



HAL
open science

Expression du récepteur de l'interleukine 7 et altérations des lymphocytes T au cours du sepsis : approche clinique et expérimentale

Julie Mouillaux

► To cite this version:

Julie Mouillaux. Expression du récepteur de l'interleukine 7 et altérations des lymphocytes T au cours du sepsis : approche clinique et expérimentale. Médecine humaine et pathologie. Université de Lyon, 2018. Français. NNT : 2018LYSE1089 . tel-01881107

HAL Id: tel-01881107

<https://theses.hal.science/tel-01881107>

Submitted on 25 Sep 2018

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

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



N°d'ordre NNT : 2018LYSE1089

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de

l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences et Santé

N°205

Spécialité de doctorat :

Biologie

Soutenue publiquement le 4 juin 2018, par :

Julie MOUILLAUX

Expression du récepteur de l'interleukine 7 et altérations des lymphocytes T au cours du sepsis : approche clinique et expérimentale

Devant le jury composé de :

Pr Lelièvre Jean-Daniel, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, CHU Henri Mondor (Examineur)

Dr Pachot Alexandre, Directeur R&D, bioMérieux (Examineur)

Dr Roger Thierry, Privat-Docent et maître d'enseignement et de recherche, laboratoire des maladies infectieuses CHUV (Rapporteur)

Pr Taylor Naomi, Directrice de Recherche INSERM, Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier (Rapporteur)

Dr Venet Fabienne, Maître de conférences-Praticien Hospitalier, EA7426 Physiopathology of Injury Induced Immunosuppression (Directrice de thèse)

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

M. le Professeur Frédéric FLEURY

Président du Conseil Académique

M. le Professeur Hamda BEN HADID

Vice-président du Conseil d'Administration

M. le Professeur Didier REVEL

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

Vice-président de la Commission Recherche

M. Fabrice VALLÉE

Directrice Générale des Services

Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur G.RODE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles
Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. X. PERROT

Département de formation et Centre de Recherche en
Biologie Humaine

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme C. FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. Y.VANPOULLE

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. le Professeur E.PERRIN

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. N. LEBOISNE

Remerciements

Aux membres de mon jury

Au Professeur Jean Daniel Lelièvre, merci pour nos échanges lors de mon comité de suivi de thèse et merci d'avoir accepté de participer à l'évaluation finale de mes travaux lors de la soutenance.

Au Docteur Alexandre Pachot, merci pour nos échanges lors de différentes occasions à HEH et ailleurs et merci d'avoir accepté de participer à l'évaluation finale de mes travaux lors de la soutenance.

Au Professeur Naomi Taylor et au Docteur Thierry Roger, merci d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse en étant à la fois rapporteur et membre du jury de soutenance.

À mes encadrantes

À Fabienne, merci de m'avoir confié ce projet et de m'avoir encadré tout au long de ces trois années. Merci pour ta confiance, ta disponibilité et ton écoute. Merci pour nos discussions scientifiques et autres. Merci de m'avoir apporté toutes ces connaissances en immunologie et en cytométrie. Merci de m'avoir transmis une partie de ta passion pour la recherche, je la garderai précieusement.

À Estelle, mille mercis. Je ne pourrai pas tous les écrire ici. Merci pour ta confiance et merci de m'avoir permis de mener ce projet à bien. Merci pour tes conseils scientifiques et également administratifs. Merci pour ton aide sur les présentations, la rédaction des articles et de la thèse. Merci pour ton soutien perpétuel, tes encouragements et ta patience. Merci pour ton aide précieuse à tous les niveaux. J'ai beaucoup progressé grâce à toi et je garderai un très bon souvenir de ton encadrement sur ce projet. Merci pour toute cette bonne humeur, ces sourires et ces rires durant ces trois années. (PS : il y a un double espace caché dans ce paragraphe).

À mes collègues,

À Virginie, merci pour tes conseils scientifiques mais surtout humains.

À Julien, merci pour nos échanges, ta pédagogie et ton aide scientifique sur les aspects statistique et clinique parmi d'autres.

Au Professeur Guillaume Monneret, un grand merci pour toute l'aide apportée sur ce projet et pour les précieux conseils.

À François, Karen et Sophie, merci pour nos échanges lors des lundis (ou vendredis ?) des PhDs.

À Olivier, merci pour toute l'aide que tu m'as apportée, des graphes sur R au soutien de tous les jours en passant bien sûr par la pyramide de tictacs. Bon courage pour arriver au bout, tu verras la fin de la thèse c'est pas aussi difficile que ce qu'on pense (haha).

À Babeth, merci de m'avoir formé en labo à mon arrivée, merci d'avoir partagé tes connaissances et de m'avoir aidé à résoudre des problèmes techniques de toutes sortes tout au long de ces trois années. Merci aussi pour ta bonne humeur.

À Camille, merci pour cette belle retrouvaille inattendue, après toutes ces années. Merci pour tout ce que tu as apporté à ce projet, pour ta motivation et ton investissement.

À Morgane, merci pour nos échanges et tes conseils lors des TGIF et en dehors. Ça a été un plaisir de partager ces voyages à Paris, Reims et Grenoble et de réviser ensemble pour le DU de cytométrie !

À Ana, merci pour ta motivation et ton implication dans ton stage. Merci pour tout le travail que tu as fourni et pour cette bonne humeur.

À Anne, merci pour ton aide au laboratoire d'Immuno.

À Jérémy, merci pour ton accueil, merci de m'avoir expliqué le fonctionnement de Convergence, Ulysse, Gestor etc... Merci pour la formation appel au 5555 dès la première semaine de thèse. Très heureuse que l'on soit restés amis après ton départ.

À Florian, Charline, Fabien, Boris, Audrey B, Paola, merci pour les afterworks, les pique-niques au parc, les midis boulangerie et merci pour votre aide et votre soutien pendant cette thèse.

To Dina, thank you for your help and support. I wish you all the best, I am sure you will manage everything perfectly.

À Thibaut, merci pour ton aide, pour avoir partagé tes connaissances et pour ta bonne humeur.

À Marine, merci pour ton soutien et ta gentillesse. Bon courage pour les dernières semaines !

À Chloé, Cindy, Audrey G, Nathalie, Asma, Mary-Luz, Bertrand, Maxime, Camille J, Mélissa, Amel, Natacha, merci pour votre aide scientifique et votre soutien, merci pour les rires, pour tous ces moments partagés.

À mes proches,

À mes parents, merci pour votre soutien infailible, pour m'avoir permis d'arriver ici et d'être ce que je suis aujourd'hui.

À Romain, un grand merci pour ton soutien, ta patience, ton réconfort. Merci pour tout ce bonheur. Simplement heureuse à tes côtés.

À ma tante Marie, merci pour nos belles discussions et nos fous rires, merci pour ton soutien.

À Oriane, merci d'être là pour moi, merci de toujours proposer de nouvelles découvertes, raquettes sans raquettes, randonnée avec raquettes, canoë avec canoë et bien d'autres ... Merci pour ces belles aventures durant ces 3 années de thèse mais aussi toutes celles partagées auparavant. Prête à en vivre encore et encore sans jamais me lasser.

À celles avec qui j'ai grandi, la click, du primaire au lycée, merci pour tous ces moments partagés qui ont participé à me construire. Je compte en vivre bien d'autres encore.

À mes amis, merci pour tous ces moments de bonheur et de pause qui m'ont tant aidés, du ski au Canoë, de Marseille à Paris en passant par Hambourg, Porto et Genève, des festivals aux concerts plus ou moins alternatifs, des fondues aux sushis, de top chef à Games of Thrones etc.. Mille fois merci pour toute la joie que vous m'avez apportée et toute celle que nous partagerons dans les années à venir.

Sommaire

Table des figures	10
Table des tableaux	11
Abréviations	12
Introduction	14
Revue de la littérature	16
1. Les syndromes septiques	16
1.1 Définition	16
1.2 Epidémiologie	17
1.2.1 Incidence en France et dans le monde	17
1.2.2 Coût de la prise en charge des patients septiques	18
1.2.3 Mortalité	18
1.2.4 Etiologie infectieuse	20
1.2.5 Facteurs de risque et de gravité	21
1.3 Diagnostic	22
1.3.1 Diagnostic clinique	22
1.3.2 Diagnostic microbiologique	23
1.3.3 Biomarqueurs diagnostiques de l'infection	24
1.4 Prise en charge thérapeutique	24
1.4.1 Contrôle de l'infection	25
1.4.2 Prise en charge hémodynamique	26
1.4.3 Prise en charge des défaillances d'organes	27
2. Initiation de la réponse immunitaire lors du sepsis	28
2.1 Reconnaissance microbienne	29
2.1.1 Récepteurs TLR	29
2.1.2 Récepteurs NLR	30
2.1.3 Récepteurs CLR	31
2.2 Orage cytokinique	31

2.3	Conséquences de la réponse inflammatoire initiale	32
2.3.1	Activation du complément	32
2.3.2	Coagulation.....	33
2.3.3	Réponse du système nerveux central	34
2.3.4	Altérations du métabolisme cellulaire	34
2.4	Echec des stratégies thérapeutiques	35
3.	Immunosuppression.....	37
3.1	Immunité innée	37
3.1.1	Polynucléaires neutrophiles et cellules myéloïdes suppressives	37
3.1.2	Monocytes et macrophages	39
3.1.3	Cellules dendritiques	39
3.1.4	Cellules Natural Killer (NK)	40
3.1.5	Lymphocytes T $\gamma\delta$	40
3.2	Immunité adaptative hors lymphocytes T : lymphocytes B	40
3.3	Altérations lymphocytaires T lors d'un sepsis	41
3.3.1	Lymphopénie et apoptose.....	41
3.3.2	Notion d'épuisement lymphocytaire	43
3.3.3	Altérations phénotypiques	44
3.3.4	Altérations fonctionnelles	46
3.3.5	Lymphocytes Treg.....	47
3.3.6	Altérations bioénergétiques.....	47
3.4	Vers de nouvelles stratégies thérapeutiques	49
4.	L'interleukine 7 et son récepteur	51
4.1	La cytokine IL-7	51
4.1.1	Gène et protéine IL-7.....	51
4.1.2	Le récepteur de l'IL-7.....	51
4.1.3	Rôle de l'IL-7	53
4.1.4	Voies de signalisation	53
4.1.5	La TSLP, un analogue de l'IL-7	54
4.1.6	IL-7 et glucose.....	55

4.2	Forme soluble du récepteur de l'IL-7	55
4.2.1	Protéine et transcrits.....	55
4.2.2	Rôle de la protéine soluble sCD127.....	56
4.3	Régulation physiologique du récepteur de l'IL-7	57
4.3.1	Au cours de l'activation lymphocytaire T	57
4.3.2	Suite à la stimulation par de l'IL-7.....	58
4.3.3	Suite à la stimulation par d'autres cytokines	59
4.3.4	Régulation due au vieillissement.....	60
4.4	Régulation pathologique	60
4.4.1	Autoimmunité et inflammation chronique	60
4.4.2	Cancers	62
4.4.3	Epuisement lymphocytaire.....	63
4.4.4	Sepsis.....	65
4.5	Les traitements ciblant la voie IL-7/IL-7R.....	66
4.5.1	Traitement par des agents bloquants le récepteur de l'IL-7.....	66
4.5.2	Traitement par de l'IL-7 recombinante	67
5.	Conclusion	70
	Résultats	71
1.	Présentation du projet de thèse	71
2.	Elevated soluble IL-7 receptor concentration in non-survivor ICU patients.....	72
3.	Low IL-7 receptor mRNA expression is independently associated with day 28 mortality in septic shock patients	79
4.	Regulation of the soluble CD127 protein and corresponding transcripts in septic shock	112
5.	TCR activation mimics CD127 ^{low} PD-1 ^{high} phenotype and functional alterations of T lymphocytes from septic shock patients	127
6.	An optimized protocol for adenosine triphosphate quantification in T lymphocytes of lymphopenic patients.....	176
	Discussion	185
	Conclusion et perspectives	197
	Références	199

Table des figures

Figure 1: Courbes de survie de Kaplan-Meier d'individus septiques (n=970) et non septiques (n=28 694) dans les six ans suivant le diagnostic	19
Figure 2 : Nombre de cas de sepsis en fonction de l'origine infectieuse aux Etats-Unis de 1979 à 2000 .	20
Figure 3: Prise en charge des patients septiques.....	25
Figure 4 : Réponse immunitaire de l'hôte à une infection et lors d'un sepsis	28
Figure 5 : Reconnaissance des composés microbiens par les TLR	29
Figure 6 : Coagulation intravasculaire disséminée dans le sepsis.....	33
Figure 7 : Effet du système nerveux autonome sur l'inflammation pendant le sepsis.....	34
Figure 8 : Efficacité thérapeutique de traitements potentiels du sepsis	35
Figure 9: Impact du sepsis sur l'immunité innée (a) et adaptative (b).....	37
Figure 10: Diminution significative de la population de lymphocytes T CD4+ dans la rate d'un patient septique en comparaison avec un patient de réanimation non septique	41
Figure 11: Voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose	42
Figure 12: Epuisement des lymphocytes T CD8	44
Figure 13: Les différentes voies métaboliques utilisées par les lymphocytes T tout au long de leur différenciation	48
Figure 14: Les immunothérapies dans le sepsis	49
Figure 15: Expression du récepteur de l'IL-7 à la surface des lymphocytes au cours de leur maturation et différenciation	52
Figure 16 : Voie de signalisation de l'IL-7	54
Figure 17: Epissage alternatif de l'ARNm de l'IL7R.	56
Figure 18 : Régulation de l'expression de différents récepteurs de cytokines à la surface des lymphocytes T lors de la réponse immunitaire	58
Figure 19: Association entre les SNP <i>IL7R</i> et <i>DDX39B</i> et le risque de développer une sclérose en plaque	61
Figure 20 : Expression du CD127 membranaire sur des lymphocytes T purifiés de volontaires sains en réponse à différents stimulants	188
Figure 21: Rôles de PD-1 dans les infections aiguës, la tolérance et le cancer.....	193

Table des tableaux

Tableau 1 : Sequential Organ Failure Assessment Score.....	17
Tableau 2 : Manifestations cliniques du sepsis et du choc septique.....	23

Abréviations

AA : Acides Aminés
BAD : BCL-2 antagonist of cell death
BAX : BCL-2 associated X protein
BCL2 : B Cell Lymphoma 2
BCL-XL : B-Cell Lymphoma-extra large
BIM : BCL2 homology 3 only
CBL-B : Casistas B-lineage lymphoma B
CD127 soluble : sCD127
CDC25A : Cell Division Cycle 25 homologue A
CMV : Cytomégalovirus
CLP : Cecal Ligation and Puncture
CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4
CLR : C-type Lectin Receptor
CRP : C-Reactive Protein
DAMP : Danger Associated Molecular Patterns
FDA : Food and Drug Administration
GM-CSF : Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
HLA-DR : Human Leucocyte Antigen D-Related
IFN γ : Interferon gamma
IL : Interleukine
IL-7R : Récepteur de l'IL-7
ILC : Innate Lymphoid Cells
J0 : Jour 0 après le diagnostic
JAK : Janus Kinase
LAG-3 : Lymphocyte Activation Gene 3
LCMV : Lymphocytic Choriomeningitis Virus
LPS : lipopolysaccharide
MCL1 : Myeloid Cell Leukemia Sequence 1
MDSC : Myeloid Derived Suppressor Cells
MIF : Macrophage migration Inhibitory Factor
mRNA : ARN messenger

mTOR : mechanistic target of rapamycin
NK : Natural Killer
NET : Neutrophil Extracellular Traps
NF- κ B: Nuclear Factor-kappaB
NLR : Nucleotide oligomerization domain Like Receptor
OXPHOS : Phosphorylation oxydative
PAMP : Pathogen Associated Molecular Patterns
PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cells
PCT : Procalcitonine
PD-1 : Programm Cell Death 1
PI3K : Phosphatidylinositol-3-Kinase
sCD127 : CD127 soluble
SNP : Single Nucleotide Polymorphism
SOFA : Sequential Organ Failure Assesment
SRIS : Syndrome de Réponse Inflammatoire Systémique
STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription
TCR : T Cell Receptor
TIGIT : T cell ImmunoGlobulin and ITIM domain
TIM-3 : T-Cell Immunoglobulin and mucin domain containing Molecule 3
TLR : Toll Like Receptor
TNF α : Tumor Necrosis Factor α
TRAIL : TNF Related Apoptosis Inducing Ligand
Treg : T régulateurs
TSLP : Thymic Stromal Lymphopietin
qSOFA : quickSOFA

Introduction

Le sepsis est actuellement la première cause de décès en réanimation. Cette pathologie est définie comme une réponse dérégulée de l'hôte face à une infection, associée à des dysfonctions d'organes pouvant causer la mort du patient (1). Avec près de cinq millions de décès annuels dans le monde, le sepsis est un problème majeur de santé publique (2). Malgré des progrès dans la prise en charge des patients, le taux de mortalité du choc septique, la forme la plus grave du sepsis, atteint encore aujourd'hui 40 à 50 % (3).

Un état d'immunosuppression se met rapidement en place chez les patients septiques impactant à la fois l'immunité innée et adaptative (4). En particulier, les lymphocytes T de patients septiques entrent dans un état dit d'épuisement et deviennent dysfonctionnels (5). Ces altérations sont associées à la mortalité (6). Afin de restaurer la fonctionnalité des lymphocytes T, l'interleukine (IL) 7 est proposée comme traitement immunostimulant. Dans un modèle murin de sepsis, le traitement par de l'IL-7 permettait d'augmenter la prolifération des lymphocytes T et de réduire la mortalité (7). Une étude menée au sein du laboratoire a montré que l'ajout d'IL-7 *ex vivo* sur des cellules de patients entraînait une augmentation significative de la prolifération lymphocytaire (8). Suite à ces études précliniques, un essai clinique de phase II a été mis en place et récemment complété (9). Des patients en choc septique atteints d'une lymphopénie sévère ont été sélectionnés. Le traitement par de l'IL-7 a permis d'augmenter le nombre de leurs lymphocytes T circulants sans induire d'effet secondaire majeur.

L'IL-7 agit via son récepteur exprimé majoritairement à la surface des lymphocytes T (10). Le récepteur membranaire de l'IL-7 est composé de deux chaînes, une chaîne spécifique CD127 et une chaîne commune CD132. Il existe également une forme soluble du CD127 (sCD127). Au niveau transcriptionnel, différents variants ont été mis en évidence : un variant correspondant à la forme membranaire et d'autres variants correspondant à des formes solubles potentielles (11). L'expression du récepteur de l'IL-7 n'a été que peu évaluée dans le sepsis. Il semblerait que l'expression du CD127 à la surface des lymphocytes T de patients ne soit pas régulée (5, 8). Concernant la forme soluble, une étude du laboratoire a mis en évidence une association potentielle entre la concentration plasmatique de sCD127 et la mortalité des patients en choc septique (12). En revanche, les différents transcrits n'ont jamais été étudiés chez des patients septiques. De plus, le phénotype CD127^{low}PD-1^{high} considéré comme un marqueur d'épuisement des lymphocytes T dans d'autres contextes pathologiques comme les infections chroniques ou le cancer, n'a jamais été étudié dans le sepsis (13, 14).

Dans ce contexte, le but de ce projet de thèse est double. Tout d'abord, il s'agit d'évaluer l'expression du récepteur de l'IL-7 comme biomarqueur dans le sepsis ainsi que d'étudier sa régulation chez les patients. L'objectif est également d'étudier le phénotype CD127^{low}PD-1^{high} en lien avec les altérations lymphocytaires T des patients septiques. Dans un second temps, l'objectif est de mettre au point un modèle *ex vivo*, à partir de lymphocytes T purifiés de volontaires sains, reproduisant les altérations phénotypiques et fonctionnelles intrinsèques aux lymphocytes T de patients septiques. La mise au point de ce modèle a pour but de mieux comprendre la physiopathologie des altérations des lymphocytes T dans le sepsis mais également de créer un outil permettant d'explorer de nouveaux aspects de ces altérations.

Revue de la littérature

1. Les syndromes septiques

1.1 Définition

Le sepsis fut d'abord défini en 1991 comme un syndrome clinique caractérisé par la présence simultanée d'une infection et d'un Syndrome de Réponse Inflammatoire Systémique (SRIS). Le SRIS était alors défini par la présence d'au moins deux des critères suivants : une température supérieure à 38 °C ou inférieure à 36 °C, une fréquence cardiaque supérieure à 90 battements par minute, une fréquence respiratoire supérieure à 20 respirations par minute et un compte de leucocytes supérieur à 12 000 cellules/mm³ ou inférieur à 4 000 cellules /mm³ de sang. Le sepsis sévère était caractérisé comme un sepsis accompagné de défaillances d'organes et le choc septique comme un sepsis sévère accompagné d'une hypotension persistante (15). Suite aux nouvelles connaissances acquises sur les syndromes septiques, une seconde conférence a été organisée en 2001 avec le but d'actualiser la définition (16). Cependant, les paramètres justifiant une nouvelle définition n'ont finalement pas été considérés comme suffisants et les discussions n'ont pas abouti à une définition alternative. Finalement, c'est en 2016 qu'une troisième conférence internationale a permis de revoir la définition du sepsis afin de pallier aux limites de celle de 1991 (1). En effet, les avancées de la recherche sur la physiopathologie du sepsis et de la prise en charge des patients ont mis en évidence les aspects inappropriés de l'ancienne définition : un focus trop important sur l'inflammation et le manque de spécificité et de sensibilité du SRIS.

