou infections fongiques au cours de l'évolution de la maladie. La question de la pérennisation des MDSC par le biais de ces agents pathogènes mérite d'être posée également. Afin de répondre à ces questions, j'envisage d'aller travailler sur les interactions hôte-pathogène dans le cadre d'un post-doctorat dans le laboratoire de *Tom van der Poll* à Amsterdam.

Conclusion

La défaillance immunitaire décrite au cours du sepsis repose en partie sur le développement de cellules myéloïdes suppressives de type MDSC. Leur activité suppressive est en partie portée par une activité IDO et Arginase. L'expansion précoce de G-MDSC prédit l'apparition d'infections nosocomiales secondaires, soulignant le rôle majeur de ces cellules dans le pronostic des infections bactériennes graves. L'enjeu des futurs travaux sera de déterminer les mécanismes responsables de la persistance de leur effet supprimeur afin de développer des thérapeutiques visant à restaurer les capacités immunitaires des patients atteints de sepsis.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. Angus DC, van der Poll T. Severe Sepsis and Septic Shock. *N. Engl. J. Med.* 2013;369:840–51.
2. Rittirsch D, Flierl MA, Ward PA. Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol* 2008;8:776–87.
3. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N. Engl. J. Med.* 2003;348:138–50.
4. Thomas L. *Germes.* *N. Engl. J. Med.* 1972;287:553–5.
5. Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest* 1997;112:235–43.
6. Cavillon J-M, Adib-Conquy M. Bench-to-bedside review: endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. *Crit Care* 2006;10:233.
7. van der Poll T, Opal SM. Host-pathogen interactions in sepsis. *Lancet Infect Dis* 2008;8:32–43.
8. Bone RC, Sprung CL, Sibbald WJ. Definitions for sepsis and organ failure. *Crit Care Med* 1992;20:724–6.
9. Vincent JL. Dear SIRS, I’m sorry to say that I don’t like you... *Crit Care Med* 1997;25:372–4.
10. Kaukonen K-M, Bailey M, Pilcher D, Cooper DJ, Bellomo R. Systemic Inflammatory Response Syndrome Criteria in Defining Severe Sepsis. *N. Engl. J. Med.* 2015;:150317020036009–10.
11. 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;315:801–10.
12. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, et al. Surviving Sepsis Campaign. *Crit Care Med* 2013;41:580–637.
13. 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;348:1546–54.
14. Kaukonen K-M, Bailey M, Suzuki S, Pilcher D, Bellomo R. Mortality Related to Severe Sepsis and Septic Shock Among Critically Ill Patients in Australia and New Zealand, 2000-2012. *JAMA* 2014;311:1308.
15. Martin GS, Mannino DM, Moss M. The effect of age on the development and outcome of adult sepsis*. *Crit Care Med* 2006;34:15–21.
16. Liu V, Escobar GJ, Greene JD, Soule J, Whippy A, Angus DC, et al. Hospital Deaths in Patients With Sepsis From 2 Independent Cohorts. *JAMA* 2014;312:90–3.
17. Daviaud F, Grimaldi D, Dechartres A, Charpentier J, Geri G, Marin N, et al. Timing and causes of death in septic shock. *Ann Intensive Care* 2015;:1–9.
18. van Vught LA, Klein Klouwenberg PMC, Spitoni C, Scicluna BP, Wiewel MA, Horn J, et al. Incidence, Risk Factors, and Attributable Mortality of Secondary Infections in the Intensive Care Unit After Admission for Sepsis. *JAMA* 2016;:1–47.
19. Quartin AA, Schein RM, Kett DH, Peduzzi PN. Magnitude and duration of the effect of sepsis on survival. Department of Veterans Affairs Systemic Sepsis Cooperative Studies Group. *JAMA* 1997;277:1058–63.

20. Iwashyna TJ, Ely EW, Smith DM, Langa KM. Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis. *JAMA* 2010;304:1787–94.
21. Storgaard M, Hallas J, Gahrn-Hansen B, Pedersen SS, Pedersen C, Lassen AT. Short- and long-term mortality in patients with community-acquired severe sepsis and septic shock. *Scand J Infect Dis* 2013;45:577–83.
22. Yende S, D'Angelo G, Kellum JA, Weissfeld L, Fine J, Welch RD, et al. Inflammatory Markers at Hospital Discharge Predict Subsequent Mortality after Pneumonia and Sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177:1242–7.
23. Chang DW, Tseng C-H, Shapiro MF. Rehospitalizations Following Sepsis: Common and Costly. *Crit Care Med* 2015;43:2085–93.
24. Jacob JA. New Sepsis Diagnostic Guidelines Shift Focus to Organ Dysfunction. *JAMA* 2016;315:739–40.
25. Annane D, Bellissant E, Cavaillon J-M. Septic shock. *Lancet* 2005;365:63–78.
26. Pugin J. How tissue injury alarms the immune system and causes a systemic inflammatory response syndrome. *Ann Intensive Care* 2012;2:1–1.
27. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 2006;81:1–5.
28. Chan JK, Roth J, Oppenheim JJ, Tracey KJ, Vogl T, Feldmann M, et al. Alarmins: awaiting a clinical response. *J Clin Invest* 2012;122:2711–9.
29. Cavaillon J-M, Adib-Conquy M, Fitting C, Adrie C, Payen D. Cytokine Cascade in Sepsis. *Scand J Infect Dis* 2003;35:535–44.
30. Gay NJ, Symmons MF, Gangloff M, Bryant CE. Assembly and localization of Toll-like receptor signalling complexes. *Nat Rev Immunol* 2014;14:546–58.
31. Cavaillon JM, Fitting C, Haeflner-Cavaillon N. Recombinant C5a enhances interleukin 1 and tumor necrosis factor release by lipopolysaccharide-stimulated monocytes and macrophages. *Eur. J. Immunol.* 1990;20:253–7.
32. Granowitz EV, Porat R, Gelfand JA, Wolff SM, Dinarello CA. Administration of low-dose endotoxin to healthy humans increases C5a binding to circulating neutrophils. *J Infect Dis* 1994;169:480–2.
33. Proft T, Sriskandan S, Yang L, Fraser JD. Superantigens and streptococcal toxic shock syndrome. *Emerging Infect. Dis.* 2003;9:1211–8.
34. Sørensen TIA, Nielsen GG, Andersen PK, Teasdale TW. Genetic and Environmental Influences on Premature Death in Adult Adoptees. *N. Engl. J. Med.* 1988;318:727–32.
35. Casanova J-L, Abel L. The Genetic Theory of Infectious Diseases: A Brief History and Selected Illustrations. *Annu. Rev. Genom. Human Genet.* 2013;14:215–43.
36. Picard C, Casanova J-L, Abel L. Mendelian traits that confer predisposition or resistance to specific infections in humans. *Curr Opin Immunol* 2006;18:383–90.
37. Picard C, Puel A, Bonnet M, Ku C-L, Bustamante J, Yang K, et al. Pyogenic bacterial infections in humans with IRAK-4 deficiency. *Science* 2003;299:2076–9.
38. Bernuth von H, Picard C, Jin Z, Pankla R, Xiao H. Pyogenic bacterial infections in humans with MyD88 deficiency. ??? 2008;
39. Toubiana J, Courtine E, Pène F, Viallon V, Asfar P, Daubin C, et al. IRAK1 functional genetic variant affects severity of septic shock*. *Crit Care Med* 2010;38:2287–94.

40. Remick DG, Newcomb DE, Bolgos GL, Call DR. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. *Shock* 2000;13:110–6.
41. Tracey KJ, Beutler B, Lowry SF, Merryweather J, Wolpe S, Milsark IW, et al. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science* 1986;234:470–4.
42. Okusawa S, Gelfand JA, Ikejima T, Connolly RJ, Dinarello CA. Interleukin 1 induces a shock-like state in rabbits. Synergism with tumor necrosis factor and the effect of cyclooxygenase inhibition. *J Clin Invest* 1988;81:1162–72.
43. Remick DG, Strieter RM, Eskandari MK. Role of tumor necrosis factor-alpha in lipopolysaccharide-induced pathologic alterations. *The American journal ...* 1990;
44. Tracey KJ, Fong Y, Hesse DG, Manogue KR, Lee AT, Kuo GC, et al. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature* 1987;330:662–4.
45. Beutler B, Milsark IW, Cerami AC. Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. *Science* 1985;229:869–71.
46. Ohlsson K, Björk P, Bergenfeldt M, Hageman R, Thompson RC. Interleukin-1 receptor antagonist reduces mortality from endotoxin shock. *Nature* 1990;348:550–2.
47. Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH. Sepsis and septic shock—a review of laboratory models and a proposal. *Journal of Surgical Research* 1980;
48. Hubbard WJ, Choudhry M, Schwacha MG, Kerby JD, Rue LW, Bland KI, et al. Cecal ligation and puncture. *Shock* 2005;24 Suppl 1:52–7.
49. Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, Ward PA. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat Protoc* 2008;4:31–6.
50. Rittirsch D, Hoesel LM, Ward PA. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. *J Leukoc Biol* 2006;81:137–43.
51. Turnbull IR, Javadi P, Buchman TG, Hotchkiss RS, Karl IE, Coopersmith CM. Antibiotics Improve Survival in Sepsis Independent of Injury Severity but do not Change Mortality in Mice with Markedly Elevated Interleukin 6 Levels. *Shock* 2004;21:121–5.
52. Czermak BJ, Sarma V, Pierson CL, Warner RL, Huber-Lang M, Bless NM, et al. Protective effects of C5a blockade in sepsis. *Nature Medicine* 1999;5:788–92.
53. Huber-Lang M, Sarma VJ, Lu KT, McGuire SR, Padgaonkar VA, Guo RF, et al. Role of C5a in Multiorgan Failure During Sepsis. *J Immunol* 2001;166:1193–9.
54. Riedemann NC, Neff TA, Guo RF, Bernacki KD, Laudes IJ, Sarma JV, et al. Protective Effects of IL-6 Blockade in Sepsis Are Linked to Reduced C5a Receptor Expression. *J Immunol* 2003;170:503–7.
55. Niederbichler AD, Hoesel LM, Westfall MV, Gao H, Ipaktchi KR, Sun L, et al. An essential role for complement C5a in the pathogenesis of septic cardiac dysfunction. *J Exp Med* 2006;203:53–61.
56. Smith JW, Urba WJ, Curti BD, Elwood LJ, Steis RG, Janik JE, et al. The toxic and hematologic effects of interleukin-1 alpha administered in a phase I trial to patients with advanced malignancies. *J. Clin. Oncol.* 1992;10:1141–52.