La mise à jour de 2016 définit le sepsis comme une défaillance d'organes pouvant entraîner la mort, cette défaillance étant causée par une réponse dérégulée de l'hôte à une infection. La défaillance d'organe est traduite cliniquement par une augmentation d'au moins deux points du score « Sequential Organ Failure Assesment » (SOFA) (**Tableau 1**). Le choc septique est une sous-catégorie du sepsis pour laquelle les altérations cellulaires et métaboliques et la défaillance circulatoire sont plus importantes et entraînent un risque plus élevé de mortalité que le sepsis. Au niveau clinique, le choc septique nécessite l'utilisation de vasopresseurs pour maintenir une pression artérielle supérieure ou égale à 65 mmHg. Un patient en choc septique présente également une concentration de lactate dans le sérum supérieure à 2 mmol/L en l'absence d'hypovolémie.

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

Abbreviations: Fio₂, fraction of inspired oxygen; MAP, mean arterial pressure; PaO₂, partial pressure of oxygen.

^a Adapted from Vincent et al.²⁷

^b Catecholamine doses are given as μg/kg/min for at least 1 hour.

^c Glasgow Coma Scale scores range from 3-15; higher score indicates better neurological function.

Tableau 1: Sequential Organ Failure Assessment Score (17).

Suite à la nouvelle définition du sepsis et du choc septique, un nouveau score clinique, le quickSOFA (qSOFA), a été créé pour permettre l'identification rapide des patients potentiellement septiques. Le patient doit alors avoir au moins deux des critères cliniques suivants : une fréquence respiratoire supérieure ou égale à 22 respirations par minute, une altération de l'état mental ou une pression systolique inférieure ou égale à 100 mmHg (1).

L'actualisation de la définition du sepsis a permis de clarifier le diagnostic et vise à améliorer à terme la prise en charge des patients. Cependant, la physiopathologie du sepsis n'étant que partiellement comprise à ce jour, définir le sepsis reste encore un enjeu.

1.2 Epidémiologie

1.2.1 Incidence en France et dans le monde

Le sepsis est un problème majeur de santé publique mondiale. Le nombre de cas par an est estimé à 19,4 millions dans le monde et est calculé par extrapolation des estimations des hôpitaux traitant le sepsis dans les pays développés (2). Ce nombre est donc sans doute sous-estimé, les pays en voie de développement n'étant pas pris en compte. En France, le nombre de cas de sepsis est estimé à 75 000 par an (18). Aux Etats-Unis, l'incidence annuelle du sepsis peut varier de 850 000 à 3 000 000 de cas selon les études (19). Cette différence peut s'expliquer par l'utilisation des anciens critères du sepsis et

du sepsis sévère qui, manquant en sensibilité et spécificité, engendraient une hétérogénéité dans la définition selon les bases de données des hôpitaux.

L'incidence du sepsis a été en constante augmentation lors des dernières décennies. De 1996 à 2008, le nombre de patients hospitalisés pour un sepsis sévère aux Etats-Unis a augmenté de plus de 2,5 fois (20). En France, de 1994 à 2004, ce nombre a doublé (21). Ces études épidémiologiques sont basées sur les anciens critères de définition du sepsis et du choc septique. Sterling *et al.* ont évalué l'impact de la nouvelle définition du sepsis sur son incidence (22). Ils observent qu'une majorité de patients correspondant à l'ancienne définition ne sont pas considérés comme patients septiques avec les nouveaux critères. Lors d'une autre étude sur l'impact de la nouvelle définition effectuée en Suède, les auteurs ont observé un nombre de cas plus élevé de sepsis définis avec les nouveaux critères (780/100 000 patients) que de sepsis sévères définis avec les anciens critères (687/100 000 patients) (23). Seuls 64 patients sur les 340 inclus avaient un sepsis selon les deux définitions.

1.2.2 Coût de la prise en charge des patients septiques

La prise en charge des patients septiques et en choc septique entraîne un coût très important: 20 milliards de dollars aux Etats-Unis, soit 5,2 % des coûts totaux des hôpitaux américains, en faisant ainsi la condition la plus coûteuse à traiter suite à une hospitalisation (24). Dans une étude sur 1698 patients ayant un sepsis sévère inclus dans six unités de soins intensifs en France, le coût moyen de prise en charge par patient était évalué à 22 800 euros, soit un montant deux fois plus élevé que celui des autres patients de réanimation (25). La charge de travail du personnel hospitalier pour soigner les patients septiques était triplée. Dans cette étude, l'augmentation du coût de la prise en charge des patients était également liée à l'âge, à la mortalité et aux chirurgies d'urgence pratiquées sur les patients. De plus, le coût de la prise en charge des patients septiques ne se limite pas à la période d'hospitalisation. En effet, des complications surviennent fréquemment chez les individus ayant eu un sepsis dans les années suivant leur hospitalisation. Aux Etats-Unis, le montant total cumulé des soins médicaux était de 44 600 dollars par patient lors de l'hospitalisation, 78 500 dollars dans l'année suivante et 188 800 dollars dans les cinq années suivantes (26).

1.2.3 Mortalité

Bien que l'estimation du nombre de patients septiques soit approximative, il est admis que le sepsis est la première cause de mortalité en soins intensifs dans le monde (2). Le nombre de décès par an est estimé à 5 millions. De manière similaire à l'estimation du nombre de cas de sepsis, ce nombre est sûrement sous-estimé car il ne prend en compte que le taux de mortalité dans les pays développés (27). Le sepsis néonatal était quant à lui responsable de 421 000 décès en 2013 dans le monde (28).

Une sensibilisation plus importante et une prise en charge plus rapide des patients ont permis une diminution du taux de mortalité lié au sepsis ces dernières années mais celui-ci reste de l'ordre de 25-30 % et atteint 40-50 % pour les chocs septiques (3). Ce taux de mortalité est encore plus élevé pour le sepsis néonatal avec plus de 50 % de décès (29). Le taux de mortalité est inversement corrélé au revenu national brut du pays dans lequel le patient est traité. Quelques études dans des pays peu développés ont montré que malgré un équipement convenable et un accès aux médicaments, les infrastructures et la formation du personnel soignant étaient insuffisants pour traiter au mieux les patients septiques (30-32).

Quelques études ont évalué l'impact du sepsis et du choc septique sur la mortalité à long terme. Linder *et al.* ont montré que le sepsis sévère augmentait le taux de mortalité dans les 1 à 10 ans par rapport aux personnes saines et que cette augmentation était d'autant plus importante chez les patients ayant moins de 60 ans (33). Dans une autre étude incluant plus de 30 000 individus, ceux ayant eu un sepsis avaient un taux de mortalité de deux à cinq fois plus élevé que les individus n'ayant pas eu de sepsis (**Figure 1**) (34). Les comorbidités éventuelles des patients ne semblaient pas être responsables de cette augmentation. La principale cause de mortalité était l'infection (32 %) suivie par les maladies pulmonaires chroniques (13 %), les cancers (11 %), les morts subites (8,4 %) et les infarctus du myocarde (6,6 %).

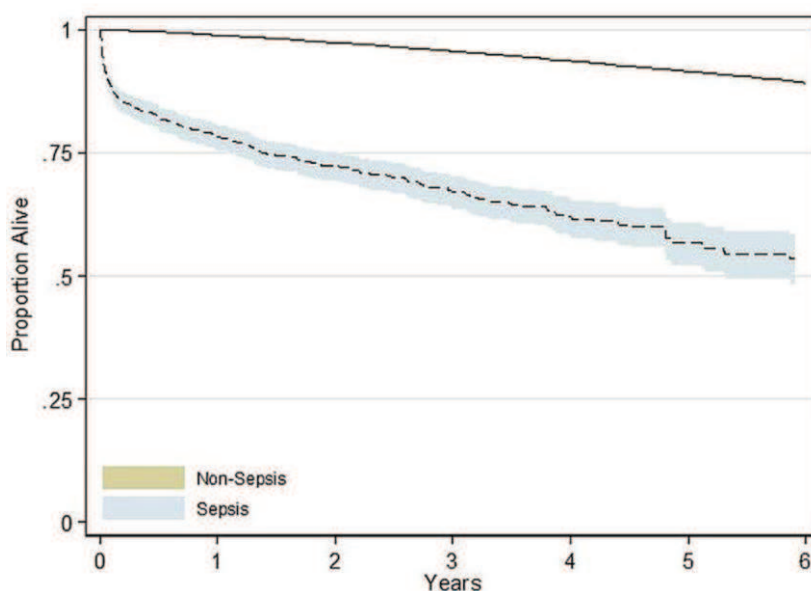


Figure 1: Courbes de survie de Kaplan-Meier d'individus septiques (n=970) et non septiques (n=28 694) dans les six ans suivant le diagnostic. L'intervalle de confiance à 95% est représenté (34).

La nouvelle définition du sepsis a également un impact sur la mortalité : les patients identifiés avec les nouveaux critères ont des dysfonctions d'organes et une mortalité plus importantes qu'avec les anciens critères (22).

1.2.4 *Etiologie infectieuse*

De 1979 à 1987, les bactéries à Gram négatif à l'origine du sepsis étaient prédominantes. Cette tendance s'est inversée au cours du temps. Par exemple, en 2000, les bactéries à Gram positif représentaient 52 % des sepsis contre 38 % pour les bactéries à Gram négatif, 4,7 % pour les infections poly-microbiennes, 4,6 % pour les champignons et enfin 1% pour les bactéries anaérobies (35). Les infections bactériennes à Gram positif ont augmenté de 26 % par an entre 1979 et 2000. Cette augmentation fulgurante peut être due à l'augmentation de l'utilisation de dispositifs invasifs (35). Sur l'ensemble de ces mêmes années, les infections par champignons ont augmenté de 207 % (36) (**Figure 2**). L'administration d'antibiotiques à large spectre est un des facteurs responsable de l'augmentation des infections par champignons (37). Cette pratique entraîne également un problème de résistance aux antibiotiques chez les patients de réanimation (38).

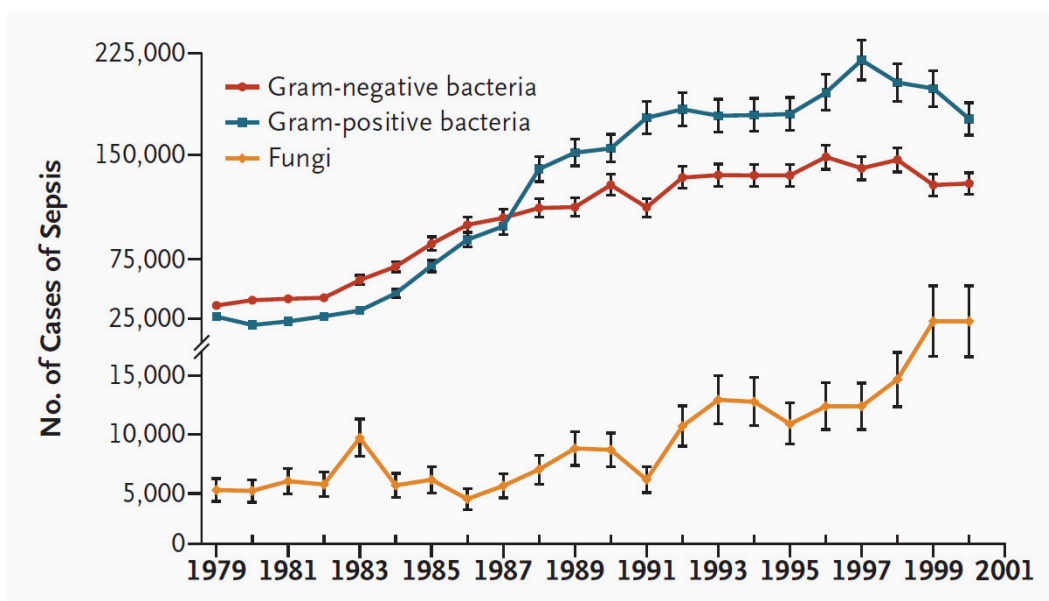


Figure 2 : Nombre de cas de sepsis en fonction de l'origine infectieuse aux Etats-Unis de 1979 à 2000 (36).

L'utilisation d'antibiothérapies ciblant le pathogène induit une diminution de la mortalité des patients septiques plus importante que l'utilisation d'antibiothérapies à large spectre (39). L'identification de l'agent infectieux est donc primordiale pour la prise en charge du patient. Cependant, elle reste indéterminée dans 40 à 60 % des cas (40). Ceci peut s'expliquer par plusieurs raisons :

l'utilisation d'antibiotiques à large spectre qui peut fausser les résultats des cultures bactériennes, une origine infectieuse par des organismes inhabituels et donc difficilement identifiables, ou encore un bilan diagnostique incomplet (41).

Dans une étude incluant des patients septiques de 1979 à 2003 aux Etats-Unis, le site de l'infection principalement observé était respiratoire pour les hommes (36 %) et urogénital pour les femmes (35 %) (42). Le troisième site d'infection le plus courant était gastro-intestinal et commun aux hommes et aux femmes (23 %). Les autres sites d'infection peuvent être liés à un dispositif médical, à une blessure ou à une endocardite ou affecter un tissu mou ou le système nerveux central (43).

1.2.5 Facteurs de risque et de gravité

L'âge et le sexe sont des facteurs de risque et de gravité du sepsis. Les hommes ont plus de risque de développer un sepsis que les femmes avec un risque relatif de 1,27 (42). La prévalence du sepsis est augmentée significativement chez les patients âgés (> 65 ans) avec un risque relatif de 13,1 en comparaison avec les patients jeunes (44). L'âge est également associé à la mortalité.

Certaines maladies chroniques peuvent aussi être des facteurs de risque et de gravité. Par exemple, les patients ayant eu un cancer ont un risque relatif de développer un sepsis de 9,77 en comparaison avec les patients n'ayant pas eu de cancer (45). Les patients VIH n'ont pas de prévalence particulière du sepsis mais ils ont en revanche un taux de mortalité bien plus élevé que les patients septiques non VIH (29 % contre 20 %) (46). Chez les patients cirrhotiques, la prévalence du sepsis a augmenté de 8,64 à 15,67 de 1998 à 2010 pour 1 000 admissions en soins intensifs mais le taux de mortalité a cependant diminué (84,7 % à 68,5 %) (47). Quant au diabète, c'est un facteur de risque reconnu de développer un sepsis. Cette comorbidité influence la dysfonction d'organes. Un patient septique diabétique aura plus souvent une dysfonction rénale que respiratoire en comparaison avec les patients septiques non diabétiques (48). En revanche, cette maladie ne semble pas avoir d'influence sur le taux de mortalité (49, 50). La prévalence du sepsis chez les patients obèses a été peu étudiée. Cependant, plusieurs recherches ont montré que cette population semble plus susceptible aux infections (51). De plus, les patients septiques atteints d'obésité semblent développer une réponse pro-inflammatoire suite à un sepsis encore plus démesurée que les patients non obèses (52). Tous ces exemples montrent l'importance de prendre en compte les comorbidités d'un patient dans sa prise en charge lors d'un sepsis et d'un choc septique.

Chez les enfants, les naissances prématurées sont associées à un risque important de développer un sepsis néonatal (29). En effet, le développement du système immunitaire des nourrissons prématurés n'a pas pu se terminer avant la naissance (53). De plus, l'antibiothérapie à large spectre, l'hospitalisation

prolongée, l'utilisation d'appareils invasifs, augmentent le risque d'infection dans cette population déjà vulnérable.

Une étude danoise sur 1 000 individus adoptés a mis en évidence le lien entre la génétique et la réponse aux infections. En effet, le risque de mortalité suite à une infection était significativement augmenté si l'un des parents biologiques était décédé à cause d'une infection avant l'âge de 50 ans en comparaison avec l'un des parents adoptifs avec un risque relatif de 5,8 (54). Suite à ces observations, plusieurs études ont évalué les prédispositions génétiques pouvant être liées au risque de développer un sepsis mais aucune n'a démontré l'existence de variant génétique clairement lié à la pathologie (55, 56). Cependant, quelques associations entre polymorphismes et sepsis ont été observées. Par exemple, les polymorphismes des gènes *Toll Like Receptor (TLR) 4* et *TLR1* sont associés à un risque augmenté de développer un choc septique avec une infection d'origine bactérienne à Gram négatif (57, 58). Dans une autre étude incluant plus de 500 patients d'origine européenne, un « Single Nucleotide Polymorphism » (SNP) a été trouvé associé à la mortalité 28 jours après le diagnostic du choc septique (59). Ce SNP se trouvait au niveau du gène *SVEP1* codant pour une molécule d'adhésion impliquée dans les interactions entre les cellules et le complément, les facteurs de croissance, les intégrines et les cytokines. Un variant du gène *FER*, codant pour une protéine impliquée dans le recrutement des leucocytes, a été associé à une meilleure survie chez les patients septiques mais seulement pour ceux atteints d'une pneumonie (60). Ainsi, malgré ces quelques associations entre variants génétiques et sepsis, aucune prédisposition génétique au sepsis n'a été clairement mise en évidence. Ces résultats peuvent être dus à la difficulté de définir le sepsis et à l'hétérogénéité des patients.

1.3 Diagnostic

1.3.1 Diagnostic clinique

Les principaux signes cliniques rencontrés lors d'un sepsis sont variés et peu spécifiques (2) (**Tableau 2**). Le sepsis étant maintenant caractérisé comme une infection associée à une augmentation du score SOFA de deux points, plusieurs signes cliniques correspondent à des paramètres du SOFA: une difficulté respiratoire traduite par une baisse du rapport de la pression partielle artérielle en oxygène et de la fraction inspirée en oxygène, un désordre de la coagulation lié à une diminution des plaquettes, une hypotension, un état mental altéré, une insuffisance rénale traduite par une augmentation de la créatinine et une insuffisance hépatique traduite par une augmentation de la bilirubine (1). D'autres symptômes ne sont pas liés au score SOFA comme une hyper ou hypothermie, une tachycardie, des manifestations cutanées ou encore des douleurs abdominales (61). Au niveau biologique, on observe une hyperglycémie, une anémie, une leucocytose ou une leucopénie ou encore une hyperlactatémie.

Table 2. Clinical Manifestation of Sepsis and Septic Shock

<i>System</i>	<i>Clinical findings</i>	<i>Comments</i>
Cardiac	Cold or clammy skin, hypotension, poor capillary refill time, tachycardia	Shock results from redistribution of intravascular circulation and myocardial depression Patients with hypotension as the initial presentation of sepsis have a twofold increased risk of death
Constitutional	Diaphoresis, fevers or rigors, malaise or myalgia	Fever is the most common manifestation of sepsis
Dermatologic	Abscess, cellulitis, ecchymosis or petechiae, necrotizing fasciitis, regional lymphadenopathy	Distinguish from direct bacterial invasion, lesions secondary to sepsis (disseminated intravascular coagulation), lesions from vasculitis or microemboli (endocarditis)
Endocrine	Hyperglycemia (sepsis-induced insulin resistance) or hypoglycemia (rare)	In patients with diabetes mellitus, hyperglycemia may be the first clue of an infection Findings not clinically evident: Impaired vasopressin synthesis Decreased secretion of thyroid and thyroid-stimulating hormone Impaired cortisol secretion Impaired growth hormone release
Gastrointestinal	Abdominal pain, decreased bowel sounds, diarrhea (bloody or nonbloody), distention, rigidity, upper gastrointestinal tract blood loss, vomiting	Early imaging recommended for further evaluation Suspected surgical abdomen requires immediate consultation Major blood loss from gastrointestinal hemorrhage is uncommon in sepsis
Genitourinary	Costovertebral tenderness, dysuria, frequency, hematuria, lower abdominal pain, pyuria, vaginal discharge or bleeding	Consider early imaging to rule out renal obstruction and later imaging for renal abscess Placental abruption and septic abortion should be considered in pregnant patients Retained products of conception should be considered postpartum
Hematologic	Anemia, leukocytosis or leukopenia, thrombocytopenia	Neutropenia is uncommon but may occur in older patients and in those with chronic alcohol abuse Microangiopathic hemolytic anemia is a feature of disseminated intravascular coagulation Thrombocytopenia often precedes the development of disseminated intravascular coagulation
Hepatic	Coagulopathy, abnormal results on liver function testing, jaundice	Abnormalities may occur in disseminated intravascular coagulation Coagulation abnormalities may increase bleeding risk
Neurologic	Headache, altered mental status ranging from mild disorientation and lethargy to obtundation and coma	Older patients may present with subtle agitation or irritation
Pulmonary	Upper: dysphagia, lymphadenopathy, sore throat, trismus Lower: consolidated auscultatory findings, cough, hypoxia, pleuritic chest pain, shortness of breath, tachypnea or hyperventilation	Consider pulmonary embolus early in the diagnosis if risk factors are present Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome are late complications; mechanical ventilation may increase risk of bleeding
Renal	Anuria, oliguria, urinary sediments (suggestive of acute tubular necrosis)	Primary infection may be genitourinary, but hypoperfusion may lead to organ dysfunction (acute renal failure)

Information from reference 12.

Tableau 2 : Manifestations cliniques du sepsis et du choc septique (61).**1.3.2 Diagnostic microbiologique**

L'identification de l'origine bactérienne de l'infection est cruciale pour la prise en charge du patient. Le test diagnostique de référence est la culture bactérienne. Celle-ci est faite à partir d'un prélèvement sanguin ou de tout autre site pertinent selon les symptômes infectieux comme l'urine, les fluides

cérébrospinaux ou bronchiaux (62). Cependant, près de la moitié des organismes responsables du sepsis ne sont pas identifiés suite à ces tests (63). Dans ce cas, le diagnostic de l'infection se fait à partir de signes cliniques et radiologiques. De plus, la durée des tests de culture bactérienne est souvent de 24 h ou plus. Ces tests peuvent parfois générer des faux négatifs lorsqu'il s'agit de bactéries peu connues ou encore lorsqu'une antibiothérapie à large spectre a été initiée avant les prélèvements (64). L'arrivée d'une nouvelle génération de systèmes de suivi continu et automatique des cultures bactériennes pourra sûrement participer à la réduction du temps d'obtention des résultats (65). Malgré cette avancée technologique, de nombreuses études se sont portées sur les alternatives possibles à cette technique afin de développer des outils plus rapides et plus performants.

La simplification des appareils d'amplification a permis l'accès aux techniques de biologie moléculaire en laboratoire clinique alors qu'il était jusqu'alors réservé à la recherche (66). Ces techniques permettent une identification plus rapide et plus spécifique de l'agent infectieux. Cependant, l'utilisation de ces tests diagnostiques en microbiologie reste coûteuse et représente un investissement plus conséquent pour l'hôpital que l'utilisation de la culture bactérienne classique.

Le développement de tests biologiques spécifiques et rapides restent donc actuellement un challenge pour le diagnostic microbiologique du sepsis.

1.3.3 Biomarqueurs diagnostiques de l'infection

L'un des marqueurs des infections bactériennes les plus utilisés est la procalcitonine (PCT). En effet, l'augmentation de la concentration de cette molécule est liée aux infections bactériennes et peut être mesurée rapidement (67, 68). La protéine C réactive (CRP : « C-Reactive Protein ») est également largement utilisée en clinique car facilement mesurable, bien que sa spécificité soit remise en question (69). Le concentration de la CRP augmente suite à une infection ou dans un contexte inflammatoire. Une concentration élevée de la CRP est corrélée avec un fort risque de dysfonctions d'organes et de mortalité chez les patients septiques.

1.4 Prise en charge thérapeutique

Les consignes de prise en charge des patients septiques (Surviving Sepsis Guideline) ont été publiées pour la première fois en 2004 puis mises à jour en 2008 et 2012 (62, 70, 71). Enfin, c'est en janvier 2017 que la dernière révision a eu lieu (72). Une prise en charge standard des patients suite à une suspicion de sepsis a été définie (73) (**Figure 3**). Dans les trois heures suivant l'arrivée du patient, la mesure du lactate, les prélèvements pour les cultures bactériennes, l'administration d'antibiotiques à large spectre doivent être effectués. Dans les six heures, des vasopresseurs doivent être administrés pour maintenir

une pression artérielle supérieur à 65 mmHg si l'administration de solutions de remplissage n'a pas eu d'effet sur la pression. De plus, le niveau de lactate et la perfusion des tissus doivent alors être réévalués afin d'orienter la suite de la prise en charge.

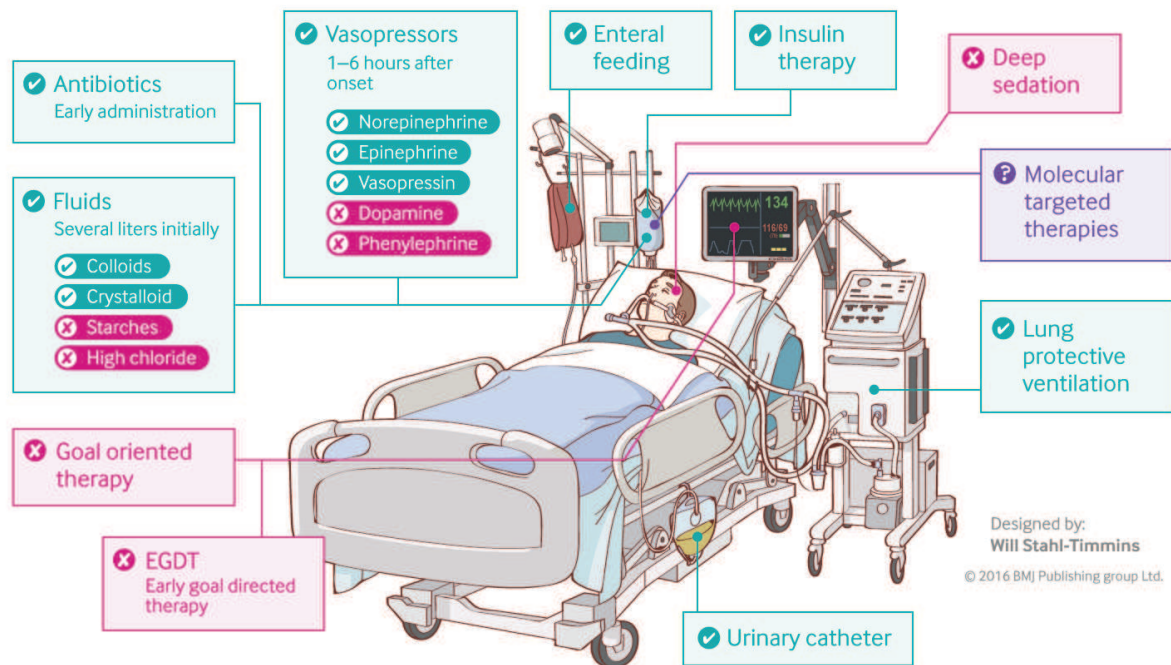


Figure 3: Prise en charge des patients septiques (74).

1.4.1 Contrôle de l'infection

Le contrôle de la source infectieuse et une antibiothérapie précoce sont recommandés dans la prise en charge des patients (72). Les antibiotiques doivent être administrés le plus rapidement possible et une heure maximum après le diagnostic. Ces recommandations font écho à plusieurs études ayant démontré une association entre l'administration tardive d'antibiotiques et un risque augmenté de mortalité (75–77). De plus, la pertinence du choix du traitement antibiotique et son efficacité doivent être suivies et réévaluées au cours du temps. La stratégie de dosage du traitement doit être évaluée grâce à des tests pharmacocinétiques et pharmacodynamiques (78). En effet, la dose est souvent insuffisante à cause de la diminution de la perfusion des organes, des muscles et de la peau et de l'augmentation de la clairance rénale chez les patients (79). Cependant, ces tests ne sont pas systématiquement disponibles dans les hôpitaux.

L'élimination physique du foyer infectieux est effectuée lorsque nécessaire : drainage, élimination chirurgicale des tissus infectés, retraits des dispositifs médicaux potentiellement infectés (71).

1.4.2 Prise en charge hémodynamique

Le sepsis induit une hypoperfusion des tissus entraînant une altération de la distribution de l'oxygène et des nutriments. Le soutien hémodynamique vise à rétablir la perfusion des tissus ainsi que le métabolisme cellulaire. Plusieurs paramètres permettent d'évaluer les besoins hémodynamiques des patients septiques. La fréquence cardiaque, la pression artérielle moyenne et l'urine éliminée sont mesurées par des dispositifs non invasifs. La pression artérielle par un cathéter artériel et la mesure du taux de saturation d'oxygène dans le système veineux central par un cathéter veineux permettent également d'apprécier les besoins hémodynamiques du patient (80). Les recommandations étaient précédemment basées sur un soutien hémodynamique précoce indépendamment du statut du patient. Cependant, de récents essais cliniques ont démontré que cette stratégie n'apportait rien au patient (81). Les recommandations actuelles s'orientent donc plus vers une évaluation plus poussée avant la mise en place d'un soutien hémodynamique.

Expansion volémique

L'administration de solutions de remplissage est la première étape du soutien hémodynamique et est actuellement la thérapie la plus utilisée en service de réanimation (82). Lorsque ce traitement est initié, les nouvelles recommandations insistent sur le suivi de l'effet de celui-ci et un arrêt rapide lorsque le patient se stabilise, ce qui n'était pas systématiquement fait auparavant (83). Deux types de solutions sont utilisés : des solutions cristalloïdes (saline, Ringer lactate) ou colloïdes (albumine, amidon hydroxyéthylé). Les solutions chlorées ne sont actuellement plus utilisées car elles peuvent participer au développement de l'insuffisance rénale des patients (84). Le choix du fluide est controversé. Plusieurs études n'ont cependant montré aucune différence de l'état du patient dépendamment du type colloïde ou cristalloïde du fluide utilisé (85, 86).

Traitements vasoactifs

Lorsque l'administration de solutions de remplissage n'agit pas sur le patient, les vasopresseurs sont utilisés afin de rétablir la pression artérielle à une valeur supérieure ou égale à 65 mmHg (71). Il a été montré que l'utilisation de noradrénaline permettait de préserver la perfusion des tissus (87). En revanche, le dosage utilisé doit être adapté en fonction des comorbidités du patient. Par exemple, viser une pression artérielle moyenne de 65 mmHg sera inadéquat pour un patient âgé ayant une hypertension sévère antérieure au sepsis alors que cela conviendra à un patient jeune sans problème de tension.

En présence d'une pression artérielle normale et d'une réanimation volémique adéquate, des inotropes comme la dobutamine sont utilisés chez les patients septiques ayant une suspicion

d'insuffisance cardiaque. En effet, ce traitement permet une augmentation de la fréquence cardiaque et du volume systolique. Cependant, son utilisation a récemment été remise en question suite à une étude mettant en évidence une mortalité plus forte dans le groupe de patients septiques traités avec de la dobutamine en comparaison avec les patients non traités (88).

1.4.3 Prise en charge des défaillances d'organes

Hémofiltration

L'hémofiltration est également une technique utilisée pour traiter les patients septiques. Elle vise à éliminer les médiateurs de l'inflammation et les toxines bactériennes présents dans le sang dans le but d'atténuer la réponse pro-inflammatoire excessive (89). De plus, l'élimination d'une partie des cytokines et leucocytes circulants permettrait de rétablir le gradient de concentration du plasma vers les tissus infectés (90). Ce traitement est approprié en cas d'insuffisance rénale, souvent présente chez les patients septiques. Dans une étude sur l'effet de l'hémofiltration, ce traitement permettait de diminuer la mortalité à 28 jours de 70 % à 47 % (91).

Contrôle de la glycémie

Les patients septiques sont souvent hyperglycémiques, indépendamment du diabète. Cette hyperglycémie résulte des dysfonctions endothéliales, de la libération massive de cytokines, de l'activation des plaquettes, des dysfonctions des mitochondries et du déséquilibre acido-basique (92). De plus, l'hyperglycémie est associée à la sévérité du sepsis. En effet, le glucose est un puissant médiateur pro-inflammatoire car il induit entre autres la production d'espèces réactives de l'oxygène et augmente l'expression de « Nuclear Factor-kappaB » (NF-κB). Suite à une étude montrant une diminution de la mortalité après une baisse du glucose, il est maintenant recommandé de traiter les patients avec de l'insuline lors d'une hyperglycémie en ciblant une concentration de glucose dans le sang inférieure à 180 mg/dL. Ce type de traitement est bénéfique lorsqu'il permet de supprimer l'hyperglycémie chez le patient tout en maintenant une concentration de glucose minimale (195, 196).

Insuffisance surrénale et corticothérapie

L'utilisation de corticostéroïdes à faible dose pour compenser l'insuffisance surrénale souvent présente chez les patients septiques reste controversée. Deux études récentes et incluant chacune environ 2 000 patients en choc septique avaient pour but de déterminer l'effet réel des corticothérapies dans le sepsis (93, 94). Malheureusement, les résultats obtenus de l'impact du traitement sur la mortalité sont contradictoires. L'une des deux études montre un effet bénéfique des corticothérapies sur la mortalité à 90 jours des patients alors que la deuxième montre une absence d'effet. En revanche,

les deux études montrent un impact bénéfique de ce type de traitement sur des critères autres que la mortalité comme la durée de ventilation mécanique et la durée de séjour en réanimation. Ainsi, bien que l'effet des corticothérapies sur la mortalité des patients en choc septique reste ambigu, un effet bénéfique à court terme est ici clairement identifié.

2. Initiation de la réponse immunitaire lors du sepsis

Le sepsis a d'abord été caractérisé comme une hyperinflammation incontrôlée de l'hôte en réponse à une infection (15). Suite à une reconsidération de la physiopathologie du sepsis, le concept de réponse anti-inflammatoire compensatrice (« Compensatory Antiinflammatory Response Syndrome ») a émergé et a été défini comme une réponse du système immunitaire consécutive au SRIS (95). Enfin, suite aux dernières avancées sur la compréhension de la physiopathologie, le sepsis est actuellement considéré comme une réponse dérégulée de l'hôte à une infection impliquant plusieurs mécanismes antagonistes simultanément et entraînant ainsi une réponse pro-inflammatoire disproportionnée et une immunosuppression concomitante (**Figure 4**).

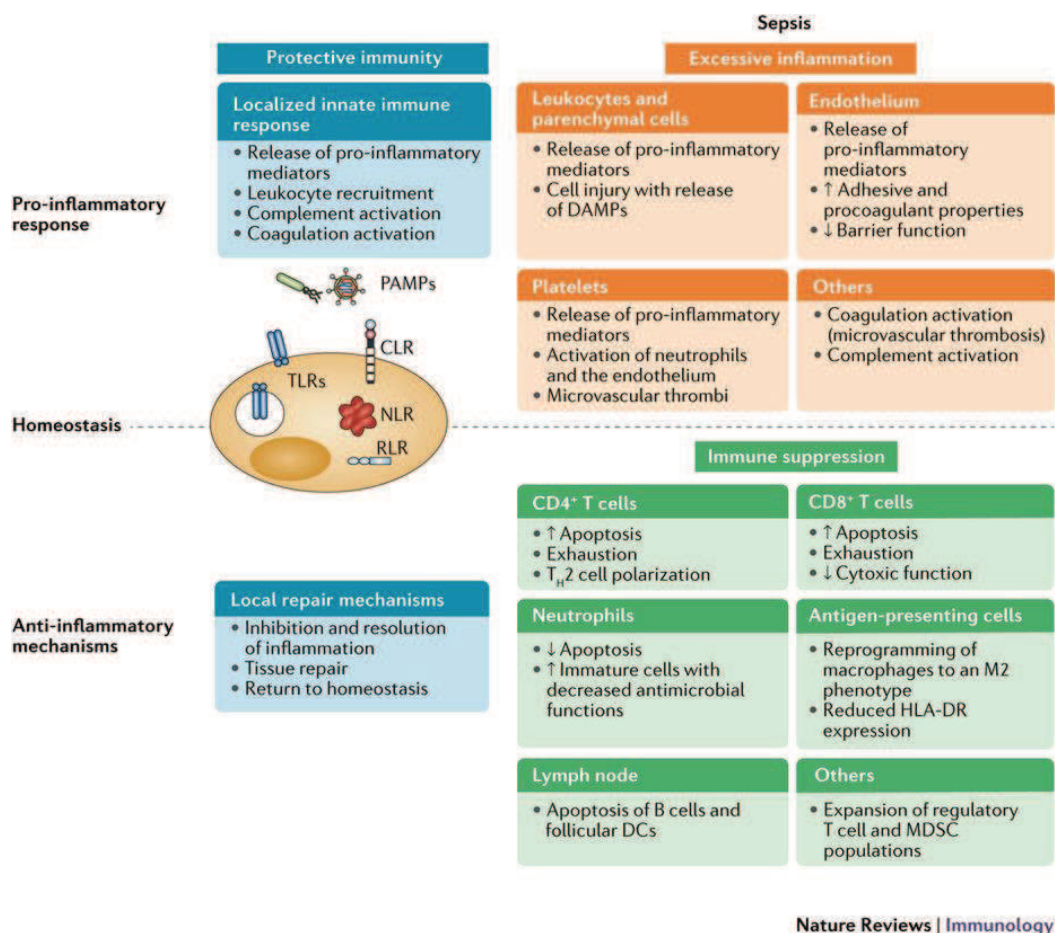


Figure 4 : Réponse immunitaire de l'hôte à une infection et lors d'un sepsis (96).

2.1 Reconnaissance microbienne

Suite à l'infection, l'immunité innée est en première ligne. Elle permet dans un premier temps la reconnaissance du pathogène grâce aux récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires qui induisent, après activation, l'initiation de la réponse du système immunitaire. Deux types de motifs sont identifiés : les motifs moléculaires associés aux pathogènes (« Pathogen Associated Molecular Patterns » [PAMP]) et les motifs moléculaires associés au danger (« Danger Associated Molecular Patterns » [DAMP]) (97). Parmi les PAMP, on trouve par exemple le lipopolysaccharide (LPS), composant de la membrane externe des bactéries à Gram négatif, l'acide lipoteichoïque, composant de la membrane des bactéries à Gram positif ou encore le flagelle bactérien. Les DAMP correspondent à des médiateurs endogènes libérés lors de processus pathologiques comme un trauma, une ischémie ou une nécrose (98). On distingue trois familles de récepteurs de reconnaissances de motifs moléculaires en fonction de leur localisation : les récepteurs de type « Nucleotide Oligomerization Domain Like Receptor » (NLR), les lectines de type C (« C-type Lectin Receptor » : CLR) et les récepteurs de type Toll (TLR). Les récepteurs qui agissent principalement lors d'un sepsis sont les TLR et les NLR (99).

2.1.1 Récepteurs TLR

Dix TLR ont été identifiés chez les mammifères dont six sont exprimés à la surface des cellules (TLR 1, 2, 4, 5, 6 et 10) et quatre sont intracellulaires (TLR 3, 7, 8 et 9) (**Figure 5**). Les TLR sont actifs sous la forme d'homo ou d'hétérodimères. Leurs principaux ligands sont des lipoprotéines, des lipides et des acides nucléiques.

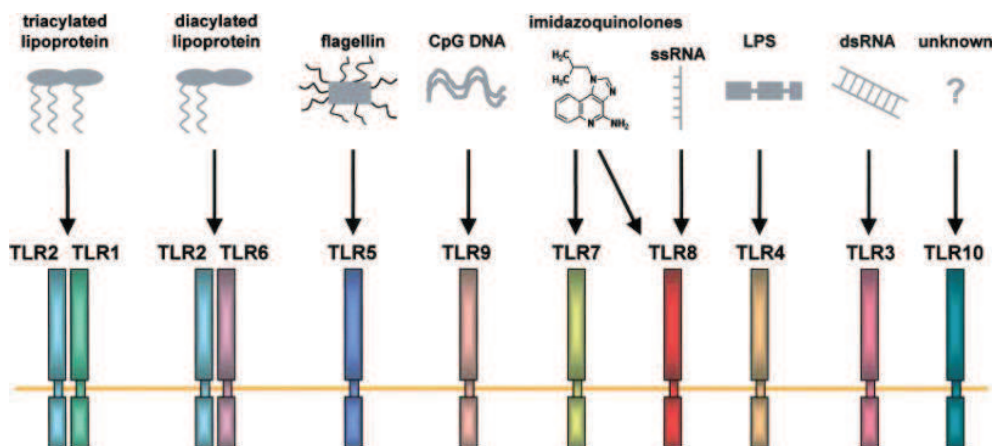


Figure 5 : Reconnaissance des composés microbiens par les TLR (100).

Les TLR exprimés à la surface des cellules reconnaissent principalement des composants de la surface ou de la membrane bactérienne. Le TLR2 reconnaît des lipoprotéines en formant des hétérodimères avec le TLR1 ou le TLR6. Il reconnaît également les peptidoglycanes, composants de la

membrane bactérienne, l'acide lipoteichoïque, spécifique des bactéries à Gram positif, et le zymosan, composant de la membrane des champignons. Le TLR10 est encore mal connu et ses ligands n'ont été que partiellement identifiés. Il semble cependant former un complexe avec le TLR1 et 2 et ciblerait donc plutôt des ligands bactériens extracellulaires (101). Il semble également cibler les virus de la grippe (102). Le TLR5 reconnaît la flagelline, composant du flagelle des bactéries. Le TLR4 reconnaît le LPS, spécifique des bactéries à Gram négatif, en formant un complexe avec le CD14 (103). Les TLR intracellulaires se situent à la surface des endosomes ou des endolysosomes. Ils reconnaissent principalement les acides nucléiques issus des pathogènes. Par exemple, le TLR3 reconnaît l'ARN viral double brin, alors que le TLR7 et le TLR8 reconnaissent l'ARN viral simple brin. Le TLR9 reconnaît l'ADN microbien dérivé de bactéries, de virus ou de parasites (104). A la suite de l'interaction des TLR avec leurs ligands spécifiques, la voie de signalisation des TLR est enclenchée. Une cascade de réactions impliquant différentes protéines aboutit principalement à l'activation de deux familles de facteurs de transcription : les NF- κ B et les facteurs régulateurs de l'interféron. Cette activation conduit à la production de cytokines pro-inflammatoires (105).