57. Chapman PB, Lester TJ, Casper ES, Gabrilove JL, Wong GY, Kempin SJ, et al. Clinical pharmacology of recombinant human tumor necrosis factor in patients with advanced cancer. *J. Clin. Oncol.* 1987;5:1942–51.
58. Qiu P, Cui X, Sun J, Welsh J, Natanson C, Eichacker PQ. Antitumor Necrosis Factor Therapy Is Associated With Improved Survival in Clinical Sepsis Trials. *Crit Care Med* 2013;41:2419–29.
59. Bernard GR, Francois B, Mira J-P, Vincent J-L, Dellinger RP, Russell JA, et al. Evaluating the Efficacy and Safety of Two Doses of the Polyclonal Anti-Tumor Necrosis Factor- α Fragment Antibody AZD9773 in Adult Patients With Severe Sepsis and/or Septic Shock. *Crit Care Med* 2014;42:504–11.
60. Fisher CJ, Dhainaut J, Opal SM, Pribble JP. Recombinant human interleukin 1 receptor antagonist in the treatment of patients with sepsis syndrome: results from a randomized, double-blind, placebo-controlled *JAMA* 1994;
61. Opal SM, Laterre P-F, Francois B, LaRosa SP, Angus DC, Mira J-P, et al. Effect of eritoran, an antagonist of MD2-TLR4, on mortality in patients with severe sepsis: the ACCESS randomized trial. *JAMA* 2013;309:1154–62.
62. Cohen J, Vincent J-L, Adhikari NKJ, Machado FR, Angus DC, Calandra T, et al. Sepsis: a roadmap for future research. *Lancet Infect Dis* 2015;15:581–614.
63. 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;186:241–50.
64. Alberti C, Brun-Buisson C, Burchardi H, Martin C, Goodman S, Artigas A, et al. Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. *Intensive Care Med* 2001;28:108–21.
65. Otto GP, Sossdorf M, Claus RA, Rödel J, Menge K, Reinhart K, et al. The late phase of sepsis is characterized by an increased microbiological burden and death rate. *Crit Care* 2011;15:R183.
66. Limaye AP, Kirby KA, Rubenfeld GD, Leisenring WM, Bulger EM, Neff MJ, et al. Cytomegalovirus reactivation in critically ill immunocompetent patients. *JAMA* 2008;300:413–22.
67. Walton AH, Muenzer JT, Rasche D, Boomer JS, Sato B, Brownstein BH, et al. Reactivation of Multiple Viruses in Patients with Sepsis. *PLoS ONE* 2014;9:e98819.
68. Luyt C-E, Combes A, Deback C, Aubriot-Lorton M-H, Nieszkowska A, Trouillet J-L, et al. Herpes Simplex Virus Lung Infection in Patients Undergoing Prolonged Mechanical Ventilation. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175:935–42.
69. Torgersen C, Moser P, Luckner G, Mayr V, Jochberger S, Hasibeder WR, et al. Macroscopic Postmortem Findings in 235 Surgical Intensive Care Patients with Sepsis. *Anesth Analg* 2009;108:1841–7.
70. Ashare A. Anti-inflammatory response is associated with mortality and severity of infection in sepsis. *AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology* 2004;288:L633–40.
71. Prins JM, Kuijper EJ, Mevissen ML, Speelman P, van Deventer SJ. Release of tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 during antibiotic killing of *Escherichia coli* in whole blood: influence of antibiotic class, antibiotic concentration, and presence of septic serum. *Infect Immun* 1995;63:2236–42.
72. Girardin E, Roux-Lombard P, Grau GE, Suter P, Gallati H, Dayer JM. Imbalance between tumour necrosis factor-alpha and soluble TNF receptor concentrations in severe meningococcaemia. The J5 Study Group. *Immunology* 1992;76:20–3.

73. Saxena A, Khosraviani S, Noel S, Mohan D, Donner T, Hamad ARA. Interleukin-10 paradox: A potent immunoregulatory cytokine that has been difficult to harness for immunotherapy. *Cytokine* 2015;74:27–34.
74. Brandtzaeg P, Osnes L, Ovstebø R, Joø GB, Westvik AB, Kierulf P. Net inflammatory capacity of human septic shock plasma evaluated by a monocyte-based target cell assay: identification of interleukin-10 as a major functional deactivator of human monocytes. *J Exp Med* 1996;184:51–60.
75. van Dissel JT, van Langevelde P, Westendorp RG, Kwappenberg K, Frölich M. Anti-inflammatory cytokine profile and mortality in febrile patients. *Lancet* 1998;351:950–3.
76. Cavaillon J-M. “Septic Plasma.” *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:1417–8.
77. Huengsberg M, Winer JB, Gompels M, Round R, Ross J, Shahmanesh M. Serum kynurenine-to-tryptophan ratio increases with progressive disease in HIV-infected patients. *Clin. Chem.* 1998;44:858–62.
78. Murray MF. Tryptophan depletion and HIV Tryptophan depletion and HIV infection: a metabolic link to pathogenesis. *Lancet Infect Dis* 2003;3:644–52.
79. Suzuki Y, Suda T, Yokomura K, Suzuki M, Fujie M, Furuhashi K, et al. Serum activity of indoleamine 2,3-dioxygenase predicts prognosis of community-acquired pneumonia. *Journal of Infection* 2011;63:215–22.
80. Davis JS, Anstey NM. Is plasma arginine concentration decreased in patients with sepsis? A systematic review and meta-analysis*. *Crit Care Med* 2011;39:380–5.
81. Tadie J-M, Cynober L, Peigne V, Caumont-Prim A, Neveux N, Gey A, et al. Arginine administration to critically ill patients with a low nitric oxide fraction in the airways: a pilot study. *Intensive Care Med* 2013;39:1663–5.
82. Wijnands K, Castermans T, Hommen M, Meesters D, Poeze M. Arginine and Citrulline and the Immune Response in Sepsis. *Nutrients* 2015;7:1426–63.
83. Munder M. Suppression of T-cell functions by human granulocyte arginase. *Blood* 2006;108:1627–34.
84. Takele Y, Abebe T, Weldegebreal T, Hailu A, Hailu W, Hurissa Z, et al. Arginase Activity in the Blood of Patients with Visceral Leishmaniasis and HIV Infection. *PLoS Negl Trop Dis* 2013;7:e1977.
85. Nagai Y, Garrett KP, Ohta S, Bahrn U, Kouro T, Akira S, et al. Toll-like Receptors on Hematopoietic Progenitor Cells Stimulate Innate Immune System Replenishment. *Immunity* 2006;24:801–12.
86. Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, Tinsley KW, Cobb JP, Matuschak GM, et al. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med* 1999;27:1230–51.
87. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Schmiege RE, Hui JJ, Chang KC, et al. Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. *J Immunol* 2001;166:6952–63.
88. 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;18:487–94.
89. Drewry AM, Samra N, Skrupky LP, Fuller BM, Compton SM, Hotchkiss RS. Persistent Lymphopenia After Diagnosis of Sepsis Predicts Mortality. *Shock* 2014;42:383–91.