Les TLR ont un rôle central dans l'initiation du sepsis : ils participent à la détection précoce du pathogène et engagent par la suite la réponse immunitaire adaptative. D'une part, une altération des TLR entraîne une vulnérabilité face aux infections et d'autre part, une stimulation incontrôlée des TLR entraîne une réponse inflammatoire disproportionnée (106). Le TLR4 a été considéré comme une cible thérapeutique potentielle. Un antagoniste de ce récepteur a été testé chez des patients en choc septique. Malgré les résultats positifs de l'essai clinique de phase II, aucun effet bénéfique pour le patient n'a été observé lors de la phase III (107, 108).

Certains polymorphismes génétiques des TLR sont associés avec l'incidence et la mortalité dans le choc septique. Par exemple, un haplotype du TLR4 est associé à un risque augmenté de sepsis (109). Il semblerait entraîner une réponse altérée au LPS. Dans une autre étude évaluant l'impact du polymorphisme de 43 gènes liés aux TLR, un SNP du TLR1 était le plus fortement associé aux dysfonctions d'organes et à la mortalité chez les patients septiques parmi ceux étudiés (110). La présence de ce SNP semblerait induire une plus grande activation de NF- κ B via une plus forte expression du TLR1 à la surface des cellules.

2.1.2 Récepteurs NLR

Les récepteurs de type NLR sont exprimés par la plupart des cellules du système immunitaire mais aussi par d'autres cellules comme les astrocytes, les cellules microgliales, les ostéoblastes, les myofibroblastes et les cellules épithéliales (111). Les microorganismes qui envahissent le cytosol sont principalement reconnus par les NLR. Cette famille de récepteurs comprend plusieurs catégories

distinguées par la fonction du domaine N terminal du récepteur. Par exemple, la plus grande sous-famille de NLR compte 14 récepteurs qui sont caractérisés par un domaine pyrine en position N terminale. Ce groupe est ainsi appelé NLRP. Certains récepteurs NLRP comme NLRP1 ou NLRP3 peuvent assembler des complexes multimoléculaires appelés inflammasomes suite à une activation (112). Ces complexes entraînent à leur tour l'activation des caspases et participent ainsi à déclencher l'inflammation. Par exemple, l'activation du récepteur NLRP3 entraîne l'activation de la caspase 1 qui induit la production des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-18 (113). Chez les patients septiques, l'activation de l'inflammasome peut d'un côté participer à la défaillance d'organe à cause de la libération d'IL-1 β (97). D'un autre côté, l'ARN messenger (ARNm) de la caspase 1 a été retrouvé diminué dans les monocytes de patients septiques en comparaison avec des patients de réanimation non septiques (97).

2.1.3 Récepteurs CLR

Les récepteurs de type CLR sont caractérisés par la présence d'au moins un domaine de type lectine C. Ils ont longtemps été associés uniquement à la reconnaissance de champignons mais ont récemment été reconnus comme impliqués dans la reconnaissance bactérienne. Ces récepteurs reconnaissent également les cellules mortes et induisent une réponse pro-inflammatoire suite à l'identification de molécules libérées par ces cellules (114). Ainsi, ces récepteurs sont impliqués dans les réponses pathologiques suite à un infarctus ischémique ou à une chirurgie cérébrale (115, 116).

2.2 Orage cytokinique

La notion d'orage cytokinique vient de l'augmentation de la concentration d'un grand nombre de cytokines dans le plasma des patients septiques.

Les cytokines pro-inflammatoires les plus étudiées dans le sepsis sont l'IL-1 et le « Tumor Necrosis Factor α » (TNF α). Elles amorcent la réponse immunitaire pro-inflammatoire en enclenchant la production d'autres cytokines inflammatoires, en activant des médiateurs lipidiques et des dérivés réactifs de l'oxygène et en induisant la migration des cellules dans les tissus. Les concentrations de ces deux cytokines sont associées à la sévérité et l'évolution des dysfonctions d'organes chez les patients septiques (117–119). L'IL-17 est également une cytokine pro-inflammatoire impliquée dans la physiopathologie du sepsis par sa capacité à déclencher la production d'IL-6, d'IL-1 et de TNF α . C'est aussi un médiateur de la signalisation entre lymphocytes et phagocytes (120). L'expression du gène de l'IL-17 est augmentée dans les 24 h suivant le diagnostic du sepsis (121). La cytokine pro-inflammatoire « Macrophage migration Inhibitory Factor » (MIF) est sécrétée par les leucocytes suite à l'activation du TNF, de l'interferon gamma (IFN γ) ou du facteur du complément C5a. La production excessive de MIF

participe à la phase précoce du sepsis et les niveaux plasmatiques de cette cytokine sont associés à la sévérité et à la mortalité (122, 123).

Du côté anti-inflammatoire, les études se sont principalement portées sur l'IL-10. Cette cytokine a un rôle immunosuppresseur. Elle a, entre autres, la capacité de diminuer l'expression du TNF. La concentration de cette cytokine dans le plasma de patients septiques semble être un marqueur de sévérité et de mortalité (124). Les niveaux d'IL-10 restent élevés chez les patients jusqu'à 15 jours après le choc (125).

Ce déséquilibre de la réponse immunitaire implique ainsi des cytokines pro-inflammatoires mais aussi anti-inflammatoires. Pour appuyer le concept de deux phases consécutives pro et anti-inflammatoire dans le sepsis, des études de l'expression des gènes des différentes cytokines ont été menées sur des échantillons de patients septiques. Cependant, l'hétérogénéité des résultats obtenus et l'absence d'évolution séquentielle de la cinétique d'expression des différentes cytokines ont remis en cause ce concept et montrent un déséquilibre global des réponses pro et anti-inflammatoires (121). Une autre étude a montré que les transcriptomes pro et anti-inflammatoire étaient activés dès l'admission des patients septiques et évoluaient dans les 48 h (126). Ces résultats soutiennent l'idée d'une concomitance des réponses disproportionnées pro et anti inflammatoires.

2.3 Conséquences de la réponse inflammatoire initiale

2.3.1 Activation du complément

Les facteurs du complément sont libérés suite à une inflammation en réponse à une infection. Dans le plasma de patients septiques, les concentrations des peptides C3a et C5a sont détectés, indiquant une activation du système du complément. C5a se lie avec une forte affinité à son récepteur qui se trouve à la surface des phagocytes, des cellules endothéliales et d'autres cellules non issues de cellules myéloïdes. La voie de signalisation ainsi enclenchée induit la libération de granules cytoplasmiques, la production de dérivés réactifs de l'oxygène, l'amplification de la réponse lors de la reconnaissance d'un PAMP ou d'un DAMP avec une production augmentée de cytokines et de chimiokines (127). Une activité excessive de C5a participe à une réponse inflammatoire disproportionnée lors d'un sepsis en plus d'un déséquilibre de la coagulation (128). Une suractivation de la voie de signalisation de C5a entraîne l'augmentation de la production de facteurs pro-inflammatoires par les macrophages induisant ainsi des défaillances d'organes (129). C5a contribue également à l'apoptose des thymocytes et des cellules médullaires surrénales chez les patients septiques (130, 131). Plus tardivement dans le développement de la pathologie, l'interaction de C5a avec les polynucléaires neutrophiles entraîne une perte de fonctionnalité de ces cellules (132).

2.3.2 Coagulation

Le sepsis est associé à de fortes altérations des mécanismes de coagulation. On parle de coagulation intravasculaire disséminée (**Figure 6**). Différents mécanismes induisent un dépôt de fibrine : la production de thrombine par le facteur tissulaire, la dysfonction des mécanismes anticoagulants et l'altération de l'élimination de la fibrine par le système fibrinolytique (133). Le facteur tissulaire n'est physiologiquement pas exposé aux cellules sanguines. Cependant, il s'exprime à la surface des cellules mononuclées et endothéliales lorsque celles-ci sont stimulées par des bactéries, par des produits bactériens, ou encore par des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α . L'activation du facteur tissulaire entraîne une cascade d'activation conduisant à la production de thrombine (134). L'association de l'activation des plaquettes et de la thrombine entraîne la formation de caillots sanguins (135). Dans le contexte du sepsis, ce mécanisme est impliqué dans les dysfonctions d'organes et dans la réponse pro-inflammatoire disproportionnée. De plus, une destruction massive des plaquettes résulte également de ce dysfonctionnement (136). La thrombopénie est donc commune chez les patients septiques.

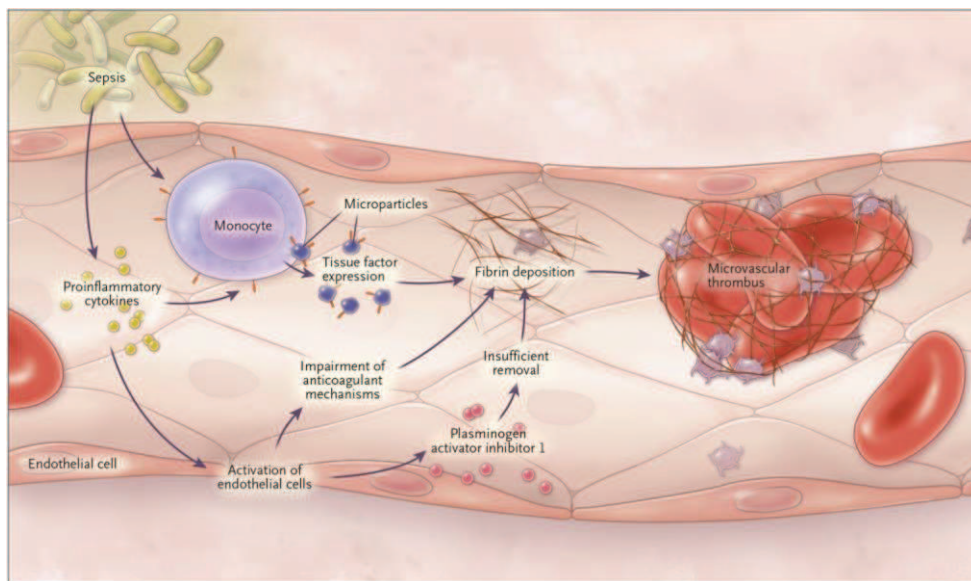


Figure 6 : Coagulation intravasculaire disséminée dans le sepsis (137).

La protéine anticoagulante antithrombine est au cœur du mécanisme principal d'inhibition de la coagulation. Les glycosaminoglycanes sont des macromolécules glucidiques nécessaires au bon fonctionnement de l'antithrombine. Lors d'un sepsis, les cytokines pro-inflammatoires réduisent la production des glycosaminoglycanes et altèrent ainsi le contrôle de la coagulation. La protéine C est également impliquée dans l'anticoagulation car son activation entraîne une inactivation de certains facteurs de coagulation. Chez les patients septiques, la production de protéine C par le foie est diminuée et sa consommation est augmentée (138).

2.3.3 Réponse du système nerveux central

Le système nerveux et le système immunitaire communiquent lors de l'inflammation. Les cellules du système immunitaire peuvent produire des neurotransmetteurs et expriment également des récepteurs de ces médiateurs. La balance entre les deux branches du système nerveux autonome peut diriger le système immunitaire vers une réponse pro ou anti-inflammatoire (**Figure 7**). En effet, l'activation de la voie cholinergique amplifie la réponse anti-inflammatoire alors que celle de la voie adrénergique amplifie la réponse pro-inflammatoire. Dans le sepsis, les fortes concentrations de catécholamines participent à l'augmentation de la réponse pro-inflammatoire initiale par le système nerveux sympathique. A l'inverse, le réflexe anti-inflammatoire du nerf vague inhibe la production de cytokines afin d'éviter les lésions tissulaires. Des études ont montré une corrélation significative entre la baisse d'activité du nerf vague et la mortalité chez les patients septiques (139, 140).

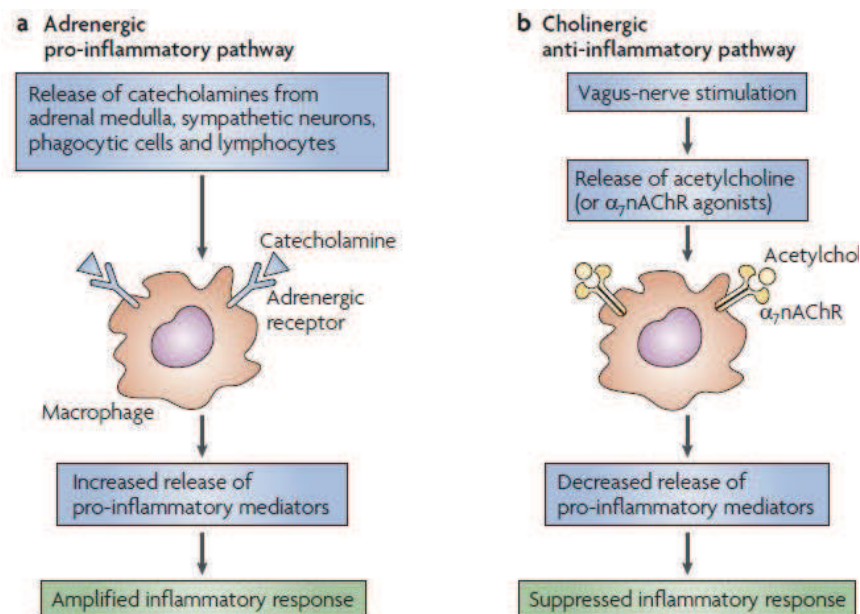


Figure 7 : Effet du système nerveux autonome sur l'inflammation pendant le sepsis (141).

2.3.4 Altérations du métabolisme cellulaire

Plusieurs études chez des patients septiques et dans des modèles animaux ont montré la contribution du stress oxydatif dans la progression de la maladie. En effet, la réponse pro-inflammatoire lors d'un sepsis entraîne une production massive de cytokines mais également un important stress oxydatif (142). Un déséquilibre entre la production de dérivés réactifs de l'oxygène et leur dégradation par les antioxydants s'installe. La fonctionnalité des mitochondries est alors altérée, entraînant une apoptose cellulaire (143). Des neurones apoptotiques avec des mitochondries altérées ont été observés dans le cerveau de patients septiques et dans des modèles animaux et semblent ainsi indiquer un rôle majeur du stress oxydatif dans la survenue d'encéphalopathies lors d'un sepsis (144, 145).

Un autre aspect du déséquilibre métabolique des cellules de patients septiques se traduit par une concentration plasmatique de lactate anormalement élevée. Dans les dernières directives sur la prise en charge des patients, il est recommandé de prendre en compte cette concentration dans le diagnostic et le suivi des patients. Ainsi, une concentration de lactate supérieure à 2 mmol/L malgré une réanimation volémique adaptée est incluse dans les critères définissant le choc septique (1). Cette recommandation fait suite à de nombreuses études montrant une corrélation entre le taux élevé de lactate plasmatique et la sévérité, la morbidité et la mortalité du sepsis (146–148).

2.4 Echec des stratégies thérapeutiques

Les premiers essais cliniques dans le sepsis avaient pour stratégie de cibler uniquement la réponse pro-inflammatoire, avec par exemple des corticostéroïdes à forte dose, des anti-LPS, des immunoglobulines polyvalentes, des antagonistes du récepteur de l'IL-1, mais ces essais ont largement échoué (**Figure 8**). Des études précliniques sur des modèles de sepsis ont montré que les stratégies anticoagulantes avaient un impact bénéfique. Cependant, les essais cliniques d'antithrombine et de protéines C activée n'ont pas conduit au développement d'un traitement (149, 150).

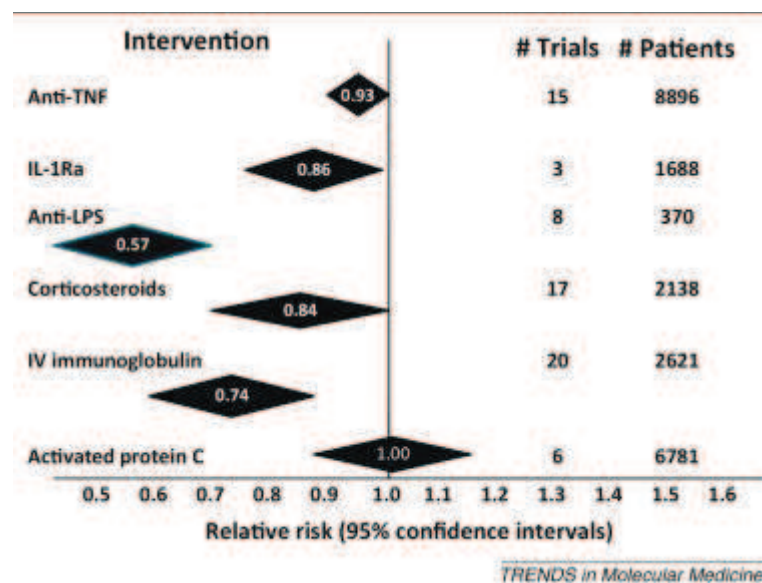


Figure 8 : Efficacité thérapeutique de traitements potentiels du sepsis. Données regroupées de plusieurs essais cliniques randomisés de thérapies ciblant la réponse immunitaire pro-inflammatoire du sepsis. Les données sont représentées par le risque relatif (centre du losange) et par les intervalles de confiance à 95% (extrémités du losange) (151).

L'absence de stratification de ces essais sur le statut immunitaire des patients semble être la cause de leurs échecs. Par exemple, des essais cliniques avec des anticorps anti-TNF monoclonaux ont été effectués sans s'assurer d'une concentration plasmatique de TNF élevée lors de l'administration du

traitement (152). Or, le profil de cytokines des patients septiques varie dans le temps. Ainsi, les nombreux échecs des essais cliniques dans le sepsis sont probablement liés à des considérations pharmacocinétiques et pharmacodynamiques de la réponse du système immunitaire.

Les échecs des stratégies thérapeutiques ont entraîné une réévaluation de la physiopathologie du sepsis. Actuellement, la prise en compte de la dynamique de la réponse immunitaire du patient entre pro-inflammation et immunosuppression est au cœur des nouvelles stratégies thérapeutiques.

3. Immunosuppression

Chez les patients décédés à la suite d'un sepsis, une immunosuppression très marquée est observée. Par exemple, les cellules du système immunitaire se trouvant dans la rate de patients septiques décédés ont une production de cytokines à la fois pro et anti inflammatoire significativement diminuée suite à une activation *ex vivo*. D'autres phénomènes d'immunosuppression sont également observés : expression de récepteurs co-inhibiteurs comme « Programm Cell Death 1 » (PD-1), expansion des lymphocytes T régulateurs et des cellules myéloïdes suppressives ou encore diminution de l'activation des voies de signalisation « Human Leucocyte Antigen D-Related » (HLA-DR) et CD28 (153). Ces résultats indiquent que le phénomène d'immunosuppression touche à la fois l'immunité innée et l'immunité adaptative (Figure 9).

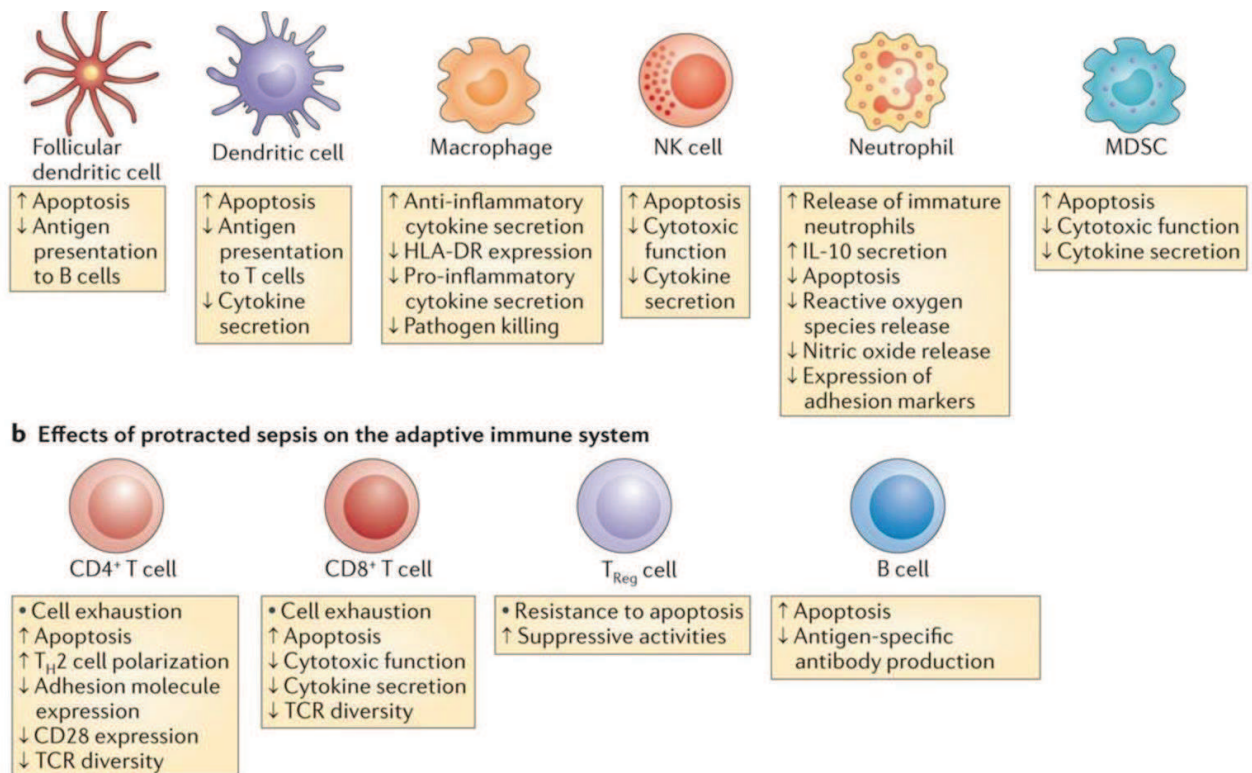


Figure 9: Impact du sepsis sur l'immunité innée (a) et adaptative (b) (4).

3.1 Immunité innée

3.1.1 Polynucléaires neutrophiles et cellules myéloïdes suppressives

Les neutrophiles sont essentiels dans l'élimination des pathogènes lors d'une infection. Des anomalies apparaissent sur cette population dans l'heure suivant l'admission des patients septiques. Tout d'abord, les neutrophiles de patients septiques présentent des altérations phénotypiques avec, par exemple, une augmentation de l'expression des TLR 1, 2, 5 et 8 et une baisse d'expression du CD16

(154). Ensuite, les neutrophiles participent aux défaillances d'organes chez les patients septiques (155). L'autopsie de patients atteints de dysfonctions d'organes multiples a mis en évidence une agrégation de neutrophiles au niveau des vaisseaux sanguins rénaux ainsi qu'une infiltration massive dans les tissus des poumons. Filtrer les neutrophiles des patients ayant une inflammation systémique permet une amélioration des fonctions rénale et respiratoire. Enlever les neutrophiles permettrait donc de diminuer les dysfonctions d'organes mais ces cellules restent nécessaires à l'élimination des pathogènes. Au niveau fonctionnel, l'altération la plus marquée est l'activation d'une survie prolongée. En effet, les neutrophiles entrent normalement en apoptose 24 h après avoir quitté la moelle osseuse. Chez les patients septiques, l'apoptose est retardée, entraînant une augmentation du nombre de neutrophiles (156). D'autres altérations fonctionnelles sont présentes comme une élimination défaillante des bactéries ou une réduction de la production de dérivés réactifs de l'oxygène (157–159). Cependant, ces altérations ne sont pas retrouvées dans toutes les études (160). En revanche, la diminution du recrutement des neutrophiles aux tissus chez les patients septiques a été confirmée. Des neutrophiles immatures sont libérés dans la circulation des patients septiques et ont une fonctionnalité altérée (159, 161). L'apparition de neutrophiles immunosuppresseurs a été observée dans des modèles de sepsis murin et *ex vivo* suite à une stimulation par du LPS (162–164). En effet, une sous-population de neutrophiles produit de grandes quantités d'IL-10 dans le contexte du sepsis. Cependant, cette population n'a jusqu'à maintenant jamais été observée *in vivo* chez l'homme (165). En plus de leur capacité de phagocytose et de libération de molécules antimicrobiennes, les neutrophiles peuvent également piéger les bactéries dans des structures appelées « Neutrophil Extracellular Traps » (NET). Dans le plasma de patients septiques, des interactions plaquettes-neutrophiles entraînent la formation de ces NET (166). En revanche, une formation trop importante de NET ou leur mauvaise élimination peut contribuer à une inflammation persistante ainsi qu'à un épuisement du système immunitaire lors d'un sepsis (167).

Les cellules myéloïdes suppressives (« Myeloid Derived Suppressor Cells »: MDSC) ont également des propriétés immunosuppressives qui, dans des modèles de sepsis, bloquent la prolifération des lymphocytes T ainsi que leur production d'IL-2 et d'IFN γ (168). Cependant, leur rôle dans la réponse immunitaire lors d'un sepsis est encore mal caractérisé. En effet, ces cellules induisent à la fois une action pro et anti-inflammatoire et semblent soit amplifier la réponse inflammatoire disproportionnée lors d'un sepsis, soit l'atténuer. Dans des modèles animaux de sepsis, leur action permet d'augmenter l'élimination du pathogène et réduit la mortalité (169). A l'inverse, chez les patients septiques, leur présence est associée à la lymphopénie ainsi qu'à la mortalité (170). On distingue deux types de MDSC : les monocytiques (M-MDSC) et les granulocytiques (G-MDSC). Le nombre de M-MDSC est augmenté chez l'ensemble des patients de réanimation alors que le nombre de G-MDSC est spécifiquement

augmenté chez les patients septiques (171). De plus, cette augmentation est associée à l'apparition d'infections nosocomiales chez les patients septiques. Les niveaux plasmatiques des médiateurs suppresseurs produits par les MDSC comme S100A8/A9/A12 ainsi que l'expression des gènes correspondants sont significativement augmentés chez les patients septiques. Ces médiateurs sont impliqués dans l'inhibition des fonctions lymphocytaires T et l'expansion des lymphocytes T régulateurs (Treg) (172). Ces résultats suggèrent donc un rôle de ces cellules dans le développement de l'immunosuppression et plus particulièrement au niveau des altérations lymphocytaires T.

3.1.2 Monocytes et macrophages

Les monocytes des patients septiques sont caractérisés par une capacité diminuée à produire des cytokines pro-inflammatoires en réponse à plusieurs agonistes du TLR dont le LPS, ainsi qu'à différents composés bactériens (173). Ce résultat est lié au phénomène de tolérance à l'endotoxine qui se traduit par une réponse diminuée des monocytes et macrophages à un challenge par du LPS suite à une première rencontre avec l'endotoxine (174). La production de TNF, d'IL-1 α , d'IL-6 et d'IL-12 par les monocytes de patients est ainsi diminuée alors que la production de médiateurs pro-inflammatoires comme l'IL-10 est augmentée. Ces données montrent que les monocytes de patients septiques peuvent toujours être activés. En revanche, la voie de signalisation induite par l'activation évolue vers la production de molécules anti-inflammatoires. On parle ainsi de reprogrammation monocyttaire (174, 175). Les deux conséquences majeures de cette reprogrammation monocyttaire sont la production d'IL-10 ainsi que la diminution de la présentation d'antigène se traduisant par la baisse d'expression d'HLA-DR à leur surface (125). Ces deux éléments sont associés avec la gravité du sepsis. La faible expression d'HLA-DR sur les monocytes est un marqueur de l'anergie monocyttaire et plus largement un marqueur d'immunosuppression (176–178). En effet, plusieurs études ont montré une association entre l'expression faible d'HLA-DR et la baisse de TNF et d'IL-1 β suite à une activation bactérienne. Cette baisse est également associée à un risque augmenté d'infections nosocomiales et de mortalité (179).

3.1.3 Cellules dendritiques

Une apoptose considérable touche les cellules dendritiques que ce soit au niveau de la rate ou des cellules circulantes des patients septiques (180). Les cellules dendritiques touchées sont à la fois myéloïdes et plasmacytoïdes. La baisse du nombre de cellules dendritiques est plus importante chez les patients septiques non survivants que survivants mais aussi chez les patients développant des infections nosocomiales par rapport à ceux n'en développant pas (181, 182). Les cellules dendritiques sont également dysfonctionnelles chez les patients. En effet, les cellules dendritiques survivantes présentent une baisse d'expression d'HLA-DR et produisent une plus grande quantité d'IL-10. Les monocytes dérivés des cellules dendritiques des patients septiques sont incapables d'induire une réponse des

lymphocytes T effecteurs et entraînent au contraire une prolifération des lymphocytes Treg et un épuisement des lymphocytes T (183).

3.1.4 Cellules Natural Killer (NK)

Le nombre de cellules NK circulantes est fortement diminué chez les patients septiques et est associé à une forte mortalité (184). Le nombre de cellules NK situées dans les tissus est également diminué chez les patients. De plus, la fonctionnalité de ces cellules est altérée : leur sécrétion de cytokines ainsi que leur cytotoxicité sont diminuées suite à une activation *ex vivo* (185). La baisse de leur production d'IFN γ semble associée à l'apparition d'infections secondaires (186). Une forme de tolérance similaire à celle des monocytes est ainsi observée pour les cellules NK (187).

3.1.5 Lymphocytes T $\gamma\delta$

Cette sous-catégorie de lymphocytes présente des propriétés à la fois de l'immunité innée et adaptative. La plupart de ces cellules se trouvent dans la muqueuse intestinale. Une fois activées, ces cellules produisent de l'IFN γ , de l'IL-17 ainsi que différentes chimiokines (188). Le nombre de ces cellules est significativement diminué chez les patients septiques et cette déplétion est associée à la gravité ainsi qu'à la mortalité. De plus, la perte des cellules $\gamma\delta$ au niveau de la muqueuse intestinale peut entraîner une vulnérabilité du patient plus importante aux pathogènes intestinaux et ainsi aboutir à des infections secondaires (189).

3.2 Immunité adaptative hors lymphocytes T : lymphocytes B

Le nombre de lymphocytes B est fortement diminué chez les patients septiques. Les lymphocytes B des patients possèdent également des altérations phénotypiques (190). Physiologiquement, le CD23 est exprimé à la surface des lymphocytes B. C'est un récepteur de faible affinité des IgE qui permet de renforcer la présentation de l'antigène, de réguler la synthèse des IgE et qui participe à la différenciation et à la maturation des lymphocytes B (191). Le pourcentage de lymphocytes B circulants CD23+ est significativement diminué chez les patients septiques (192). De plus, un pourcentage plus élevé de cellules CD19+ CD23+ est associé à un meilleur pronostic pour le patient. L'expression du CD95, aussi connu sous le nom de « First Apoptosis Signal Receptor » sur les lymphocytes B circulants de patients est augmentée. Ce résultat est en accord avec la lymphopénie ainsi qu'avec l'augmentation de l'apoptose des lymphocytes B observées chez les patients (193). Au niveau fonctionnel, l'activation et la prolifération des lymphocytes B de patients en choc septique sont diminuées en comparaison avec des volontaires sains suite à une stimulation *ex vivo* alors que leur production d'IL-10 est augmentée (190). Le sang des patients septiques contient également des plasmocytes absents chez les volontaires sains.

3.3 Altérations lymphocytaires T lors d'un sepsis

3.3.1 Lymphopénie et apoptose

La lymphopénie T chez les patients septiques est une altération largement reportée et impacte fortement les lymphocytes T circulants (4, 194). Une déplétion lymphoïde T est également observée au niveau de la rate, des ganglions lymphatiques et de la moelle osseuse (193, 195) (**Figure 10**). Le nombre de lymphocytes T anormalement bas apparaît dès la survenue du sepsis et peut perdurer jusqu'à 28 jours après le diagnostic (196, 197). De nombreuses études ont reporté une association entre la lymphopénie et la sévérité des patients septiques (198, 199). Cependant, l'utilisation de la lymphopénie comme marqueur de mortalité présente des limites. En effet, la lymphopénie est fortement associée à la mortalité mais une étude sur plus de 300 patients septiques a montré un recoupement important du nombre absolu de lymphocytes T chez les patients septiques survivants et non survivants (194).

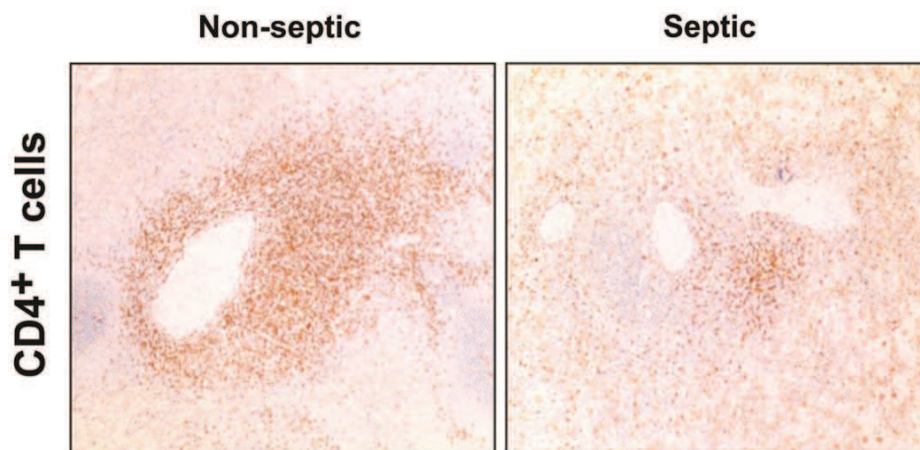


Figure 10: Diminution significative de la population de lymphocytes T CD4+ dans la rate d'un patient septique en comparaison avec un patient de réanimation non septique (200)

Le lien entre la lymphopénie T et le développement d'une apoptose lymphocytaire T massive lors d'un sepsis a été établi (201). Dans un modèle de lapins septiques via ligature et ponctions caecales (« Cecal Ligation and Puncture » : CLP), les auteurs ont observé le déclenchement d'une apoptose lymphocytaire dans les quatre heures suivant l'intervention chirurgicale (202). Au sein des lymphocytes T, l'apoptose est spécifique à certaines sous-populations. Dans des modèles murins de sepsis, les lymphocytes T centraux mémoires semblent être épargnés alors que les lymphocytes T effecteurs mémoires et naïfs subissent une apoptose marquée (203).

La voie intrinsèque de l'apoptose se déclenche suite à une inversion de la balance entre protéines pro et anti-apoptotiques à l'intérieur de la mitochondrie (**Figure 11**). Chez les patients septiques, l'expression des protéines anti-apoptotiques comme « B Cell Lymphoma 2 » (BCL-2) et « B-Cell

Lymphoma-extra large » (BCL-X_L) est diminuée alors que l'expression des protéines pro-apoptotiques comme « BCL2 homology 3 only » (BIM) et « BCL-2 associated X protein » (BAX) est augmentée (204, 205). Il s'ensuit l'activation de la voie de signalisation médiée par la caspase 9.

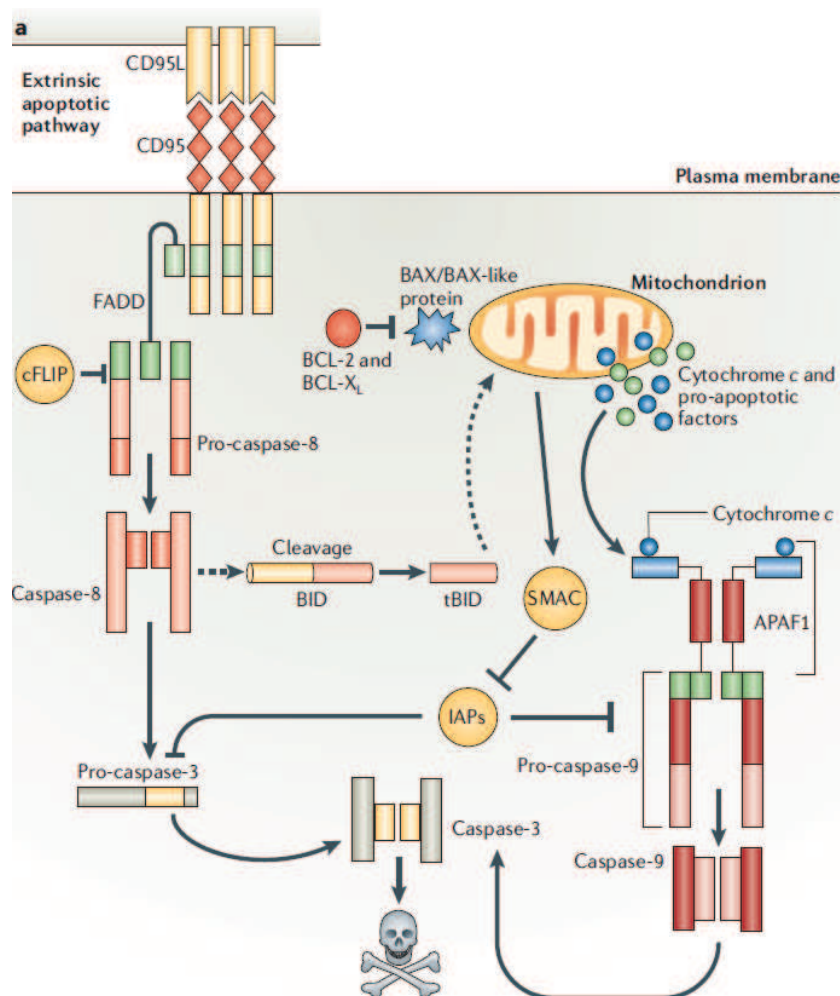


Figure 11: Voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose (206).

La voie extrinsèque de l'apoptose est initiée suite à la liaison d'inducteurs à des protéines de surfaces, tel que les récepteurs FAS, CD95 ou encore « TNF Related Apoptosis Inducing Ligand Receptor 1 » (TRAIL-R1) (**Figure 11**). Cette voie de l'apoptose est médiée par la caspase 8. Dans un modèle murin de sepsis, le TRAIL est une molécule produite lors de la présentation de cellules apoptotiques par les cellules dendritiques aux lymphocytes T CD8. Ces lymphocytes T CD8 sont alors considérés comme régulateurs (207). En effet, la production de TRAIL inhibe les fonctions effectrices des lymphocytes T CD4. Ainsi, l'apoptose lymphocytaire via la liaison de TRAIL à son récepteur a un rôle dans l'immunosuppression chez les patients septiques en induisant une lymphopénie mais également en inhibant les fonctions des lymphocytes T. La voie FAS/FAS-Ligand semble être plus particulièrement liée à l'apoptose induite par l'activation des lymphocytes T. En effet, dans des conditions physiologiques,

une majorité de lymphocytes T entrent en apoptose suite à leur activation et ce phénomène est médié par cette voie (208). Le gène codant pour la protéine FAS a été retrouvé surexprimé chez les patients septiques (209). Il est donc possible que l'apoptose induite par l'activation des lymphocytes T soit amplifiée dans le contexte du sepsis. Cependant, ce phénomène ne semble pas être la cause principale de l'apoptose lymphocytaire (210). Enfin, l'apoptose peut être médiée par le réticulum endoplasmique suite à un stress : une accumulation de protéines dans le réticulum endoplasmique induit l'activation de la caspase 12 et ainsi de l'apoptose. Le blocage de cette voie a engendré une amélioration de la survie dans un modèle de souris septique (211). Ainsi, les différentes voies de l'induction du phénomène d'apoptose semblent être impliquées dans la physiopathologie du sepsis et représentent de potentielles cibles thérapeutiques. Cette hypothèse a été testée de différentes manières sur des modèles de souris septiques. Par exemple, au niveau de la voie intrinsèque de l'apoptose, induire une surexpression de *Bcl-2* entraîne une amélioration de la survie (212). Au niveau de la voie extrinsèque, bloquer le récepteur CD95 permet de réduire la mortalité (213). Les ARN silencieux bloquant la voie FAS/FAS-L ou directement les caspases ont également été testés dans un modèle murin de sepsis. Ce type de traitement entraînait une diminution de l'apoptose ainsi qu'une diminution de la mortalité (214).

Deux mécanismes sont suggérés pour expliquer l'effet positif de la prévention de l'apoptose dans le sepsis (215). Tout d'abord, une apoptose diminuée entraîne une baisse de la phagocytose des lymphocytes T morts par les macrophages et ainsi une baisse de la production d'IL-10 et de Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF). Ensuite, cela permet aux lymphocytes T survivants de produire de l'IFN γ et de l'IL-17, permettant d'améliorer la réponse immunitaire pour éliminer le pathogène dans la phase précoce du sepsis (216). Bien que les études montrant l'effet bénéfique de traitements anti-apoptotiques au niveau des lymphocytes T soient nombreuses, une étude sur un modèle de souris septiques ayant un cancer montre que la prévention de l'apoptose lors de la survenue du sepsis entraîne au contraire une augmentation de la mortalité (217). Ce type d'étude met l'accent sur la nécessité de prendre en compte les comorbidités des patients et plus globalement l'hétérogénéité des patients dans la prise en charge thérapeutique.

3.3.2 Notion d'épuisement lymphocytaire

L'épuisement a tout d'abord été observé dans les lymphocytes T CD8 d'un modèle de souris infectées par le virus de la chorioméningite lymphocytaire (« Lymphocytic Choriomeningitis Virus » : LCMV) (218). Les lymphocytes T CD8 de ces souris exprimaient des marqueurs d'activation et étaient capables de proliférer *in vivo* mais leurs fonctions effectrices étaient totalement défectueuses. Cet état d'épuisement était d'autant plus marqué en l'absence des lymphocytes T CD4. La présence de lymphocytes T épuisés a ensuite été montrée dans d'autres modèles d'infection comme le VIH,

l'hépatite B et l'hépatite C mais aussi dans le cancer (219–221). L'épuisement lymphocytaire est aujourd'hui défini comme une incapacité des lymphocytes T à accomplir leurs fonctions effectrices, associée à une surexpression multiple de récepteurs co-inhibiteurs comme PD-1, « Lymphocyte Activation Gene 3 » (LAG-3), « T-Cell Immunoglobulin and mucin domain containing Molecule 3 » (TIM-3), CD160, « T cell Immunoglobulin and ITIM domain » (TIGIT) et d'autres (222) (**Figure 12**). Cet état d'épuisement a été principalement étudié dans les lymphocytes T CD8 mais est également observé dans les lymphocytes T CD4 (223). Les similitudes des altérations phénotypiques et fonctionnelles des lymphocytes T de patients septiques et des lymphocytes T dits épuisés dans des infections chroniques ou dans le cancer indiquent qu'un phénomène semblable survient lors du sepsis (224).