90. Venet F, Filipe-Santos O, Lepape A, Malcus C, Poitevin-Later F, Grives A, et al. Decreased T-Cell Repertoire Diversity in Sepsis. *Crit Care Med* 2013;41:111–9.
91. Monneret G, Debard A-L, Venet F, Bohé 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;31:2068–71.
92. Monserrat J, de Pablo R, Reyes E, Díaz D, Barcenilla H, Zapata MR, et al. Clinical relevance of the severe abnormalities of the T cell compartment in septic shock patients. *Crit Care* 2009;13:R26.
93. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 2005;6:345–52.
94. Venet F, Pachot A, Debard A-L, Bohé 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;32:2329–31.
95. Chen X, Murakami T, Oppenheim JJ, Howard OMZ. Differential response of murine CD4+CD25+ and CD4+CD25- T cells to dexamethasone-induced cell death. *Eur. J. Immunol.* 2004;34:859–69.
96. Venet F, Chung C-S, Kherouf H, Geeraert A, Malcus C, Poitevin F, et al. Increased circulating regulatory T cells (CD4(+)CD25 (+)CD127 (-)) contribute to lymphocyte anergy in septic shock patients. *Intensive Care Med* 2009;35:678–86.
97. Albert ML. Death-defying immunity: do apoptotic cells influence antigen processing and presentation? *Nat Rev Immunol* 2004;
98. Blander JM, Medzhitov R. Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells. *Nature* 2006;440:808–12.
99. Hotchkiss RS, Chang KC, Grayson MH, Tinsley KW, Dunne BS, Davis CG, et al. Adoptive transfer of apoptotic splenocytes worsens survival, whereas adoptive transfer of necrotic splenocytes improves survival in sepsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003;100:6724–9.
100. Hotchkiss RS, Nicholson DW. Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nat Rev Immunol* 2006;6:813–22.
101. Kroemer G, Galluzzi L, Kepp O, Zitvogel L. Immunogenic Cell Death in Cancer Therapy. *Annu. Rev. Immunol.* 2013;31:51–72.
102. LeBlanc PM, Doggett TA, Choi J, Hancock MA, Durocher Y, Frank F, et al. An immunogenic peptide in the A-box of HMGB1 protein reverses apoptosis-induced tolerance through RAGE receptor. *J. Biol. Chem.* 2014;289:7777–86.
103. Savill J, Dransfield I, Gregory C, Haslett C. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev Immunol* 2002;2:965–75.
104. Heesters BA, Myers RC, Carroll MC. Follicular dendritic cells: dynamic antigen libraries. 2014;:1–10.
105. Tinsley KW, Grayson MH, Swanson PE, Drewry AM, Chang KC, Karl IE, et al. Sepsis Induces Apoptosis and Profound Depletion of Splenic Interdigitating and Follicular Dendritic Cells. *J Immunol* 2003;171:909–14.
106. 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;168:2493–500.
107. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. *J Exp Med* 1974;139:380–97.

108. Efron PA, Martins A, Minnich D, Tinsley K, Ungaro R, Bahjat FR, et al. Characterization of the Systemic Loss of Dendritic Cells in Murine Lymph Nodes During Polymicrobial Sepsis. *J Immunol* 2004;173:3035–43.
109. Colino J, Snapper CM. Two Distinct Mechanisms For Induction of Dendritic Cell Apoptosis in Response to Intact *Streptococcus pneumoniae*. *The Journal of Immunology* 2003;171:2354–65.
110. Ding Y, Chung CS, Newton S, Chen Y. Polymicrobial sepsis induces divergent effects on splenic and peritoneal dendritic cell function in mice. *Shock* (Augusta) 2004;
111. Pène F, Courtine E, Ouaz F, Zuber B, Sauneuf B, Sirgo G, et al. Toll-Like Receptors 2 and 4 Contribute to Sepsis-Induced Depletion of Spleen Dendritic Cells. *Infect Immun* 2009;77:5651–8.
112. Wen H, Dou Y, Hogaboam CM, Kunkel SL. Epigenetic regulation of dendritic cell-derived interleukin-12 facilitates immunosuppression after a severe innate immune response. *Blood* 2008;
113. Grimaldi D, Louis S, Pène F, Sirgo G, Rousseau C, Claessens YE, et al. Profound and persistent decrease of circulating dendritic cells is associated with ICU-acquired infection in patients with septic shock. *Intensive Care Med* 2011;37:1438–46.
114. Poehlmann H, Schefold JC, Zuckermann-Becker H, Volk H-D, Meisel C. Phenotype changes and impaired function of dendritic cell subsets in patients with sepsis: a prospective observational analysis. *Crit Care* 2009;13:R119.
115. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood Monocytes: Development, Heterogeneity, and Relationship with Dendritic Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 2009;27:669–92.
116. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood Monocytes Consist of Two Principal Subsets with Distinct Migratory Properties. *Immunity* 2003;19:71–82.
117. Auffray C, Fogg D, Garfa M, Elain G. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* 2007;317:666–70.
118. Serbina NV, Salazar-Mather TP, Biron CA, Kuziel WA, Pamer EG. TNF/ iNOS -Producing Dendritic Cells Mediate Innate Immune Defense against Bacterial Infection. *Immunity* 2003;19:59–70.
119. Cros J, Cagnard N, Woollard K, Patey N, Zhang S-Y, Senechal B, et al. Monocytes Patrol and Sense Nucleic Acids and Viruses via TLR7 and TLR8 Receptors. *Immunity* 2010;33:375–86.
120. Zawada AM, Rogacev KS, Rotter B, Winter P, Marell RR, Fliser D, et al. SuperSAGE evidence for CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes as a third monocyte subset. *Blood* 2011;118:e50–e61.
121. Munoz C, Carlet J, Fitting C, Missot B, Blériot JP, Cavaillon JM. Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. *J Clin Invest* 1991;88:1747–54.
122. Rigato O, Salomao R. Impaired production of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha but not of interleukin 10 in whole blood of patients with sepsis. *Shock* 2003;19:113–6.
123. Deutschman CS, Tracey KJ. Sepsis: Current Dogma and New Perspectives. *Immunity* 2014;40:463–75.

124. Le Tulzo Y, Pangault C, Amiot L, Guilloux V, Tribut O, Arvieux C, et al. Monocyte Human Leukocyte Antigen-DR Transcriptional Downregulation by Cortisol during Septic Shock. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;169:1144–51.
125. Fumeaux T, Pugin J. Role of Interleukin-10 in the Intracellular Sequestration of Human Leukocyte Antigen-DR in Monocytes during Septic Shock. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:1475–82.
126. Pangault C, Le Tulzo Y, Tattevin P, Guilloux V, Bescher NG, Drénou B. Down-modulation of granulocyte macrophage-colony stimulating factor receptor on monocytes during human septic shock. *Crit Care Med* 2006;34:1193–201.
127. 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;306:2594–605.
128. Chang K, Svabek C, Vazquez-Guillamet C, Sato B, Rasche D, Wilson S, et al. Targeting the programmed cell death 1: programmed cell death ligand 1 pathway reverses T cell exhaustion in patients with sepsis. *Crit Care* 2014;18:R3.
129. Alves-Filho JC, Spiller F, Cunha FQ. Neutrophil paralysis in sepsis. *Shock* 2010;34 Suppl 1:15–21.
130. Drifte G, Dunn-Siegrist I, Tissières P, Pugin J. Innate Immune Functions of Immature Neutrophils in Patients With Sepsis and Severe Systemic Inflammatory Response Syndrome*. *Crit Care Med* 2013;41:820–32.
131. Stephan F, Yang K, Tankovic J, Soussy C-J, Dhonneur G, Duvaldestin P, et al. Impairment of polymorphonuclear neutrophil functions precedes nosocomial infections in critically ill patients. *Crit Care Med* 2002;30:315–22.
132. Chishti AD, Shenton BK, Kirby JA, Baudouin SV. Neutrophil chemotaxis and receptor expression in clinical septic shock. *Intensive Care Med* 2004;30:605–11.
133. Xiao W, Mindrin MN, Seok J, Cuschieri J, Cuenca AG, Gao H, et al. A genomic storm in critically injured humans. *J Exp Med* 2011;208:2581–90.
134. Uhel F, Tadie J-M, Le Tulzo Y. Septic shock: Death mechanisms. *Réanimation* 2015;24:352–60.
135. Moine P, Abraham E. Immunomodulation and sepsis: impact of the pathogen. *Shock* 2004;22:297–308.
136. Coisel Y, Bousbia S, Forel J-M, Hraiech S, Lascola B, Roch A, et al. Cytomegalovirus and Herpes Simplex Virus Effect on the Prognosis of Mechanically Ventilated Patients Suspected to Have Ventilator-Associated Pneumonia. *PLoS ONE* 2012;7:e51340.
137. Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol* 2012;12:253–68.
138. Galdiero MR, Bonavita E, Barajon I, Garlanda C, Mantovani A, Jaillon S. Tumor associated macrophages and neutrophils in cancer. *Immunobiology* 2013;218:1402–10.
139. Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 2009;9:162–74.
140. Shortman K, Liu Y-J. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2002;2:151–61.
141. Idoyaga J, Steinman RM. SnapShot: Dendritic Cells. *Cell* 2011;146:660–2.