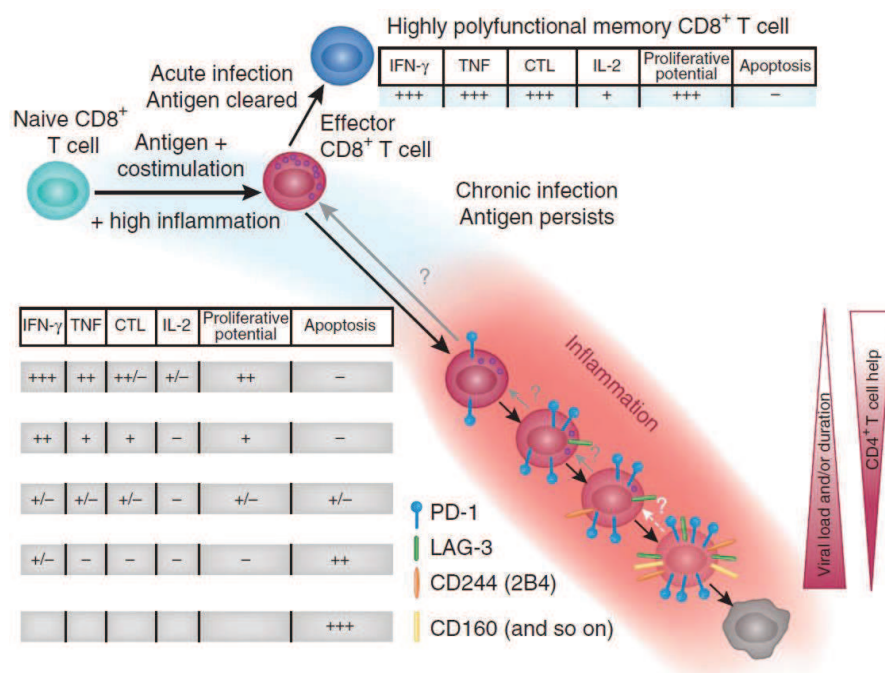


Figure 12: Epuisement des lymphocytes T CD8 (13).

3.3.3 Altérations phénotypiques

Expression de récepteurs co-inhibiteurs

Une première étude de Boomer *et al.* a consisté à caractériser des cellules du système immunitaire dans les poumons et la rate de patients décédés suite à un sepsis en comparaison avec celles de patients en état de mort cérébrale ou ayant reçu une splénectomie suite à un trauma (153). Les altérations phénotypiques observées sur les lymphocytes T spléniques étaient nombreuses: une augmentation de l'expression de CD69, un marqueur d'activation précoce des lymphocytes T, et une augmentation de l'expression du récepteur de l'IL-2 (CD25) également reconnu comme un marqueur d'activation (225). Malgré ce phénotype activé, l'expression du récepteur co-stimulateur CD28 était diminuée chez les

patients et celle des récepteurs co-inhibiteurs était augmentée (PD-1 sur les CD4 et « Cytotoxic T-Lymphocyte-4 Antigen-4 » [CTLA-4] sur les CD8).

Dans une autre étude de Boomer *et al.*, le phénotype des lymphocytes T circulants de patients septiques a été évalué (5). Les lymphocytes T CD4 et CD8 présentait un niveau d'expression du récepteur co-inhibiteur CTLA-4 moins élevé que les volontaires sains, de manière plus flagrante sur les lymphocytes T CD4 que sur les CD8. A l'inverse, le récepteur co-inhibiteur LAG-3 était plus exprimé chez les patients que chez les volontaires sains et ce de manière plus marquée sur les lymphocytes T CD8 que sur les CD4. L'expression du marqueur précoce d'activation CD69 était lui plus élevé sur les lymphocytes T CD4 des patients en comparaison avec les volontaires sains. Aucune différence d'expression n'était observée sur les récepteur co-inhibiteurs TIM-3 et PD-1. Dans cette même étude, l'évolution de l'expression de ces marqueurs au cours du sepsis a été évaluée : la première mesure était effectuée lors du diagnostic du patient et la seconde sept jours plus tard. Les auteurs ont observé une augmentation au cours du temps de l'expression de CTLA-4 à la fois sur les lymphocytes T CD4 et CD8. De plus, les expressions de LAG-3 et TIM-3 sur les lymphocytes T CD4 augmentaient également de manière significative entre le jour 0 (J0) et J7.

Guignant *et al.* ont montré une augmentation de l'expression de PD-1 à la surface des lymphocytes T CD4 de patients septiques corrélée avec une augmentation de la mortalité mais aussi avec le développement d'infections nosocomiales (226). De plus, la surexpression de PD-1 était corrélée avec l'altération de la prolifération des lymphocytes T CD4 et l'augmentation de la concentration plasmatique d'IL-10 des patients.

Dans l'ensemble, ces études indiquent une altération phénotypique des lymphocytes T avec une surexpression de récepteurs co-inhibiteurs. De plus, ces altérations phénotypiques semblent évoluer au cours de la pathologie. Elles semblent également associées avec les altérations fonctionnelles des lymphocytes T et la mortalité des patients.

Altérations de la diversité du répertoire du « T Cell Receptor" (TCR)

Dans un modèle CLP de souris septiques, la lymphopénie entraînée lors de la survenue du sepsis était suivie d'une récupération du nombre de lymphocytes T CD4 au niveau du thymus (227). Cependant, la composition de la population de lymphocytes T CD4 naïfs suite à cette reconstitution était altérée. En effet, suite à la deuxième rencontre d'un pathogène, les lymphocytes T CD4 antigènes spécifiques répondaient par une prolifération et une fonctionnalité diminuées. Ces altérations corrélaient également avec des changements intrinsèques de l'hétérogénéité des clones V β (227). Il semble donc que la prolifération homéostatique suite à la lymphopénie induite par le sepsis réduise l'éventail de

pathogènes pouvant être reconnus par les lymphocytes T CD4. Ce phénomène a aussi été observé dans un modèle de souris septiques sur les lymphocytes T CD8. Le rétablissement incomplet de la population de lymphocytes T naïfs spécifiques d'antigènes persistait pendant plusieurs mois simultanément avec une réponse altérée des lymphocytes T CD8 naïfs à une infection virale ou bactérienne (228). Ces observations suggèrent une association entre la diminution de la diversité du TCR suite à un sepsis et l'altération de la réponse immunitaire de l'hôte face à un pathogène plusieurs mois après la survenue du sepsis.

La diminution de la diversité du répertoire du TCR également été observée sur les lymphocytes T de patients septiques. Ce phénomène est présent dès l'admission des patients et semble se rétablir dans la première semaine suivant la survenue du sepsis. En revanche, la diversité du répertoire du TCR n'est pas restaurée chez les patients décédés suite à un sepsis (229–231).

3.3.4 Altérations fonctionnelles

Les lymphocytes T CD4 sont essentiels dans la mise en place d'une réponse immunitaire efficace, influençant à la fois l'immunité innée et adaptative par la production de cytokines ou par des interactions cellulaires (232). Les lymphocytes T CD4 sont également essentiels pour une réponse des lymphocytes T CD8 primaires et la formation de lymphocytes T CD8 mémoires fonctionnels (233, 234). Les altérations fonctionnelles des lymphocytes T CD4 observées dans le sepsis et le choc septique sont similaires à celles caractéristiques d'un état d'épuisement. Suite à une activation *ex vivo* de lymphocytes T CD4 de la rate de patients septiques décédés, leur production d'IFN γ , de TNF α et d'IL-6 était presque inexistante (153). Ces altérations sont également observées sur des lymphocytes T CD4 circulants de patients septiques (5, 235, 236). De plus, leur capacité de prolifération est diminuée (8). Les altérations fonctionnelles des lymphocytes T CD8 chez les patients septiques sont similaires à celles des lymphocytes T CD4. La capacité cytotoxique des lymphocytes T CD8 semble être altérée mais uniquement chez certains patients. En effet, une étude a mis en évidence une baisse d'expression du CD107a, marqueur de dégranulation des lymphocytes T cytotoxiques, uniquement à la surface des lymphocytes T CD8 de patients en sepsis sévère atteints d'une réactivation du cytomégalovirus (CMV) (237). Les lymphocytes T CD4 et CD8 présentent donc une fonctionnalité altérée, caractéristique de l'épuisement lymphocytaire T. De plus, ces altérations fonctionnelles sont associées avec la mortalité (6).

Certaines études ont évalué la persistance des altérations lymphocytaires T chez les patients septiques. Il semblerait que les altérations fonctionnelles soient plutôt transitoires que permanentes. Suite à une activation *in vivo* et *ex vivo*, les lymphocytes T de souris septiques proliféraient normalement et avaient une production d'IL-2 comparable à celle des contrôles dix jours après la survenue du sepsis (238). Ce résultat a été en partie confirmé chez des patients ayant une maladie grave chronique et ayant

été traités pour un sepsis sévère. Les lymphocytes T de ces patients ont été récupérés en moyenne dix jours après leur admission. Suite à une activation *ex vivo*, les lymphocytes T CD4 et CD8 ne présentaient pas d'altérations fonctionnelles au niveau de leur prolifération et de leur production d'IL-2 par rapport à des lymphocytes T de volontaires sains (239). Une autre étude a montré une tendance à la baisse non significative de la production d'IFN γ suite à l'activation de lymphocytes T de patients septiques prélevés dans les 9 à 52 mois suivant l'hospitalisation (240). Malgré une lymphopénie encore présente à la sortie de réanimation, les patients en choc septique présentent un nombre de lymphocyte T similaires à celui de volontaires sains 6 mois après leur hospitalisation (241). Globalement, les lymphocytes T des patients survivants semblent revenir à un niveau de fonctionnalité similaire à celui de volontaires sains à la suite d'un sepsis. Les altérations des lymphocytes T chez les patients septiques pourraient donc être un phénomène réversible disparaissant lorsque le système immunitaire du patient retourne à l'homéostasie. Ces altérations pourraient ainsi être persistantes chez les patients non survivants.

3.3.5 *Lymphocytes Treg*

Le pourcentage de lymphocytes Treg circulants est augmenté chez les patients septiques dès le diagnostic (242). Cependant, cette augmentation n'est persistante que chez les patients qui vont décéder. L'augmentation de la proportion de Treg se fait au détriment des cellules T effectrices et non pas par une augmentation de leur nombre absolu (243). Ainsi, l'apoptose généralisée des cellules du système immunitaire ne semble pas impacter les lymphocytes Treg. Les alarmines sont augmentées dans le sepsis. Ces DAMP ont une forte capacité d'induction des lymphocytes Treg et pourraient donc participer à l'expansion de cette population (244). Ce phénomène est associé à une diminution de la prolifération des lymphocytes T ainsi qu'à une altération de leur fonctionnalité. Les lymphocytes Treg inhibent également les fonctions des monocytes et des neutrophiles (245).

3.3.6 *Altérations bioénergétiques*

Altérations métaboliques des lymphocytes T

Les lymphocytes T épuisés sont incapables d'accomplir leurs fonctions effectrices. L'hypothèse d'altérations métaboliques entraînant une activité métabolique insuffisante pour supporter les fonctions effectrices est donc pertinente dans ce contexte. Suite à une activation, les lymphocytes T subissent une reprogrammation métabolique. En effet, les lymphocytes T naïfs utilisent principalement la phosphorylation oxydative (OXPHOS) comme source de production d'énergie. L'activation du TCR oriente la production d'énergie vers la voie de la glycolyse. L'utilisation de la glycolyse est nécessaire pour supporter la demande énergétique de la croissance cellulaire et de la différenciation en cellules effectrices (246). Les cellules qui prolifèrent ont un fort taux de glycolyse aérobie malgré la quantité

suffisante d'oxygène disponible pour alimenter la voie OXPHOS. Ce phénomène est connu sous le nom d'effet Warburg et est également observé dans les cellules cancéreuses (247, 248). La reprogrammation métabolique est indispensable aux lymphocytes T pour être fonctionnels tout au long de leur différenciation. Le switch vers la glycolyse est nécessaire aux lymphocytes T activés et effecteurs et le retour à la voie OXPHOS est nécessaire pour la conversion des lymphocytes T effecteurs en lymphocytes T mémoires. Chez les patients septiques, il a été montré que les voies OXPHOS et glycolytique étaient altérées (249). L'activation de la voie « Phosphatidylinositol-3-Kinase » (PI3K)-Akt-« mechanistic target of rapamycin » (mTOR) est nécessaire pour la reprogrammation métabolique des lymphocytes T CD4 en effecteurs et des lymphocytes T CD8 en lymphocytes T cytotoxiques (250, 251) (**Figure 13**). Cette voie est également altérée dans les lymphocytes T de patients septiques (249). L'assimilation du glucose via son transporteur GLUT1 est un mécanisme régulateur important de la reprogrammation métabolique suivant l'activation. L'expression de GLUT1 est augmentée *ex vivo* à la suite d'une activation du TCR et *in vivo* à la suite d'une infection (252). Chez les patients septiques, le niveau d'expression de GLUT1 est plus élevé que chez les volontaires sains. En revanche, l'assimilation du glucose par les lymphocytes T CD4 via le transporteur GLUT1 suite à une activation *ex vivo* est altérée.

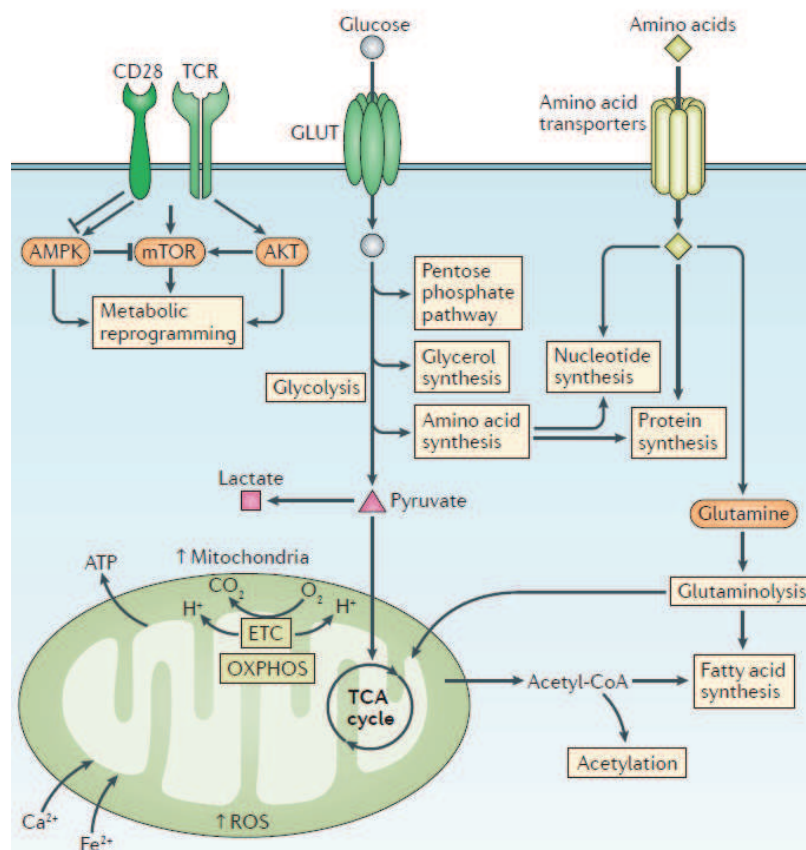


Figure 13: Les différentes voies métaboliques utilisées par les lymphocytes T tout au long de leur différenciation (253).

3.4 Vers de nouvelles stratégies thérapeutiques

La réponse immunitaire de l'hôte étant au centre de la physiopathologie du sepsis, l'orientation vers des thérapies immunomodulatrices semble être pertinente. Jusque récemment, ce type de stratégie était orientée uniquement vers le blocage de la réponse immunitaire et de l'inflammation. Les essais cliniques correspondant ont largement échoué. Au vue de la physiopathologie du sepsis, ce type de thérapie peut sans doute être bénéfique pour le patient mais demande une stratification précise, par exemple sur le niveau des cytokines pro-inflammatoires des patients, et doit avoir une action courte. En effet, des patients septiques avec les mêmes symptômes et signes cliniques peuvent ainsi avoir un profil de cytokines très différent (254). La plupart des patients vont rapidement évoluer vers un état d'immunosuppression prépondérant. Les recherches se dirigent ainsi actuellement vers des immunostimulants (**Figure 14**).

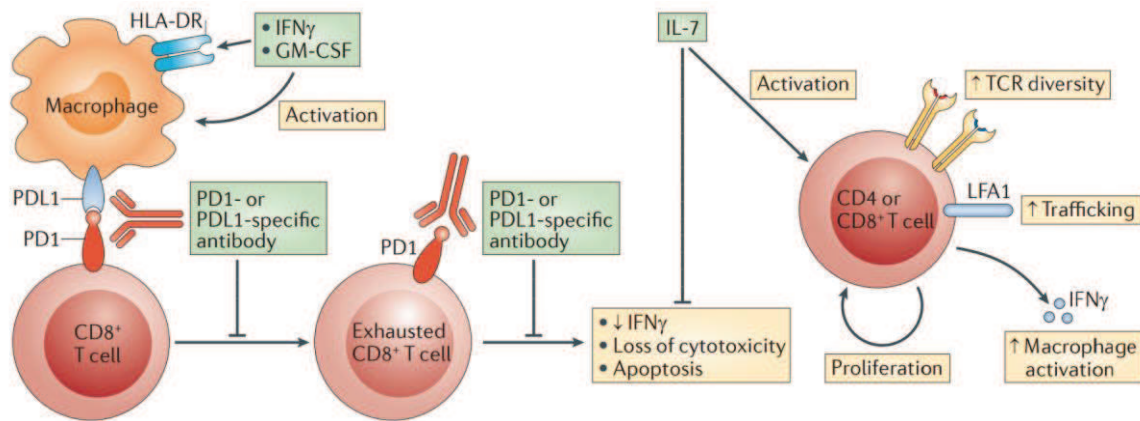


Figure 14: Les immunothérapies dans le sepsis (4).

Le facteur de croissance GM-CSF permet d'activer et d'induire la production de neutrophiles, de monocytes et de macrophages. C'est donc un potentiel traitement immunostimulant dans le sepsis qui a été testé dans deux études. Afin de sélectionner uniquement les patients dans la phase immunosuppressive, la stratification a été basée sur l'expression d'HLA-DR à la surface des monocytes. Seuls les patients ayant une baisse persistante de l'expression d'HLA-DR ont été sélectionnés pour l'essai. Les résultats montrent que les patients traités avec du GM-CSF avaient une expression d'HLA-DR restaurée ainsi qu'une durée d'hospitalisation plus courte (255). Dans une autre étude en pédiatrie, les patients ont été identifiés comme immunosupprimés lorsque la production de TNF α suite à une stimulation *ex vivo* par LPS sur sang total était inférieure à 200 pg/mL. Le traitement par du GM-CSF permettait alors de restaurer la production de TNF α et de diminuer l'apparition d'infections nosocomiales (256).

Un autre traitement immunostimulant potentiellement thérapeutique dans le contexte du sepsis est l'IFN γ . Des expériences *in vitro* ont montré que le traitement IFN γ permettait de restaurer la production de cytokines pro-inflammatoires des monocytes dans des modèles de sepsis et chez des patients septiques (257). Les patients étaient stratifiés à la fois sur l'expression d'HLA-DR sur les monocytes et sur la production de TNF α suite à une stimulation *ex vivo* par du LPS sur sang total.

Une autre thérapie immunomodulatrice prometteuse cible les récepteurs co-inhibiteurs présents à la surface des lymphocytes T. Par exemple, PD-1 est surexprimé sur les lymphocytes T de patients septiques. La voie de signalisation induite inhibe la prolifération des lymphocytes T ainsi que leur production de cytokines et leur fonction cytotoxique (226). Des anticorps bloquants de PD-1 ou de son ligand PD-L1 permettraient ainsi de restaurer la fonctionnalité des lymphocytes T. Dans d'autres contextes d'épuisement lymphocytaire comme l'hépatite B ou le VIH, bloquer PD-1 permet de restaurer la fonctionnalité des lymphocytes T *in vitro* (258, 259). L'utilisation d'un anti-PD-1 en cancérologie, le Nivolumab, est maintenant approuvée par la FDA pour plusieurs types de cancer (260). Dans un modèle de souris septiques, le traitement anti-PD-L1 permettait d'inhiber partiellement l'apoptose des lymphocytes T et de restaurer les fonctions monocytaires (261). Une étude préclinique a évalué l'effet du blocage de cette voie sur des lymphocytes T de patients septiques en testant à la fois un anticorps anti-PD-1 et anti-PD-L1 (262). Les résultats montrent une diminution de l'apoptose des lymphocytes T ainsi qu'une augmentation de leur production d'IFN γ et d'IL-2. De plus, l'expression de PD-1 sur les lymphocytes T CD4 est corrélée avec l'apoptose de ces cellules, suggérant un rôle potentiel de PD-1 comme marqueur de stratification ou marqueur de l'efficacité du traitement. Un essai clinique est actuellement en cours pour évaluer l'efficacité d'une thérapie avec un anticorps anti-PD-L1 (NCT02576457). A l'inverse de PD-1, le rôle de TIM-3 dans le sepsis semble moins clair. En effet, dans un modèle de souris septiques CLP, le blocage de la voie de signalisation TIM-3 a entraîné une augmentation de l'apoptose des lymphocytes T, aggravant ainsi la lymphopénie. Les checkpoints inhibiteurs ne semblent donc pas tous présenter un intérêt thérapeutique dans le sepsis (263).