142. Satpathy AT, Wu X, Albring JC, Murphy KM. Re(de)fining the dendritic cell lineage. *Nat Immunol* 2012;13:1145–54.
143. Haan den JM, Lehar SM, Bevan MJ. CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *J Exp Med* 2000;192:1685–96.
144. Dudziak D, Kamphorst AO, Heidkamp GF, Buchholz VR, Trumppheller C, Yamazaki S, et al. Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science* 2007;315:107–11.
145. Crozat K, Guiton R, Guilliams M, Henri S, Baranek T, Schwartz-Cornil I, et al. Comparative genomics as a tool to reveal functional equivalences between human and mouse dendritic cell subsets. *Immunol. Rev.* 2010;234:177–98.
146. Gilliet M, Cao W, Liu Y-J. Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* 2008;8:594–606.
147. Swiecki M, Colonna M. The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. *Nat Rev Immunol* 2015;15:471–85.
148. Tran Janco JM, Lamichhane P, Karyampudi L, Knutson KL. Tumor-Infiltrating Dendritic Cells in Cancer Pathogenesis. *J Immunol* 2015;194:2985–91.
149. Pinzon-Charry A, Maxwell T, Lopez JA. Dendritic cell dysfunction in cancer: A mechanism for immunosuppression. *Immunology and Cell Biology* 2005;83:451–61.
150. Menetrier-Caux C, Montmain G, Dieu MC, Bain C, Favrot MC, Caux C, et al. Inhibition of the differentiation of dendritic cells from CD34(+) progenitors by tumor cells: role of interleukin-6 and macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1998;92:4778–91.
151. Krempsi J, Karyampudi L, Behrens MD, Erskine CL, Hartmann L, Dong H, et al. Tumor-Infiltrating Programmed Death Receptor-1+ Dendritic Cells Mediate Immune Suppression in Ovarian Cancer. *J Immunol* 2011;186:6905–13.
152. Vacchelli E, Aranda F, Eggermont A, Sautès-Fridman C, Tartour E, Kennedy EP, et al. Trial watch: IDO inhibitors in cancer therapy. *Oncolimmunology* 2014;3:e957994–11.
153. Ghiringhelli F, Puig PE, Roux S, Parcellier A, Schmitt E, Solary E, et al. Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF- β -secreting cells inducing CD4+CD25+regulatory T cell proliferation. *J Exp Med* 2005;202:919–29.
154. Munn DH. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. *J Clin Invest* 2004;114:280–90.
155. Norian LA, Rodriguez PC, O'Mara LA, Zabaleta J, Ochoa AC, Cella M, et al. Tumor-Infiltrating Regulatory Dendritic Cells Inhibit CD8+ T Cell Function via L-Arginine Metabolism. *Cancer Research* 2009;69:3086–94.
156. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 2008;8:958–69.
157. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *J Immunol* 2000;164:6166–73.
158. Leidi M, Gotti E, Bologna L, Miranda E, Rimoldi M, Sica A, et al. M2 Macrophages Phagocytose Rituximab-Opsonized Leukemic Targets More Efficiently than M1 Cells In Vitro. *J Immunol* 2009;182:4415–22.
159. Mantovani A, Sica A, Allavena P, Garlanda C, Locati M. Tumor-associated macrophages and the related myeloid-derived suppressor cells as a paradigm of the diversity of macrophage activation. *HIM* 2009;70:325–30.

160. Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* 2004;4:71–8.
161. Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol* 2010;11:889–96.
162. Qian B-Z, Li J, Zhang H, Kitamura T, Zhang J, Campion LR, et al. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature* 2011;475:222–5.
163. O'Connell PA, Surette AP, Liwski RS, Svenningsson P, Waisman DM. S100A10 regulates plasminogen-dependent macrophage invasion. *Blood* 2010;116:1136–46.
164. Cortez-Retamozo V, Etzrodt M. Origins of tumor-associated macrophages and neutrophils. 2012.
165. Zhao Q, Kuang DM, Wu Y, Xiao X, Li XF, Li TJ, et al. Activated CD69+ T Cells Foster Immune Privilege by Regulating IDO Expression in Tumor-Associated Macrophages. *J Immunol* 2012;188:1117–24.
166. Rodríguez PC, Quiceno DG, Zabaleta J, Ortiz B, Zea AH, Piazuelo MB, et al. Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses. *Cancer Research* 2004;64:5839–49.
167. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nature Medicine* 2004;10:942–9.
168. Kuang D-M, Zhao Q, Peng C, Xu J, Zhang J-P, Wu C, et al. Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma foster immune privilege and disease progression through PD-L1. *J Exp Med* 2009;206:1327–37.
169. Doedens AL, Stockmann C, Rubinstein MP, Liao D, Zhang N, DeNardo DG, et al. Macrophage Expression of Hypoxia-Inducible Factor-1 Suppresses T-Cell Function and Promotes Tumor Progression. *Cancer Research* 2010;70:7465–75.
170. Noy R, Pollard JW. Tumor-Associated Macrophages: From Mechanisms to Therapy. *Immunity* 2014;41:49–61.
171. Welch DR, Schissel DJ, Howrey RP. Tumor-elicited polymorphonuclear cells, in contrast to “normal” circulating polymorphonuclear cells, stimulate invasive and metastatic potentials of rat mammary 1989.
172. Mayadas TN, Cullere X, Lowell CA. The Multifaceted Functions of Neutrophils. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 2014;9:181–218.
173. Faurischou M, Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes and Infection* 2003;5:1317–27.
174. Munder M. Arginase I is constitutively expressed in human granulocytes and participates in fungicidal activity. *Blood* 2005;105:2549–56.
175. Pillay J, Braber den I, Vrisekoop N, Kwast LM, de Boer RJ, Borghans JAM, et al. In vivo labeling with 2H₂O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood* 2010;116:625–7.
176. Buckley CD. Identification of a phenotypically and functionally distinct population of long-lived neutrophils in a model of reverse endothelial migration. *J Leukoc Biol* 2005;79:303–11.

177. Maletto BA, Ropolo AS, Alignani DO, Liscovsky MV, Ranocchia RP, Moron VG, et al. Presence of neutrophil-bearing antigen in lymphoid organs of immune mice. *Blood* 2006;108:3094–102.
178. Beauvillain C, Cunin P, Doni A, Scotet M, Jaillon S, Loiry ML, et al. CCR7 is involved in the migration of neutrophils to lymph nodes. *Blood* 2011;117:1196–204.
179. Colombo MP, Lombardi L, Stoppacciaro A, Melani C, Parenza M, Bottazzi B, et al. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) gene transduction in murine adenocarcinoma drives neutrophil-mediated tumor inhibition in vivo. Neutrophils discriminate between G-CSF-producing and G-CSF-nonproducing tumor cells. *J Immunol* 1992;149:113–9.
180. Hicks AM, Riedlinger G, Willingham MC, Alexander-Miller MA, Kap-Herr Von C, Pettenati MJ, et al. Transferable anticancer innate immunity in spontaneous regression/complete resistance mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006;103:7753–8.
181. Di Carlo E, Forni G, Lollini P, Colombo MP, Modesti A, Musiani P. The intriguing role of polymorphonuclear neutrophils in antitumor reactions. *Blood* 2001;97:339–45.
182. Pekarek LA, Starr BA, Toledano AY, Schreiber H. Inhibition of tumor growth by elimination of granulocytes. *J Exp Med* 1995;181:435–40.
183. Nozawa H, Chiu C, Hanahan D. Infiltrating neutrophils mediate the initial angiogenic switch in a mouse model of multistage carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006;103:12493–8.
184. De Larco JE, Wuertz BRK, Furcht LT. The potential role of neutrophils in promoting the metastatic phenotype of tumors releasing interleukin-8. *Clin. Cancer Res.* 2004;10:4895–900.
185. Kowanetz M, Wu X, Lee J, Tan M. Granulocyte-colony stimulating factor promotes lung metastasis through mobilization of Ly6G+ Ly6C+ granulocytes. 2010.
186. McGary CT, Miele ME, Welch DR. Highly metastatic 13762NF rat mammary adenocarcinoma cell clones stimulate bone marrow by secretion of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor/ *The American journal of ...* 1995;
187. Fridlender ZG, Albelda SM. Tumor-associated neutrophils: friend or foe? *Carcinogenesis* 2012;33:949–55.
188. Fridlender ZG, Sun J, Kim S, Kapoor V, Cheng G, Ling L, et al. Polarization of Tumor-Associated Neutrophil Phenotype by TGF- β ;: \bullet N1 \bullet versus \bullet N2 \bullet TAN. *Cancer Cell* 2009;16:183–94.
189. Sagiv JY, Michaeli J, Assi S, Mishalian I, Kisos H, Levy L, et al. Phenotypic Diversity and Plasticity in Circulating Neutrophil Subpopulations in Cancer. *CellReports* 2015;10:562–73.
190. Rotondo R, Barisione G, Mastracci L, Grossi F, Orengo AM, Costa R, et al. IL-8 induces exocytosis of arginase 1 by neutrophil polymorphonuclears in nonsmall cell lung cancer. *Int. J. Cancer* 2009;125:887–93.
191. Kropf P, Baud D, Marshall SE, Munder M, Mosley A, Fuentes JM, et al. Arginase activity mediates reversible T cell hyporesponsiveness in human pregnancy. *Eur. J. Immunol.* 2007;37:935–45.
192. Ssemaganda A, Kindinger L, Bergin P, Nielsen L, Mpendo J, Ssetaala A, et al. Characterization of Neutrophil Subsets in Healthy Human Pregnancies. *PLoS ONE* 2014;9:e85696.