L'IL-7 est également un potentiel traitement immunostimulant dans le contexte du sepsis. Des études précliniques sur des modèles murins de sepsis et *ex vivo* sur des lymphocytes T de patients septiques ont montré que le traitement par de l'IL-7 permettait de rétablir les altérations des lymphocytes T (7, 8, 249, 264). Un essai clinique de phase II récent a mis en évidence la capacité de la thérapie IL-7 à restaurer le compte de lymphocytes T de patients en choc septique atteint d'une lymphopénie sévère en l'absence d'effet indésirable grave (9). Dans l'optique du développement de ce traitement, il est pertinent de s'intéresser à la régulation de son récepteur dans le sepsis.

4. L'interleukine 7 et son récepteur

4.1 La cytokine IL-7

4.1.1 Gène et protéine IL-7

Le gène de l'IL-7 a une longueur de 72 kb et se trouve sur le chromosome 8. Il code pour une protéine composée de 177 acides aminés (AA) avec un poids moléculaire de 20 kDa. La forme active de l'IL-7 est une glycoprotéine de 25kDa composée de quatre hélices alpha autour d'un noyau central hydrophobe (265, 266).

Chez l'homme, la cytokine IL-7 est produite par différentes cellules : les cellules épithéliales intestinales, les kératinocytes et les cellules des tissus hépatiques (267–269). De plus, les cellules dendritiques périphériques et folliculaires, les cellules endothéliales, les fibroblastes et les cellules des muscles lisses produisent également de l'IL-7 (270, 271). Les cellules stromales non hématopoïétiques semblent être les principales cellules productrices d'IL-7. La production de l'IL-7 est constitutive et limitée, entraînant ainsi une compétition entre les lymphocytes T pour accéder à cette cytokine. Le mécanisme d'induction de la synthèse d'IL-7 a été étudié. L'IFN γ entraîne une augmentation de l'expression de l'ARN messager codant pour l'IL-7 (272) et l'IL-1 et le TNF α induisent la synthèse d'IL-7 par les cellules stromales (273).

4.1.2 Le récepteur de l'IL-7

L'IL-7 se lie à la forme membranaire de son récepteur, induisant ainsi la cascade de signalisation intracellulaire. Le récepteur membranaire est composé de deux chaînes: une chaîne CD127 (ou IL-7R α), spécifique du récepteur de l'IL-7, et une chaîne CD132 (ou chaîne γ c), commune aux récepteurs de l'IL-2, l'IL-4, l'IL-9, l'IL-15 et l'IL-21. Le CD127 est une glycoprotéine membranaire composée de 439 AA avec un poids moléculaire de 49,5 kDa. Le domaine transmembranaire comporte 25 AA et la queue cytoplasmique comporte 195 AA (274).

Le récepteur de l'IL-7 (IL-7R) est différenciellement exprimé au cours de la maturation des lymphocytes B et T (**Figure 15**). Le récepteur de l'IL-7 n'est pas exprimé par les cellules souches hématopoïétiques. Lors du développement des lymphocytes B, il est exprimé sur les cellules progénitrices lymphoïdes dans la moelle osseuse, puis son expression diminue graduellement des cellules pro-B aux cellules pre-B avant de disparaître sur les lymphocytes B matures. Lors du développement des lymphocytes T, le récepteur de l'IL-7 n'est pas exprimé à la surface des cellules progénitrices précoces des lymphocytes T dans le thymus. En revanche, le récepteur est exprimé à la

surface des thymocytes double négatifs, puis son expression baisse sur les thymocytes double positifs avant d'être à nouveau présente sur les thymocytes simple positifs.

Le récepteur de l'IL-7 est majoritairement exprimé sur les lymphocytes T matures à l'exception des lymphocytes Treg.

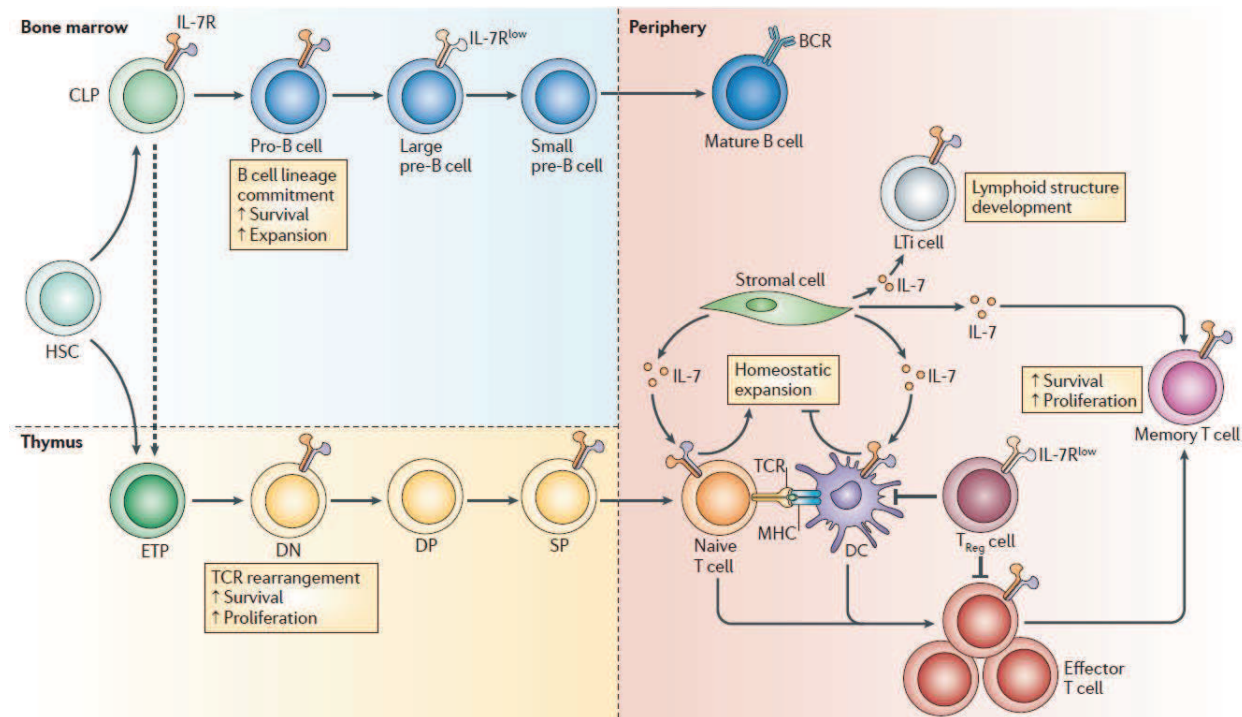


Figure 15: Expression du récepteur de l'IL-7 à la surface des lymphocytes au cours de leur maturation et différenciation (275).

Le récepteur de l'IL-7 est également exprimé sur les cellules dendritiques pour lesquelles la voie de signalisation médiée par la « Thymic Stromal Lymphopoietin » (TSLP), agoniste de l'IL-7, a un rôle important dans le développement (276, 277). Cette voie permet également aux cellules dendritiques de réguler la prolifération des lymphocytes en réponse aux auto-antigènes, évitant ainsi l'auto-immunité en cas de lymphopénie par exemple (278).

Enfin, le CD127 est également exprimé à la surface des « Innate Lymphoid Cells » (ILC). Cette famille comprend les cellules cytotoxiques NK, les « Lymphoid Tissue Inducer » mais aussi d'autres cellules non cytotoxiques. Ces cellules sont caractérisées par l'absence de marqueur de lignée et l'expression du CD127 (279). Elles expriment également le CD25. Ces cellules favorisent la réponse du système immunitaire contre les pathogènes et participent à l'inflammation et à la réparation tissulaire.

4.1.3 Rôle de l'IL-7

Lymphocytes B

Les nourrissons ayant des mutations au niveau du récepteur de l'IL-7 ont un nombre normal de lymphocytes B circulants (280). Malgré un rôle redondant chez l'homme, plusieurs études ont montré l'importance de l'IL-7 dans le développement des lymphocytes B. Des cultures *ex vivo* ont permis de montrer un rôle de l'IL-7 dans le réarrangement des chaînes légères d'immunoglobulines dans les stades précoces de développement des lymphocytes B (281).

D'autres éléments sur le rôle de l'IL-7 dans le développement des lymphocytes B viennent de l'étude de pathologies dans lesquelles les niveaux d'IL-7 sont supraphysiologiques comme chez les patients VIH ou atteints de lymphopénie idiopathique CD4 (282, 283). Chez ces patients, des niveaux plus élevés de lymphocytes B immatures et transitionnels sont observés et corrélient quantitativement avec l'élévation de la concentration d'IL-7. De plus, chez les patients traités avec de l'IL-7 recombinante, une expansion massive des lymphocytes B immatures et transitionnels est observée. En effet, lors d'un essai clinique de phase I chez des patients atteints de cancers métastasés, le nombre de lymphocytes B CD19+CD10+ était significativement augmenté dans le sang alors que le nombre de lymphocytes B matures était inchangé (284). Dans l'ensemble, ces observations montrent un rôle de l'IL-7 dans le développement et la maturation des lymphocytes B.

Lymphocytes T

A l'inverse des observations sur les lymphocytes B, l'IL-7 est indispensable au développement des lymphocytes T. En effet, chez l'homme, les mutations du récepteur de l'IL-7 entraînent l'apparition de déficits immunitaires combinés graves (285, 286). L'IL-7 fournit des signaux prolifératifs aux thymocytes double négatifs et entraîne également une recombinaison de la chaîne γ du TCR (275). En plus de son rôle essentiel dans le développement des lymphocytes T, l'IL-7 est l'acteur majeur de l'homéostasie des lymphocytes T circulants. Lors de son interaction avec ces cellules, l'IL-7 permet de diminuer leur apoptose et d'augmenter leur prolifération (287). L'IL-7 est ainsi essentielle à la survie et au maintien d'une population de lymphocytes T fonctionnels.

4.1.4 Voies de signalisation

Deux voies de signalisation principales sont induites lors de l'interaction de l'IL-7 avec son récepteur : la voie « Janus Kinase » (JAK) - « Signal Transducer and Activator of Transcription » (STAT) et la voie PI3K (**Figure 16**). Le rapprochement de JAK1 et JAK3 lors de la liaison IL-7/IL-7R initie chacune de ces deux voies. Les deux protéines peuvent alors se phosphoryler l'une l'autre, augmentant ainsi leur activité. Les

protéines JAK phosphorylent ensuite le récepteur de l'IL-7 créant ainsi un site d'amarrage pour différentes molécules de signalisation. Dans la voie JAK/STAT, STAT5 est à son tour phosphorylé et passe dans le noyau où il induit la transcription de gènes. Suite à cette cascade de phosphorylation, l'expression des protéines de survie BCL2 et « Myeloid Cell Leukemia Sequence 1 » (MCL1) est augmentée alors que l'expression des protéines pro-apoptotiques BAX, BAD et BIM est diminuée (288). Suite à la phosphorylation de JAK1 et JAK3, cette voie induit la phosphorylation de PI3K suivie de celle d'Akt entraînant le blocage de l'inhibiteur du cycle cellulaire p27, l'induction de l'expression de la cycline D1 et l'induction du « Cell Division Cycle 25 homologue A » (CDC25A) permettant le maintien du cycle de division cellulaire (289). La liaison IL-7/IL-7R induit également une diminution de l'expression de modulateurs du TCR comme « Casistas B-lineage lymphoma B » (CBL-B).

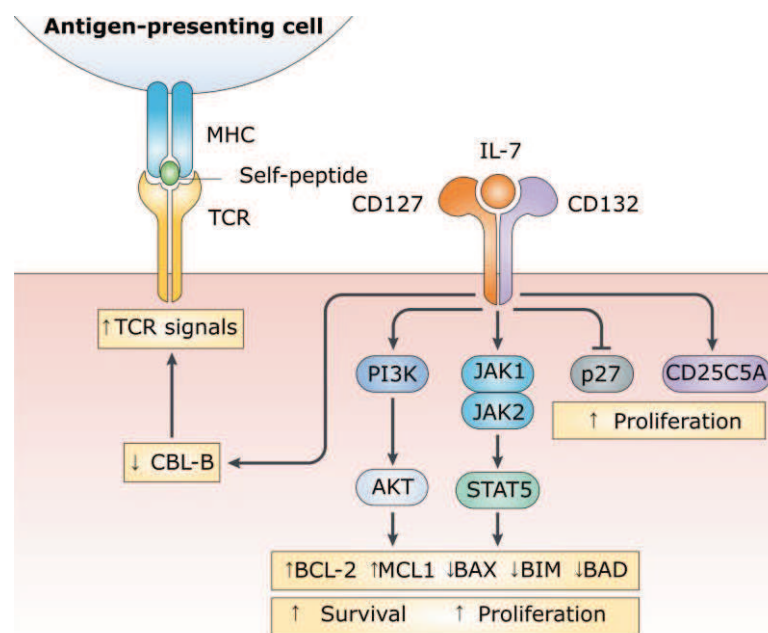


Figure 16 : Voie de signalisation de l'IL-7 (275).

4.1.5 La TSLP, un analogue de l'IL-7

La TSLP est une cytokine analogue de l'IL-7. Son interaction avec le récepteur de l'IL-7 nécessite la chaîne CD127, spécifique du récepteur de l'IL-7, mais aussi une autre chaîne appelée TSLPR. Chez l'homme, ce complexe spécifique semble être principalement présent sur les cellules dendritiques et sur les monocytes (290, 291). Il est également retrouvé dans différents tissus comme les reins ou le foie. Des modèles de souris TSLPR^{-/-} ont été générés. Les lignées myéloïdes, lymphoïdes, les cellules dendritiques et NK présentaient un développement et une fonctionnalité normale suggérant un rôle non essentiel pour le TSLP dans le système hématopoïétique (292). En revanche, cette cytokine semble être impliquée dans l'expansion des lymphocytes T CD4.

4.1.6 IL-7 et glucose

En plus de ses propriétés anti-apoptotique et de prolifération cellulaire, l'IL-7 permet une régulation du métabolisme des lymphocytes T. En effet, dans des modèles de souris déficientes en IL-7, l'induction d'une forte expression de *Bcl-2* et d'une faible expression de *Bim* et *Bax* ne suffisait pas à compenser le déficit en IL-7, suggérant une autre fonction de la cytokine pour promouvoir la survie cellulaire (293–295). Au vu du lien entre la voie de la signalisation de l'IL-7 et celle de la glycolyse, l'hypothèse d'un rôle de l'IL-7 dans le métabolisme du glucose a alors été émise. En effet, STAT5, activé lors de la cascade phosphorylation induite par l'IL-7, est impliqué dans la glycolyse (296). De plus, les kinases Akt sont des régulateurs connus de l'assimilation du glucose et du métabolisme (297). Plusieurs études ont validé l'hypothèse d'un rôle de l'IL-7 dans l'assimilation du glucose, notamment dans la régulation de l'expression de GLUT1, transporteur du glucose, ainsi que dans l'entrée du glucose dans la cellules (298, 299). L'IL-7 augmente plus particulièrement l'assimilation du glucose par les lymphocytes T naïfs et les lymphocytes T activés (300). Le rôle de l'IL-7 dans le métabolisme des lymphocytes T est un argument supplémentaire pour le traitement par de l'IL-7 dans le sepsis, au vu des altérations bioénergétiques touchant les lymphocytes T des patients (249).

4.2 Forme soluble du récepteur de l'IL-7

4.2.1 Protéine et transcrits

Le gène *IL7R* se trouve sur le chromosome 5 avec une taille de 19,79 kb (301). Il existe différents transcrits correspondant à ce gène. Le transcrit *IL7R1* code pour la protéine membranaire. Il est composé de 8 exons. L'exon 6 a été montré comme codant pour la partie transmembranaire de la protéine. Il existe plusieurs transcrits *IL7R* ne comprenant pas l'exon 6 et codant potentiellement pour une forme soluble du récepteur. La protéine soluble CD127 a été identifiée pour la première fois en 1990 (302). Plus récemment, Rose *et al.* ont démontré que le transcrit *IL7R3*, composé des 8 exons à l'exception du 6^{ème}, codait pour une forme soluble du CD127 (11). La protéine associée au transcrit *IL7R3* contient le domaine extracellulaire et se termine par une queue de 26 AA suite à l'apparition d'un codon stop prématuré lors de l'épissage alternatif (**Figure 17**). La chaîne CD132 est également présente sous forme soluble dans le plasma mais à des concentrations moindre par rapport à la chaîne CD127, suggérant que le sCD127 est principalement présent sous forme dissociée du CD132 (11). Le sCD127 semble majoritairement issu du transcrit *IL7R3* mais elle provient aussi en partie d'un clivage du CD127 membranaire (11, 303). Des études *ex vivo* ont montré que la production de sCD127 était augmentée suite à une activation des lymphocytes T et également en présence de cytokines pro-inflammatoires (304, 305).

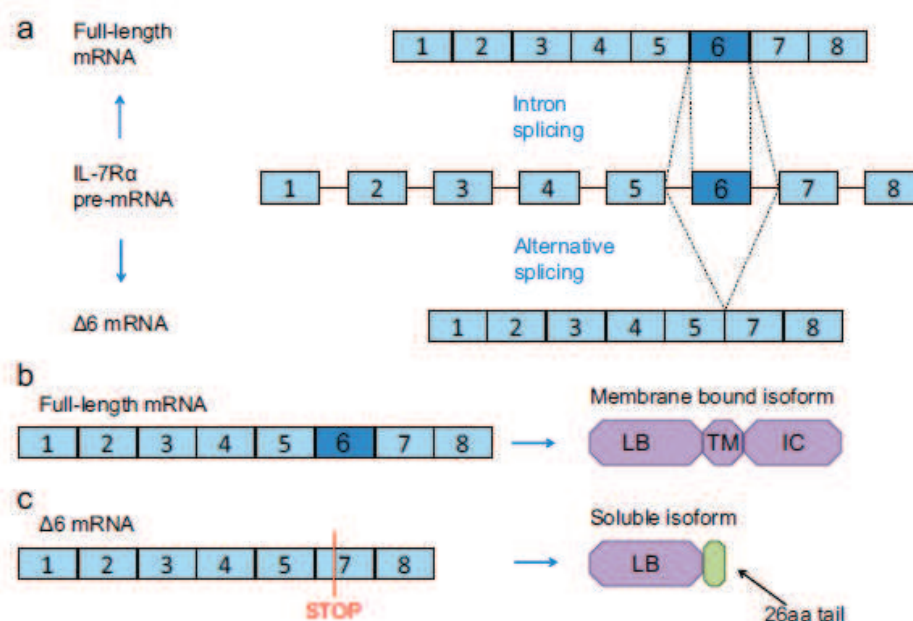


Figure 17: Epissage alternatif de l'ARNm de l'IL7R. (a) Deux variants sont produits par cet épissage alternatif. (b) Le variant IL7R1, composé des 8 exons, code pour la forme membranaire du CD127. (c) Le variant IL7R3, sans l'exon 6, code pour la forme soluble du CD127 (306).

4.2.2 Rôle de la protéine soluble sCD127

Plusieurs autres récepteurs de cytokines possèdent une forme soluble. Le rôle de celle-ci diffère en fonction du récepteur, pouvant être agoniste ou antagoniste. La forme soluble peut entrer en compétition avec le récepteur membranaire, c'est le cas par exemple du récepteur du TNF α . (307). A l'inverse, la forme soluble d'un récepteur peut également potentialiser l'effet de la cytokine. C'est le cas du récepteur soluble de l'IL-15 et de l'IL-2 (308, 309). Dans le cas de l'IL-7, il a été démontré que la cytokine pouvait se lier à la forme soluble du récepteur (305, 306). Cependant, le rôle du sCD127 n'est que partiellement compris. En effet, plusieurs études sur l'effet de l'interaction entre la forme soluble et l'IL-7 ont conduit à des résultats contradictoires. Une première étude a montré que le sCD127 inhibait la voie de signalisation de l'IL-7 *in vitro* suite à une stimulation par de l'IL-7 (310). Après une incubation de quinze minutes de lymphocytes T CD8 humains en présence d'IL-7 et de sCD127, la phosphorylation de STAT5 était inhibée. Suite à deux jours d'incubation, le sCD127 bloquait l'effet de l'IL-7 sur la surexpression de *BCL-2*. Enfin, la prolifération des lymphocytes T CD8 humains en présence d'IL-7 était inhibée lorsque la cytokine était pré-incubée avec du sCD127. Une autre étude a montré un effet similaire du sCD127 sur la phosphorylation de STAT5 et d'Akt et sur la baisse de prolifération des lymphocytes T CD4 (305). Cependant, ces deux études utilisaient des temps courts d'incubation. Ces résultats ont été contredits par la suite dans deux autres études. Lundström *et al.* ont testé l'effet du sCD127 sur l'IL-7 dans une lignée de cellules murines dépendante de l'IL-7 (306). Les cellules étaient

stimulées par de l'IL-7 en présence ou non de sCD127. La concentration d'IL-7 dans le surnageant de culture ainsi que la survie des cellules étaient significativement plus élevées cinq jours après la stimulation dans la condition où le sCD127 avait été ajouté par rapport à la condition IL-7 seul. Ces résultats ont ensuite été confirmés *in vivo* dans un modèle de souris IL-7 *-/-* et en partie confirmés sur des lymphocytes T humains. Les auteurs concluaient à un effet potentialisateur du sCD127 permettant une consommation sur la durée de l'IL-7 et donc des effets bénéfiques étendus dans le temps pour les cellules. Une autre étude a également montré une augmentation de la prolifération de lymphocytes T CD8 humains ainsi qu'une augmentation de leur production d'IFN γ grâce à la présence de sCD127 au bout de sept jours de culture (311). Ainsi, les résultats contradictoires obtenus dans ces différences d'études pourraient venir de la cinétique d'action du sCD127. Dans un premier temps, celui-ci semble retenir l'IL-7 et inhibe ainsi la voie de la signalisation de la cytokine. A plus long terme, il semble avoir un effet modérateur sur la consommation d'IL-7 permettant ainsi d'augmenter la bioactivité de la cytokine malgré sa présence en quantité limitée.