193. Pillay J, Kamp VM, van Hoffen E, Visser T, Tak T, Lammers J-W, et al. A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *J Clin Invest* 2012;122:327–36.
194. Robinson WA. Granulocytosis in neoplasia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1974;230:212–8.
195. Lappat EJ, Cawein M. A study of the leukemoid response in transplantable A-280 tumor in mice. *Cancer Research* 1964;24:302–11.
196. Slavin S, Strober S. Induction of allograft tolerance after total lymphoid irradiation (TLI): development of suppressor cells of the mixed leukocyte reaction (MLR). *J Immunol* 1979;123:942–6.
197. Lee MY, Rosse C. Depletion of lymphocyte subpopulations in primary and secondary lymphoid organs of mice by a transplanted granulocytosis-inducing mammary carcinoma. *Cancer Research* 1982;
198. Pak AS, Wright MA, Matthews JP, Collins SL. Mechanisms of immune suppression in patients with head and neck cancer: presence of CD34 (+) cells which suppress immune functions within cancers that secrete *Clinical Cancer ...* 1995;
199. Tsuchiya Y, Igarashi M, Suzuki R, Kumagai K. Production of colony-stimulating factor by tumor cells and the factor-mediated induction of suppressor cells. *J Immunol* 1988;141:699–708.
200. Mielcarek M, Martin PJ, Torok-Storb B. Suppression of alloantigen-induced T-cell proliferation by CD14+ cells derived from granulocyte colony-stimulating factor–mobilized peripheral blood mononuclear *Blood* 1997;
201. Ageitos AG, Varney ML, Bierman PJ, Vose JM, Warkentin PI, Talmadge JE. Comparison of monocyte-dependent T cell inhibitory activity in GM-CSF vs G-CSF mobilized PSC products. *Bone Marrow Transplant.* 1999;23:63–9.
202. Ino K, Singh RK, Talmadge JE. Monocytes from mobilized stem cells inhibit T cell function. *J Leukoc Biol* 1997;61:583–91.
203. Singh RK, Varney ML, Buyukberber S, Ino K, Ageitos AG, Reed E, et al. Fas-FasL-mediated CD4+ T-cell apoptosis following stem cell transplantation. *Cancer Research* 1999;59:3107–11.
204. Schmielau J, Finn OJ. Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of t-cell function in advanced cancer patients. *Cancer Research* 2001;61:4756–60.
205. Zea AH, Rodríguez PC, Atkins MB, Hernandez C, Signoretti S, Zabaleta J, et al. Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion. *Cancer Research* 2005;65:3044–8.
206. Rodriguez PC, Ernstoff MS, Hernandez C, Atkins M, Zabaleta J, Sierra R, et al. Arginase I-Producing Myeloid-Derived Suppressor Cells in Renal Cell Carcinoma Are a Subpopulation of Activated Granulocytes. *Cancer Research* 2009;69:1553–60.
207. 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;166:678–89.
208. Kusmartsev S, Gabrilovich D. Immature myeloid cells and cancer-associated immune suppression. *Cancer Immunol Immunother* 2002;51:293–8.
209. Serafini P, De Santo C, Marigo I, Cingarlini S, Dolcetti L, Gallina G, et al. Derangement of immune responses by myeloid suppressor cells. *Cancer Immunol Immunother* 2004;53:64–72.

210. Mirza N. All-trans-Retinoic Acid Improves Differentiation of Myeloid Cells and Immune Response in Cancer Patients. *Cancer Research* 2006;66:9299–307.
211. Gabrilovich DI, Bronte V, Chen SH, Colombo MP, Ochoa A, Ostrand-Rosenberg S, et al. The Terminology Issue for Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Research* 2007;67:425–5.
212. Youn JI, Nagaraj S, Collazo M, Gabrilovich DI. Subsets of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Tumor-Bearing Mice. *J Immunol* 2008;181:5791–802.
213. Youn J-I, Kumar V, Collazo M, Nefedova Y, Condamine T, Cheng P, et al. Epigenetic silencing of retinoblastoma gene regulates pathologic differentiation of myeloid cells in cancer. *Nat Immunol* 2013;14:211–20.
214. Damuzzo V, Pinton L, Desantis G, Solito S, Marigo I, Bronte V, et al. Complexity and challenges in defining myeloid-derived suppressor cells. *Cytometry* 2014;88:77–91.
215. Filipazzi P, Valenti R, Huber V, Pilla L, Canese P, Iero M, et al. Identification of a New Subset of Myeloid Suppressor Cells in Peripheral Blood of Melanoma Patients With Modulation by a Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulation Factor-Based Antitumor Vaccine. *Journal of Clinical Oncology* 2007;25:2546–53.
216. Poschke I, Mougiakakos D, Hansson J, Masucci GV, Kiessling R. Immature Immunosuppressive CD14+HLA-DR-/low Cells in Melanoma Patients Are Stat3hi and Overexpress CD80, CD83, and DC-Sign. *Cancer Research* 2010;70:4335–45.
217. Tarhini AA, Butterfield LH, Shuai Y, Gooding WE, Kalinski P, Kirkwood JM. Differing Patterns of Circulating Regulatory T Cells and Myeloid-derived Suppressor Cells in Metastatic Melanoma Patients Receiving Anti-CTLA4 Antibody and Interferon- α or TLR-9 Agonist and GM-CSF With Peptide Vaccination. *Journal of Immunotherapy* 2012;35:702–10.
218. Postow MA, Callahan MK, Barker CA, Yamada Y, Yuan J, Kitano S, et al. Immunologic correlates of the abscopal effect in a patient with melanoma. *N. Engl. J. Med.* 2012;366:925–31.
219. Pico de Coana Y, Poschke I, Gentilcore G, Mao Y, Nystrom M, Hansson J, et al. Ipilimumab Treatment Results in an Early Decrease in the Frequency of Circulating Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells as well as Their Arginase1 Production. *Cancer Immunology Research* 2013;1:158–62.
220. Vasquez-Dunddel D, Pan F, Zeng Q, Gorbounov M, Albesiano E, Fu J, et al. STAT3 regulates arginase-I in myeloid-derived suppressor cells from cancer patients. *J Clin Invest* 2013;123:1580–9.
221. Huang A, Zhang B, Wang B, Zhang F, Fan K-X, Guo Y-J. Increased CD14+HLA-DR-/low myeloid-derived suppressor cells correlate with extrathoracic metastasis and poor response to chemotherapy in non-small cell lung cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 2013;62:1439–51.
222. Hoechst B, Ormandy LA, Ballmaier M, Lehner F, Krüger C, Manns MP, et al. A New Population of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Hepatocellular Carcinoma Patients Induces CD4+CD25+Foxp3+ T Cells. *Gastroenterology* 2008;135:234–43.
223. Arihara F, Mizukoshi E, Kitahara M, Takata Y, Arai K, Yamashita T, et al. Increase in CD14+HLA-DR-/low myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients and its impact on prognosis. *Cancer Immunol Immunother* 2013;62:1421–30.

224. Walter S, Weinschenk T, Stenzl A, Zdrojowy R, Pluzanska A, Szczylik C, et al. Multipeptide immune response to cancer vaccine IMA901 after single-dose cyclophosphamide associates with longer patient survival. *Nature Medicine* 2012;18:1254–61.
225. van Cruijssen H, van der Veldt AAM, Vroiling L, Oosterhoff D, Broxterman HJ, Scheper RJ, et al. Sunitinib-Induced Myeloid Lineage Redistribution in Renal Cell Cancer Patients: CD1c+ Dendritic Cell Frequency Predicts Progression-Free Survival. *Clinical Cancer Research* 2008;14:5884–92.
226. Yuan X-K, Zhao X-K, Xia Y-C, Zhu X, Xiao P. Increased circulating immunosuppressive CD14(+)/HLA-DR(-/low) cells correlate with clinical cancer stage and pathological grade in patients with bladder carcinoma. *J. Int. Med. Res.* 2011;39:1381–91.
227. Brusa D, Simone M, Gontero P, Spadi R, Racca P, Micari J, et al. Circulating immunosuppressive cells of prostate cancer patients before and after radical prostatectomy: Profile comparison. *Int J Urol* 2013;:n/a–n/a.
228. Vuk-Pavlovic S, Bulur PA, Lin Y, Qin R, Szumlanski CL, Zhao X, et al. Immunosuppressive CD14+HLA-DRlow/- monocytes in prostate cancer. *Prostate* 2010;70:443–55.
229. Brimnes MK, Vangsted AJ, Knudsen LM, Gimsing P, Gang AO, Johnsen HE, et al. Increased Level of both CD4+FOXP3+ Regulatory T Cells and CD14+HLA-DR–/low Myeloid-Derived Suppressor Cells and Decreased Level of Dendritic Cells in Patients with Multiple Myeloma. *Scandinavian Journal of Immunology* 2010;72:540–7.
230. Ramachandran IR, Martner A, Pisklakova A, Condamine T, Chase T, Vogl T, et al. Myeloid-Derived Suppressor Cells Regulate Growth of Multiple Myeloma by Inhibiting T Cells in Bone Marrow. *J Immunol* 2013;190:3815–23.
231. Lin Y, Gustafson MP, Bulur PA, Gastineau DA, Witzig TE, Dietz AB. Immunosuppressive CD14+HLA-DRlow/- monocytes in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2011;117:872–81.
232. Mougikakos D, Jitschin R, Bahr von L, Poschke I, Gary R, Sundberg B, et al. Immunosuppressive CD14+HLA-DRlow/neg IDO+ myeloid cells in patients following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia* 2013;27:377–88.
233. Romano A, Parrinello NL, Vetro C, Forte S, Chiarenza A, Figuera A, et al. Circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical outcome in Hodgkin Lymphoma patients treated up-front with a risk-adapted strategy. *Br J Haematol* 2014;168:689–700.
234. Mundy-Bosse BL, Young GS, Bauer T, Binkley E, Bloomston M, Bill MA, et al. Distinct myeloid suppressor cell subsets correlate with plasma IL-6 and IL-10 and reduced interferon-alpha signaling in CD4+ T cells from patients with GI malignancy. *Cancer Immunol Immunother* 2011;60:1269–79.
235. Zhao F, Hoechst B, Duffy A, Gamrekelashvili J, Fioravanti S, Manns MP, et al. S100A9 a new marker for monocytic human myeloid-derived suppressor cells. *Immunology* 2012;136:176–83.
236. Mandruzzato S, Solito S, Falisi E, Francescato S, Chiarion-Sileni V, Mocellin S, et al. IL4R + Myeloid-Derived Suppressor Cell Expansion in Cancer Patients. *The Journal of Immunology* 2009;182:6562–8.
237. Kohanbash G, McKaveney K, Sakaki M, Ueda R, Mintz AH, Amankulor N, et al. GM-CSF Promotes the Immunosuppressive Activity of Glioma-Infiltrating Myeloid Cells through Interleukin-4 Receptor. *Cancer Research* 2013;73:6413–23.

238. Obermajer N, Muthuswamy R, Odunsi K, Edwards RP, Kalinski P. PGE2-Induced CXCL12 Production and CXCR4 Expression Controls the Accumulation of Human MDSCs in Ovarian Cancer Environment. *Cancer Research* 2011;71:7463–70.
239. Feng P-H, Lee K-Y, Chang Y-L, Chan Y-F, Kuo L-W, Lin T-Y, et al. CD14(+)/S100A9(+) monocytic myeloid-derived suppressor cells and their clinical relevance in non-small cell lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;186:1025–36.
240. Ko JS, Zea AH, Rini BI, Ireland JL, Elson P, Cohen P, et al. Sunitinib Mediates Reversal of Myeloid-Derived Suppressor Cell Accumulation in Renal Cell Carcinoma Patients. *Clinical Cancer Research* 2009;15:2148–57.
241. Alizadeh D, Trad M, Hanke NT, Larmonier CB, Janikashvili N, Bonnotte B, et al. Doxorubicin Eliminates Myeloid-Derived Suppressor Cells and Enhances the Efficacy of Adoptive T-Cell Transfer in Breast Cancer. *Cancer Research* 2014;74:104–18.
242. Kusmartsev S, Su Z, Heiser A, Dannull J, Eruslanov E, Kubler H, et al. Reversal of Myeloid Cell-Mediated Immunosuppression in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Clinical Cancer Research* 2008;14:8270–8.
243. Daud AI, Mirza N, Lenox B, Andrews S, Urbas P, Gao GX, et al. Phenotypic and Functional Analysis of Dendritic Cells and Clinical Outcome in Patients With High-Risk Melanoma Treated With Adjuvant Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor. *Journal of Clinical Oncology* 2008;26:3235–41.
244. Shen P, Wang A, He M, Wang Q, Zheng S. Increased circulating Lin⁻/lowCD33⁺HLA-DR⁻myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients. *Hepatology* 2013;44:639–50.
245. Iclozan C, Antonia S, Chiappori A, Chen D-T, Gabrilovich D. Therapeutic regulation of myeloid-derived suppressor cells and immune response to cancer vaccine in patients with extensive stage small cell lung cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2013;62:909–18.
246. Chalmin F, Ladoire S, Mignot G, Vincent J, Bruchard M, Remy-Martin J-P, et al. Membrane-associated Hsp72 from tumor-derived exosomes mediates STAT3-dependent immunosuppressive function of mouse and human myeloid-derived suppressor cells. *J Clin Invest* 2010;
247. Tarhini AA, Edington H, Butterfield LH, Lin Y, Shuai Y, Tawbi H, et al. Immune Monitoring of the Circulation and the Tumor Microenvironment in Patients with Regionally Advanced Melanoma Receiving Neoadjuvant Ipilimumab. *PLoS ONE* 2014;9:e87705–9.
248. Rodrigues JC, Gonzalez GC, Zhang L, Ibrahim G, Kelly JJ, Gustafson MP, et al. Normal human monocytes exposed to glioma cells acquire myeloid-derived suppressor cell-like properties. *Neuro-Oncology* 2010;12:351–65.
249. Diaz-Montero CM, Salem ML, Nishimura MI, Garrett-Mayer E, Cole DJ, Montero AJ. Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin–cyclophosphamide chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2008;58:49–59.
250. Gabitass RF, Annels NE, Stocken DD, Pandha HA, Middleton GW. Elevated myeloid-derived suppressor cells in pancreatic, esophageal and gastric cancer are an independent prognostic factor and are associated with significant elevation of the Th2 cytokine interleukin-13. *Cancer Immunol Immunother* 2011;60:1419–30.

251. Sun H-L, Zhou X, Xue Y-F, Wang K, Shen Y-F, Mao J-J, et al. Increased frequency and clinical significance of myeloid-derived suppressor cells in human colorectal carcinoma. *World J. Gastroenterol.* 2012;18:3303–9.
252. Zhang B, Wang Z, Wu L, Zhang M, Li W, Ding J, et al. Circulating and Tumor-Infiltrating Myeloid-Derived Suppressor Cells in Patients with Colorectal Carcinoma. *PLoS ONE* 2013;8:e57114–10.
253. Annels NE, Shaw VE, Gabitass RF, Billingham L, Corrie P, Eatock M, et al. The effects of gemcitabine and capecitabine combination chemotherapy and of low-dose adjuvant GM-CSF on the levels of myeloid-derived suppressor cells in patients with advanced pancreatic cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2013;63:175–83.
254. Sanford DE, Porembka MR, Panni RZ, Mitchem JB, Belt BA, Plambeck-Suess SM, et al. A Study of Zoledronic Acid as Neo-Adjuvant, Perioperative Therapy in Patients with Resectable Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *JCT* 2013;04:797–803.
255. Wang L, Chang EWY, Wong SC, Ong SM, Chong DQY, Ling KL. Increased Myeloid-Derived Suppressor Cells in Gastric Cancer Correlate with Cancer Stage and Plasma S100A8/A9 Proinflammatory Proteins. *The Journal of Immunology* 2013;190:794–804.
256. Corzo CA, Cotter MJ, Cheng P, Cheng F, Kusmartsev S, Sotomayor E, et al. Mechanism Regulating Reactive Oxygen Species in Tumor-Induced Myeloid-Derived Suppressor Cells. *The Journal of Immunology* 2009;182:5693–701.
257. Corzo CA, Condamine T, Lu L, Cotter MJ, Youn JI, Cheng P, et al. HIF-1 regulates function and differentiation of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. *J Exp Med* 2010;207:2439–53.
258. Liu C-Y, Wang Y-M, Wang C-L, Feng P-H, Ko H-W, Liu Y-H, et al. Population alterations of l-arginase- and inducible nitric oxide synthase-expressed CD11b+/CD14-/CD15+/CD33+ myeloid-derived suppressor cells and CD8+ T lymphocytes in patients with advanced-stage non-small cell lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2009;136:35–45.
259. Heuvers ME, Muskens F, Bezemer K, Lambers M, Dingemans A-MC, Groen HJM, et al. Arginase-1 mRNA expression correlates with myeloid-derived suppressor cell levels in peripheral blood of NSCLC patients. *Lung Cancer* 2013;81:468–74.
260. Christiansson L, Söderlund S, Svensson E, Mustjoki S, Bengtsson M, Simonsson B, et al. Increased level of myeloid-derived suppressor cells, programmed death receptor ligand 1/programmed death receptor 1, and soluble CD25 in Sokal high risk chronic myeloid leukemia. *PLoS ONE* 2013;8:e55818.
261. Srivastava MK, Bosch JJ, Thompson JA, Ksander BR, Edelman MJ, Ostrand-Rosenberg S. Lung cancer patients' CD4+ T cells are activated in vitro by MHC II cell-based vaccines despite the presence of myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Immunol Immunother* 2008;57:1493–504.
262. OuYang L-Y, Wu X-J, Ye S-B, Zhang R-X, Li Z-L, Liao W, et al. Tumor-induced myeloid-derived suppressor cells promote tumor progression through oxidative metabolism in human colorectal cancer. *Journal of Translational Medicine* 2015;13:47.
263. Görgün GT, Whitehill G, Anderson JL, Hideshima T, Maguire C, Laubach J, et al. Tumor-promoting immune-suppressive myeloid-derived suppressor cells in the multiple myeloma microenvironment in humans. *Blood* 2013;121:2975–87.

264. Eruslanov E, Neuberger M, Daurkin I, Perrin GQ, Algood C, Dahm P, et al. Circulating and tumor-infiltrating myeloid cell subsets in patients with bladder cancer. *Int. J. Cancer* 2011;130:1109–19.
265. 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;89:311–7.
266. Porembka MR, Mitchem JB, Belt BA, Hsieh C-S, Lee H-M, Herndon J, et al. Pancreatic adenocarcinoma induces bone marrow mobilization of myeloid-derived suppressor cells which promote primary tumor growth. *Cancer Immunol Immunother* 2012;61:1373–85.
267. Haile LA, Wasielewski von R, Gamrekashvili J, Krüger C, Bachmann O, Westendorf AM, et al. Myeloid-Derived Suppressor Cells in Inflammatory Bowel Disease: A New Immunoregulatory Pathway. *Gastroenterology* 2008;135:871–5.
268. Gey A, Tadie J-M, Caumont-Prim A, Hauw-Berlemont C, Cynober L, Fagon J-Y, et al. Granulocytic myeloid-derived suppressor cells inversely correlate with plasma arginine and overall survival in critically ill patients. *Clin Exp Immunol* 2015;180:280–8.
269. Janols H, Bergenfelz C, Allaoui R, Larsson AM, Ryden L, Bjornsson S, et al. A high frequency of MDSCs in sepsis patients, with the granulocytic subtype dominating in gram-positive cases. *J Leukoc Biol* 2014;
270. Tacke RS, Lee H-C, Goh C, Courtney J, Polyak SJ, Rosen HR, et al. Myeloid suppressor cells induced by hepatitis C virus suppress T-cell responses through the production of reactive oxygen species. *Hepatology* 2012;55:343–53.
271. Garg A, Spector SA. HIV Type 1 gp120-Induced Expansion of Myeloid Derived Suppressor Cells Is Dependent on Interleukin 6 and Suppresses Immunity. *J Infect Dis* 2014;209:441–51.
272. Qin A, Cai W, Pan T, Wu K, Yang Q, Wang N, et al. Expansion of Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells Dampens T Cell Function in HIV-1-Seropositive Individuals. *Journal of Virology* 2013;87:1477–90.
273. Bowers NL, Helton ES, Huijbregts RPH, Goepfert PA, Heath SL, Hel Z. Immune Suppression by Neutrophils in HIV-1 Infection: Role of PD-L1/PD-1 Pathway. *PLoS Pathog* 2014;10:e1003993.
274. Cloke T, Munder M, Taylor G, Müller I, Kropf P. Characterization of a Novel Population of Low-Density Granulocytes Associated with Disease Severity in HIV-1 Infection. *PLoS ONE* 2012;7:e48939.
275. 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:R163.
276. Rieber N, Brand A, Hector A, Graepler-Mainka U, Ost M, Schafer I, et al. Flagellin Induces Myeloid-Derived Suppressor Cells: Implications for *Pseudomonas aeruginosa* Infection in Cystic Fibrosis Lung Disease. *J Immunol* 2013;190:1276–84.
277. Bunt SK, Sinha P, Clements VK, Leips J, Ostrand-Rosenberg S. Inflammation Induces Myeloid-Derived Suppressor Cells that Facilitate Tumor Progression. *J Immunol* 2005;176:284–90.

278. Bunt SK, Yang L, Sinha P, Clements VK, Leips J, Ostrand-Rosenberg S. Reduced Inflammation in the Tumor Microenvironment Delays the Accumulation of Myeloid-Derived Suppressor Cells and Limits Tumor Progression. *Cancer Research* 2007;67:10019–26.
279. Sinha P, Clements VK, Fulton AM, Ostrand-Rosenberg S. Prostaglandin E2 Promotes Tumor Progression by Inducing Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Research* 2007;67:4507–13.
280. Song X, Krelin Y, Dvorkin T, Bjorkdahl O, Segal S, Dinarello CA, et al. CD11b+/Gr-1+ Immature Myeloid Cells Mediate Suppression of T Cells in Mice Bearing Tumors of IL-1 -Secreting Cells. *J Immunol* 2005;175:8200–8.
281. Gabrilovich D, Ishida T, Oyama T, Ran S, Kravtsov V, Nadaf S, et al. Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo. *Blood* 1998;92:4150–66.
282. Kujawski M, Kortylewski M, Lee H, Herrmann A, Kay H, Yu H. Stat3 mediates myeloid cell-dependent tumor angiogenesis in mice. *J Clin Invest* 2008;118:3367–77.
283. Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, et al. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 1992;176:1693–702.
284. Serafini P, Carbley R, Noonan KA, Tan G, Bronte V, Borrello I. High-dose granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-producing vaccines impair the immune response through the recruitment of myeloid suppressor cells. *Cancer Research* 2004;64:6337–43.
285. Lieschke GJ, Grail D, Hodgson G, Metcalf D, Stanley E, Cheers C, et al. Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization. *Blood* 1994;84:1737–46.
286. Okazaki T. Granulocyte colony-stimulating factor promotes tumor angiogenesis via increasing circulating endothelial progenitor cells and Gr1+CD11b+ cells in cancer animal models. *International Immunology* 2005;18:1–9.
287. Waight JD, Hu Q, Miller A, Liu S, Abrams SI. Tumor-Derived G-CSF Facilitates Neoplastic Growth through a Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cell-Dependent Mechanism. *PLoS ONE* 2011;6:e27690–15.
288. Markiewski MM, DeAngelis RA, Benencia F, Ricklin-Lichtsteiner SK, Koutoulaki A, Gerard C, et al. Modulation of the antitumor immune response by complement. *Nat Immunol* 2008;9:1225–35.
289. Sinha P, Okoro C, Foell D, Freeze HH, Ostrand-Rosenberg S, Srikrishna G. Proinflammatory S100 Proteins Regulate the Accumulation of Myeloid-Derived Suppressor Cells. *J Immunol* 2008;181:4666–75.
290. Bianchi ME, Manfredi AA. High-mobility group box 1 (HMGB1) protein at the crossroads between innate and adaptive immunity. *Immunol. Rev.* 2007;220:35–46.
291. Vénéreau E, Casalgrandi M, Schiraldi M, Antoine DJ, Cattaneo A, De Marchis F, et al. Mutually exclusive redox forms of HMGB1 promote cell recruitment or proinflammatory cytokine release. *J Exp Med* 2012;209:1519–28.
292. Parker KH, Sinha P, Horn LA, Clements VK, Yang H, Li J, et al. HMGB1 Enhances Immune Suppression by Facilitating the Differentiation and Suppressive Activity of Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Research* 2014;74:5723–33.

293. He D, Li H, Yusuf N, Elmets CA, Li J, Mountz JD, et al. IL-17 Promotes Tumor Development through the Induction of Tumor Promoting Microenvironments at Tumor Sites and Myeloid-Derived Suppressor Cells. *J Immunol* 2010;184:2281–8.
294. Yazawa T, Shibata M, Gonda K, Machida T, Suzuki S, Kenjo A, et al. Increased IL-17 production correlates with immunosuppression involving myeloid-derived suppressor cells and nutritional impairment in patients with various gastrointestinal cancers. *Mol Clin Oncol* 2013;1:675–9.
295. Bromberg J. Stat proteins and oncogenesis. *J Clin Invest* 2002;109:1139–42.
296. Cheng P, Corzo CA, Luetsteke N, Yu B, Nagaraj S, Bui MM, et al. Inhibition of dendritic cell differentiation and accumulation of myeloid-derived suppressor cells in cancer is regulated by S100A9 protein. *J Exp Med* 2008;205:2235–49.
297. Kusmartsev S, Gabrilovich DI. STAT1 Signaling Regulates Tumor-Associated Macrophage-Mediated T Cell Deletion. *J Immunol* 2005;174:4880–91.
298. Movahedi K, Williams M, Van den Bossche J, Van den Bergh R, Gysemans C, Beschin A, et al. Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood* 2008;111:4233–44.
299. Bronte V, Serafini P, De Santo C, Marigo I, Tosello V, Mazzoni A, et al. IL-4-Induced Arginase 1 Suppresses Alloreactive T Cells in Tumor-Bearing Mice. *J Immunol* 2003;170:270–8.
300. Rutschman R, Lang R, Hesse M, Ihle JN, Wynn TA, Murray PJ. Cutting Edge: Stat6-Dependent Substrate Depletion Regulates Nitric Oxide Production. *J Immunol* 2001;166:2173–7.
301. Terabe M, Matsui S, Park J-M, Mamura M, Noben-Trauth N, Donaldson DD, et al. Transforming Growth Factor- β Production and Myeloid Cells Are an Effector Mechanism through Which CD1d-restricted T Cells Block Cytotoxic T Lymphocyte-mediated Tumor Immunosurveillance. *J Exp Med* 2003;198:1741–52.
302. 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;204:1463–74.
303. Markiewski MM, Lambris JD. The Role of Complement in Inflammatory Diseases From Behind the Scenes into the Spotlight. *Am. J. Pathol.* 2010;171:715–27.
304. Bronte V, Zanovello P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat Rev Immunol* 2005;5:641–54.
305. Rodríguez PC, Ochoa AC. Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives. *Immunol. Rev.* 2008;222:180–91.
306. Rodríguez PC, Quiceno DG, Ochoa AC. L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression. *Blood* 2007;109:1568–73.
307. Rodríguez PC, Hernandez CP, Quiceno D, Dubinett SM, Zabaleta J, Ochoa JB, et al. Arginase I in myeloid suppressor cells is induced by COX-2 in lung carcinoma. *J Exp Med* 2005;202:931–9.
308. Tadie J-M, Trinquart L, Jannièrè-Nartey C, Guerot E, Louis B, Fagon J-Y, et al. Prediction of nosocomial infection acquisition in ventilated patients by nasal nitric oxide: proof-of-concept study. *Shock* 2010;34:217–21.

309. Raber PL, Thevenot P, Sierra R, Wyczechowska D, Halle D, Ramirez ME, et al. Subpopulations of myeloid-derived suppressor cells impair T cell responses through independent nitric oxide-related pathways. *Int. J. Cancer* 2013;134:2853–64.
310. Bogdan C. Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update. *Trends in Immunology* 2015;36:161–78.
311. Mazzoni A, Bronte V, Visintin A, Spitzer JH, Apolloni E, Serafini P, et al. Myeloid Suppressor Lines Inhibit T Cell Responses by an NO-Dependent Mechanism. *J Immunol* 2002;168:689–95.
312. Santhanam L, Lim HK, Lim HK, Miriel V, Brown T, Patel M, et al. Inducible NO Synthase Dependent S-Nitrosylation and Activation of Arginase1 Contribute to Age-Related Endothelial Dysfunction. *Circ. Res.* 2007;101:692–702.
313. Curti A, TrabANELLI S, Salvestrini V, Baccarani M, Lemoli RM. The role of indoleamine 2,3-dioxygenase in the induction of immune tolerance: focus on hematology. *Blood* 2009;113:2394–401.
314. Zelante T, Fallarino F, Bistoni F, Puccetti P, Romani L. Indoleamine 2,3-dioxygenase in infection: the paradox of an evasive strategy that benefits the host. *Microbes Infect.* 2009;11:133–41.
315. Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B, et al. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 1998;281:1191–3.
316. Boasso A, Herbeuval J-P, Hardy AW, Anderson SA, Dolan MJ, Fuchs D, et al. HIV inhibits CD4+ T-cell proliferation by inducing indoleamine 2,3-dioxygenase in plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 2007;109:3351–9.
317. Uyttenhove C, Pilotte L, Théate I, Stroobant V, Colau D, Parmentier N, et al. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nature Medicine* 2003;9:1269–74.
318. Yu J, Du W, Yan F, Wang Y, Li H, Cao S, et al. Myeloid-Derived Suppressor Cells Suppress Antitumor Immune Responses through IDO Expression and Correlate with Lymph Node Metastasis in Patients with Breast Cancer. *J Immunol* 2013;190:3783–97.
319. Jitschin R, Braun M, Büttner M, Dettmer-Wilde K, Bricks J, Berger J, et al. CLL-cells induce IDOhi CD14+HLA-DRlo myeloid-derived suppressor cells that inhibit T-cell responses and promote TRegs. *Blood* 2014;124:750–60.
320. Rada BK. Dual role of phagocytic NADPH oxidase in bacterial killing. *Blood* 2004;104:2947–53.
321. Geiszt M, Kapus A, Ligeti E. Chronic granulomatous disease: more than the lack of superoxide? *J Leukoc Biol* 2001;69:191–6.
322. Kusmartsev S, Nefedova Y, Yoder D, Gabilovich DI. Antigen-Specific Inhibition of CD8+ T Cell Response by Immature Myeloid Cells in Cancer Is Mediated by Reactive Oxygen Species. *J Immunol* 2004;172:989–99.
323. Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell. Physiol. Biochem.* 2001;11:173–86.
324. Lu T, Ramakrishnan R, Altiock S, Youn J-I, Cheng P, Celis E, et al. Tumor-infiltrating myeloid cells induce tumor cell resistance to cytotoxic T cells in mice. *J Clin Invest* 2011;121:4015–29.

325. Molon B, Ugel S, Del Pozzo F, Soldani C, Zilio S, Avella D, et al. Chemokine nitration prevents intratumoral infiltration of antigen-specific T cells. *J Exp Med* 2011;208:1949–62.
326. Seddiki N. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med* 2006;203:1693–700.
327. Murdoch DM, Staats JS, Weinhold KJ. OMIP-006: Phenotypic subset analysis of human T regulatory cells via polychromatic flow cytometry. *Cytometry* 2012;81A:281–3.
328. Huang B. Gr-1+CD115+ Immature Myeloid Suppressor Cells Mediate the Development of Tumor-Induced T Regulatory Cells and T-Cell Anergy in Tumor-Bearing Host. *Cancer Research* 2006;66:1123–31.
329. Zoso A, Mazza EMC, Bicciato S, Mandruzzato S, Bronte V, Serafini P, et al. Human fibrocytic myeloid-derived suppressor cells express IDO and promote tolerance via Treg-cell expansion. *Eur. J. Immunol.* 2014;44:3307–19.
330. Voisin MB, Buzoni-Gatel D, Bout D, Velge-Roussel F. Both Expansion of Regulatory GR1+ CD11b+ Myeloid Cells and Anergy of T Lymphocytes Participate in Hyporesponsiveness of the Lung-Associated Immune System during Acute Toxoplasmosis. *Infect Immun* 2004;72:5487–92.
331. Goñi O, Alcaide P, Fresno M. Immunosuppression during acute *Trypanosoma cruzi* infection: involvement of Ly6G (Gr1(+))CD11b(+) immature myeloid suppressor cells. *International Immunology* 2002;14:1125–34.
332. Mencacci A, Montagnoli C, Bacci A, Cenci E, Pitzurra L, Spreca A, et al. CD80+Gr-1+ Myeloid Cells Inhibit Development of Antifungal Th1 Immunity in Mice with Candidiasis. *J Immunol* 2002;169:3180–90.
333. 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;207:1453–64.
334. Brudecki L, Ferguson DA, McCall CE, Gazzar EI M. Myeloid-Derived Suppressor Cells Evolve during Sepsis and Can Enhance or Attenuate the Systemic Inflammatory Response. *Infect Immun* 2012;80:2026–34.
335. Zhu B, Bando Y, Xiao S, Yang K, Anderson AC, Kuchroo VK, et al. CD11b+Ly-6Chi Suppressive Monocytes in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol* 2007;179:5228–37.
336. 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;176:2085–94.
337. Hume DA. Macrophages as APC and the dendritic cell myth. *The Journal of Immunology* 2008;181:5829–35.
338. Segura E, Valladeau-Guilemond J, Donnadieu MH, Sastre-Garau X, Soumelis V, Amigorena S. Characterization of resident and migratory dendritic cells in human lymph nodes. *J Exp Med* 2012;209:653–60.
339. Mandruzzato S, Brandau S, Britten CM, Bronte V, Damuzzo V, Gouttefangeas C, et al. Toward harmonized phenotyping of human myeloid-derived suppressor cells by flow cytometry: results from an interim study. *Cancer Immunol Immunother* 2015;65:161–9.

340. Pillay J, Tak T, Kamp VM, Koenderman L. Immune suppression by neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: similarities and differences. *Cell. Mol. Life Sci.* 2013;70:3813–27.
341. Han X, Jorgensen JL, Brahmandam A, Schlette E, Huh YO, Shi Y, et al. Immunophenotypic study of basophils by multiparameter flow cytometry. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2008;132:813–9.
342. Jenabian M-A, El-Far M, Vyboh K, Kema I, Costiniuk CT, Thomas R, et al. Immunosuppressive Tryptophan Catabolism and Gut Mucosal Dysfunction Following Early HIV Infection. *J Infect Dis* 2015;212:355–66.
343. Gibot S, Massin F, Cravoisy A, Barraud D, Nace L, Levy B, et al. High-mobility group box 1 protein plasma concentrations during septic shock. *Intensive Care Med* 2007;33:1347–53.
344. Loeckinger A, Kleinsasser A, Lindner KH, Margreiter J, Keller C, Hoermann C. Continuous positive airway pressure at 10 cm H₂O during cardiopulmonary bypass improves postoperative gas exchange. *Anesth Analg* 2000;91:522–7.
345. Russell DG, Cardona P-J, Kim M-J, Allain S, Altare F. Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. *Nat Immunol* 2009;10:943–8.

VU :

Le Directeur de Thèse
(Nom et Prénom)

VU :

Le Responsable de l'École Doctorale

VU pour autorisation de soutenance

Rennes, le

Le Président de l'Université de Rennes 1

Guy CATHELINÉAU

VU après soutenance pour autorisation de publication :

Le Président de Jury,
(Nom et Prénom)

RÉSUMÉ

Le sepsis est à l'origine d'une dysfonction immunitaire prolongée responsable d'infections nosocomiales et d'une mortalité tardive élevée. Sa physiologie complexe demeure mal connue et il n'existe aucun traitement spécifique en dehors de l'antibiothérapie et des thérapeutiques de suppléance d'organes. Nous nous sommes intéressés au rôle des cellules myéloïdes dans cette dysfonction immunitaire.

Nous avons pu montrer qu'il existe chez les patients atteints de sepsis une augmentation du nombre de cellules suppressives d'origine myéloïde monocytaires (M-MDSC) CD14⁺HLA-DR^{low/-} et granulocytaires (G-MDSC) identifiées comme des granulocytes de faible densité CD14⁻CD15⁺. Ces cellules sont responsables d'une activité IDO et arginase 1, et leur déplétion permet de restaurer la prolifération des lymphocytes T *in vitro*. L'augmentation précoce des G-MDSC prédit la survenue ultérieure d'infections nosocomiales. De même, l'augmentation de l'activité IDO et de l'arginase 1 plasmatique est associée à un mauvais pronostic.

Au total, nous avons pu démontrer que les cellules myéloïdes acquièrent un phénotype suppresseur en partie responsable de l'immunodépression acquise et du pronostic péjoratif chez les patients septiques. Afin de restaurer les capacités immunitaires des patients, les MDSC pourraient devenir une future cible thérapeutique.

ABSTRACT

Sepsis results in a sustained immune dysfunction responsible for poor prognosis and nosocomial infections. Sepsis physiology remains poorly understood and no treatment exists currently, excepted from antibiotherapy and life-support techniques. We asked if myeloid cells could play a role in this sustained immune dysfunction.

We demonstrated that Peripheral CD14⁺HLA-DR^{low/-} monocytic-myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) and CD14⁻CD15⁺ low-density granulocytes identified as granulocytic- (G-)MDSCs were increased in septic patients. *In vitro*, arginase and IDO activities relied on MDSCs and depletion of both subsets restored T-cell proliferation. The initial proportion of G-MDSC predicted occurrence of nosocomial infections. Similarly, high plasma IDO activity and arginase 1 level were associated with poor outcome.

Altogether, our results demonstrate that myeloid cells acquire suppressive functions during sepsis, partially responsible for the sustained immune dysfunction and poor outcome. MDSCs may become a future therapeutic target to restore the immune capacities of septic patients.