4.3 Régulation physiologique du récepteur de l'IL-7

4.3.1 Au cours de l'activation lymphocytaire T

L'expression du récepteur de l'IL-7 est rigoureusement régulée au cours de l'activation des lymphocytes T circulants (**Figure 18**). En effet, son expression est forte à la surface des lymphocytes T naïfs puis diminue suite à leur activation. *Ex vivo*, cette baisse survient environ six heures après stimulation du TCR et s'accroît au cours du temps. Elle ne semble pas venir d'une internalisation mais majoritairement d'une régulation transcriptionnelle. Cette baisse d'expression semble également associée à une augmentation de la présence de la forme soluble du récepteur de l'IL-7, suggérant un clivage à la membrane comme mécanisme possible de régulation (303, 305). L'activation du TCR entraîne donc une baisse d'expression du CD127 par clivage de la protéine et par régulation transcriptionnelle. Eviter une suractivation des lymphocytes T est l'hypothèse principale sur le rôle de ce mécanisme. L'expression du CD127 reste ensuite faible à la surface des lymphocytes T effecteurs. Une faible proportion des lymphocytes T effecteurs garde une forte expression du CD127 et ces cellules deviennent ainsi des lymphocytes T mémoires avec une longue durée de vie (312).

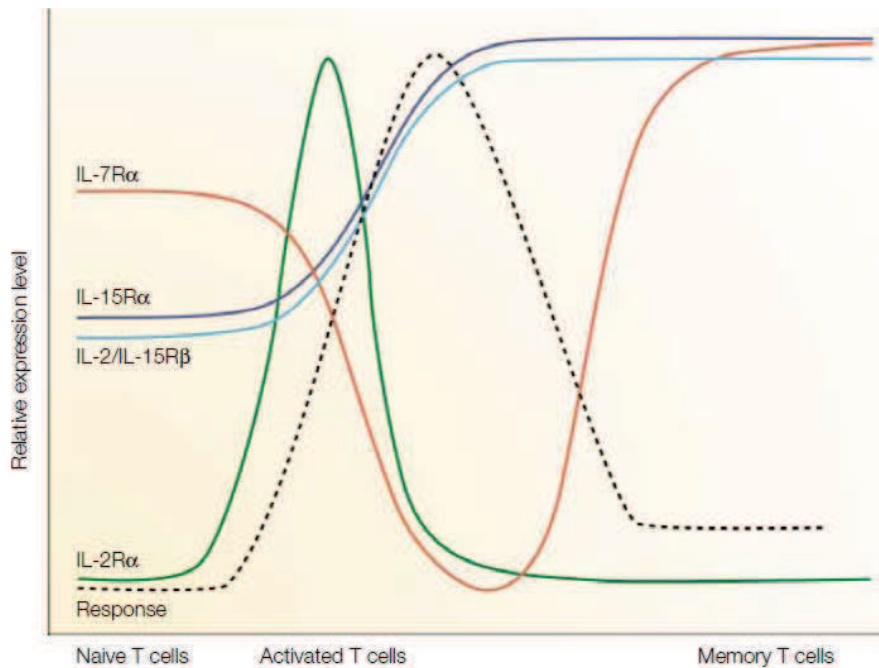


Figure 18 : Régulation de l'expression de différents récepteurs de cytokines à la surface des lymphocytes T lors de la réponse immunitaire (313).

4.3.2 Suite à la stimulation par de l'IL-7

L'IL-7 est produite de manière constitutive et en quantité limitée. Les lymphocytes T entrent donc en compétition pour y accéder. Pour que ce mode de consommation fonctionne, l'expression du récepteur de l'IL-7 à la surface des lymphocytes T est rigoureusement régulée (10). En effet, suite à la liaison de l'IL-7, l'expression de son récepteur est immédiatement diminuée. Ce mécanisme dit « altruiste » permet un arrêt de la consommation d'IL-7 par la cellule une fois que la voie de signalisation est activée. Deux mécanismes entrent en jeu pour induire la baisse d'expression du CD127 : l'internalisation et la régulation transcriptionnelle de la protéine. L'expression du CD127 est diminuée dès la première heure suivant l'interaction avec l'IL-7. Cette régulation rapide est due à l'internalisation de la protéine (314, 315). Ensuite, la baisse du transcrit IL7R1 codant pour la forme membranaire du récepteur de l'IL-7 entraîne une diminution de l'expression du CD127 à plus long terme (298, 316). En absence de stimulation IL-7, la demi-vie du CD127 est de 24 h (317). Une partie du récepteur est dégradée alors qu'une fraction est recyclée à la membrane. Lors de la stimulation par de l'IL-7, la demi-vie du récepteur est réduite à trois heures. Son recyclage est diminué alors que sa dégradation via les lysosomes et protéasomes est accélérée.

Récemment, un autre mécanisme a été mis en évidence pour permettre à l'IL-7 d'accéder au plus grand nombre de lymphocytes T malgré sa présence en quantité limitée. En effet, Bazdar *et al.* ont montré que l'IL-7 pouvait être recyclée et transmise d'une cellule à une autre après activation de la voie

de signalisation (318). L'internalisation du récepteur de l'IL-7 semble être au cœur de ce mécanisme : elle permettrait de recycler l'IL-7 à la surface de la cellule puis libérerait la cytokine la rendant ainsi disponible pour les lymphocytes T voisins.

A l'inverse de la régulation du CD127 induite par l'IL-7, l'expression de la seconde chaîne du récepteur, le CD132, est plutôt augmentée suite à une stimulation IL-7, suggérant une dissociation des mécanismes impliqués dans la régulation des deux chaînes du récepteur (319).

4.3.3 *Suite à la stimulation par d'autres cytokines*

L'expression du récepteur de l'IL-7 est également régulée par d'autres cytokines. Par exemple, l'IL-21 induit une diminution de l'expression du CD127 sur les lymphocytes T naïfs et sur les CD8 mémoires (320). Dans des lymphocytes T murins anti-tumoraux, l'IL-21 permet d'amplifier la prolifération et la survie des cellules induites par l'IL-7 (321). Cet effet de l'IL-21 semble être médié par un maintien de l'expression du CD127 après stimulation par de l'IL-7. L'IL-21 semble donc avoir un rôle dans l'amplification de la réponse des lymphocytes T activés via la régulation du récepteur de l'IL-7.

Plusieurs cytokines favorisant la survie des cellules entraînent une baisse de l'expression du CD127 à la surface des lymphocytes T et également une baisse du transcrite correspondant: l'IL-2, l'IL-4, l'IL-6 et l'IL-15 (316, 322). Ces cytokines induisent des signaux de survie ciblant les lymphocytes T. Ainsi, la baisse d'expression du récepteur de l'IL-7 induite par ces cytokines serait dans la lignée du mécanisme altruiste de consommation de l'IL-7. En effet, si les lymphocytes T reçoivent des signaux de survie par d'autres cytokines, l'IL-7 n'est alors plus nécessaire à leur survie et la baisse d'expression de son récepteur permet de laisser la cytokine disponible pour d'autres cellules.

A l'inverse, les cytokines pro-inflammatoires TNF α , IFN α et IFN β induisent une augmentation de l'expression du récepteur de l'IL-7 (10, 323, 324). Le rôle biologique de cette augmentation d'expression serait de bloquer l'apoptose induite suite à l'activation des lymphocytes T. Ainsi, les cytokines pro-inflammatoire induiraient des signaux de survie pour éviter une délétion des lymphocytes T lorsque ceux-ci sont nécessaires à l'élimination d'un pathogène. Étonnamment, les glucocorticoïdes, dont les effets sont immunosuppresseurs, ont le même impact sur l'expression du récepteur de l'IL-7 : ils induisent une augmentation de l'expression du transcrite et de la protéine (325–330). Ils atténuent notamment la réponse lymphocytaire T suite à une activation. Cependant, la fonction immunosuppressive des glucocorticoïdes semble complexe. Plutôt qu'une immunosuppression globale, ils orienteraient la différenciation des lymphocytes T CD4 naïfs vers un profil plutôt Th2 que Th1 (331, 332). Les glucocorticoïdes pourraient donc avoir un rôle dans la survie des lymphocytes T et influencer sur leur différenciation plutôt qu'un rôle inhibiteur suite à leur activation.

4.3.4 Régulation due au vieillissement

Le vieillissement est également un facteur influant sur l'expression du CD127. L'expression du CD127 est forte sur les lymphocytes T CD8 effecteurs mémoires. Les lymphocytes T mémoires ayant un phénotype CD45RA⁺ se divisent en deux sous-populations, l'une CD127^{low} et l'autre CD127^{high}. Chez les sujets âgés (de plus de 65 ans), la population de lymphocytes T CD8 mémoires CD45RA⁺ CD127^{low} est significativement plus importante que chez les sujets jeunes (de moins de 40 ans). Cette baisse d'expression du CD127 entraîne une réponse altérée à l'IL-7 (333). Une autre étude a mis en évidence une association entre l'expression du gène *IL7R* et l'âge : plus les individus sont âgés, plus l'expression du gène *IL7R* est faible (334). L'âge induit donc une baisse d'expression du récepteur de l'IL-7 et ainsi une réponse altérée des lymphocytes T à l'IL-7. Ce mécanisme participerait à l'immunosénescence touchant les lymphocytes T.

4.4 Régulation pathologique

L'expression des différentes formes du récepteur de l'IL-7 est altérée dans plusieurs pathologies impliquant le système immunitaire.

4.4.1 Autoimmunité et inflammation chronique

Diabète de type I

Chez les patients atteints de diabète de type I, l'expression du CD127 est diminuée à la surface des lymphocytes T CD4 en comparaison avec celle des volontaires sains (335). En revanche, les lymphocytes T CD8 ont un niveau d'expression similaire chez les patients et chez les volontaires sains. La concentration plasmatique du sCD127 est plus élevée chez les patients diabétiques que chez les volontaires sains (305).

Polyarthrite rhumatoïde

Dans le cas de la polyarthrite rhumatoïde, l'expression du CD127 est significativement plus élevée dans les fluides et tissus synoviaux sur plusieurs types cellulaires des patients en comparaison avec les volontaires sains: cellules endothéliales, monocytes/macrophages, fibroblastes et lymphocytes T CD4 (336, 337). De plus, les niveaux élevés d'expression du CD127 sont associés avec une plus forte activité de la maladie (338). La concentration en TNF α est également associée à la sévérité de la pathologie, en faisant ainsi une cible thérapeutique. Les anti-TNF α sont actuellement utilisés en clinique (339–341). Cependant, 25 à 30% des patients ne répondent pas au traitement. Une étude a démontré une association entre l'expression du transcrit *IL7R1*, codant pour le CD127 membranaire, et la réponse aux bloqueurs du TNF α : plus l'expression du récepteur est élevée moins le traitement est efficace (342).

L'expression du transcrite IL7R1 pourrait donc être utilisée comme biomarqueur pronostique de l'efficacité du traitement anti-TNF α . En plus des altérations de la forme membranaire du récepteur de l'IL-7, la forme soluble est également impactée par la maladie. La concentration plasmatique de sCD127 est plus élevée chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde que chez les volontaires sains (304). De plus, une concentration élevée de sCD127 est associée à une faible réponse au traitement anti-TNF α .

Sclérose en plaques

L'aspect de la régulation du récepteur de l'IL-7 le plus étudié dans la sclérose en plaques est le SNP rs6897932 impactant le gène *IL7R*, également retrouvé chez les patients diabétiques. Ce SNP C/T se localise dans l'exon 6 du gène et a un effet fonctionnel sur l'expression de celui-ci (343). En effet, ce SNP affecte la proportion d'isoformes soluble et membranaire de la protéine en influant sur un « silencer » d'épissage alternatif. Le SNP rs6897932 C entraîne ainsi une augmentation de l'épissage de l'exon 6 et donc une augmentation de la présence du transcrite IL7R3 codant pour la forme soluble par rapport au SNP rs6897932 T. La présence de ce SNP est corrélée avec une plus forte production de sCD127 (344, 345). De plus, elle est fortement associée avec le risque de développer une sclérose en plaque (346–348). Une étude a montré une synergie entre le SNP *IL7R* et un SNP *DDX39B* impactant l'épissage alternatif des transcrits *IL7R* (349) (**Figure 19**).

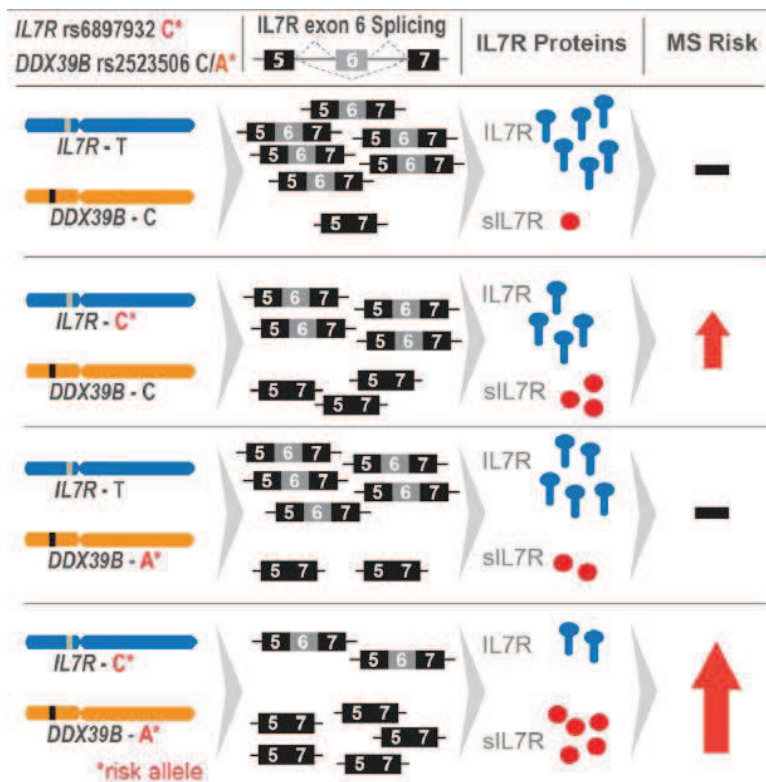


Figure 19: Association entre les SNP *IL7R* et *DDX39B* et le risque de développer une sclérose en plaque (349).

La présence concomitante des deux SNP entraîne un fort risque de développer une sclérose en plaque. Ainsi, une baisse de l'expression du CD127 membranaire et une augmentation du CD127 soluble semblent être liées au développement de l'auto-immunité via la présence du SNP.

4.4.2 Cancers

Oncohématologie

La voie de signalisation de l'IL-7 peut potentiellement participer au développement des cancers lymphoïdes étant donné son rôle central dans la survie et la prolifération des lymphocytes T. Les lymphocytes T dans les leucémies lymphoblastiques aiguës T et les lymphocytes B dans les leucémies lymphoblastiques chroniques B expriment le CD127. En stimulant *ex vivo* ces cellules cancéreuses, l'IL-7 permet de diminuer leur apoptose, d'augmenter leur prolifération et interfère également avec les traitements pro-apoptotiques anti-cancéreux. De plus, des mutations du gène *IL7R* agissent comme des oncogènes dans les leucémies lymphoblastiques aiguës B et T (350, 351).

Cancers solides

L'expression du récepteur de l'IL-7 a également été étudiée dans d'autres type de cancer. Vudattu *et al.* ont observé un pourcentage réduit de lymphocytes T circulants CD4 et CD8 exprimant le CD127 chez des patients atteints de cancer du sein en comparaison avec des volontaires sains (352). De plus, les lymphocytes T des patients cancéreux ne répondaient pas à une stimulation *ex vivo* par de l'IL-7 ni à une activation. En effet, la phosphorylation de STAT5 était absente dans les cellules des patients suite à une stimulation par de l'IL-7 et une production diminuée d'IL-2 et d'IFN γ était observée lors de l'activation des cellules, suggérant un statut épuisé des lymphocytes T. Chez les patients atteints de cancer de la prostate, les cellules cancéreuses présentent des niveaux plus élevées de CD127 par rapport à des cellules normales de la prostate (353). L'IL-7 induit une invasion et une migration de ces cellules cancéreuses alors que le blocage du récepteur de l'IL-7 les atténue. Dans une autre étude chez des patients atteints d'un cancer du sein, la surexpression du récepteur de l'IL-7 à la surface des cellules cancéreuses était associée avec la sévérité (354). Ces études montrent un double rôle de l'axe IL-7/IL-7R dans le cancer. D'un côté, une expression réduite du récepteur de l'IL-7 est associée avec un épuisement des lymphocytes T circulants qui ne sont alors plus efficaces pour lutter contre les cellules cancéreuses. D'un autre côté, une expression élevée du récepteur de l'IL-7 sur les cellules cancéreuses entraîne une augmentation de leur survie et de leur prolifération, favorisant leur expansion et leur dissémination.

4.4.3 Epuisement lymphocytaire

Virus de l'Immunodéficience Humaine

Un grand nombre d'études ont mis en évidence une expression altérée du récepteur de l'IL-7 chez les patients infectés par le VIH en comparaison avec des volontaires sains. Une diminution de l'expression du CD127 est observée à la fois à la surface des lymphocytes T CD4 et CD8 (355, 356). Cette baisse est également corrélée avec l'apoptose des lymphocytes T CD8 des patients et la progression de l'infection (357). Le pourcentage de cellules CD8⁺ CD127⁻ est fortement corrélé à la virémie et à la lymphopénie CD4 (358). En revanche, cette baisse d'expression est partiellement restaurée chez les patients répondant au traitement antirétroviral hautement efficace (HAART : « Highly Active Antiretroviral Therapy ») en parallèle avec un retour à la normale du nombre de lymphocytes T CD4 (355, 359).

La baisse d'expression du CD127 à la surface des lymphocytes T CD4 et CD8 chez les patients VIH est associée à une forte expression de PD-1 ainsi qu'à une faible fonctionnalité (259, 360, 361). Au vu de ces observations, l'expression du CD127 sur les lymphocytes T CD4 et CD8 est généralement considérée comme un marqueur d'immunité protectrice alors qu'une faible expression du CD127 est un marqueur d'un système immunitaire défaillant (10). Cette diminution de l'expression du CD127 à la surface des lymphocytes T de patients VIH semble en partie due à la protéine Tat. Cette protéine virale est sécrétée par les cellules infectées par le VIH. Elle est retrouvée dans le surnageant de culture de cellules infectées *in vitro* et également dans le sérum des patients (362, 363). Faller *et al.* ont montré dans une première étude que la mise en culture de lymphocytes T CD8 de volontaires sains avec la protéine Tat entraînait une diminution de l'expression du CD127 membranaire par rapport aux cellules en milieu seul (364). Lorsque la protéine est enlevée du milieu, l'expression du CD127 retrouve un niveau normal, mettant en évidence un effet réversible de la protéine Tat. De manière similaire, lorsque des lymphocytes T CD8 de patients VIH sont mis en culture, les cellules retrouvent également des niveaux normaux d'expression du CD127 dans les 24 h. Ces résultats suggèrent un rôle de la protéine Tat dans la régulation de l'expression du CD127 observée dans le VIH. La protéine Tat a un effet similaire sur les lymphocytes T CD4 (365). Dans une deuxième étude de Faller *et al.*, les auteurs ont mis en évidence la diminution du temps de demi-vie du CD127 de plus de trois fois en présence de la protéine Tat (366). Celle-ci entraîne l'internalisation du CD127 et sa dégradation directe par le protéasome. Chez les patients VIH, la protéine Tat participe ainsi à l'induction des altérations des lymphocytes T observées en diminuant l'expression du CD127 à leur surface.

L'expression du CD127 soluble est également altérée chez les patients VIH. La concentration plasmatique de sCD127 a été tout d'abord décrite de manière contradictoire. En effet, elle semblait

diminuée chez les patients VIH en comparaison avec les volontaires sains ou similaire dans certaines études (11, 367) alors que d'autres la trouvaient augmentée chez les patients (310, 368). Ces résultats contradictoires pourraient être liés au test de quantification utilisé. L'IL-7 étant présente en quantité plus importante dans le plasma des patients, celle-ci pourrait interférer dans la détection du sCD127 et masquer une augmentation de la concentration plasmatique de la protéine (310). En prenant en compte cet élément, il semblerait que l'augmentation de la concentration plasmatique de sCD127 chez les patients VIH soit une réalité.

Le SNP de l'IL7R rs6897932 semble également impliqué dans le VIH. En effet, les patients possédant deux allèles homozygotes T et étant traités par une thérapie antirétrovirale ont un rétablissement plus rapide de leur compte de lymphocytes T CD4 que les patients possédant deux allèles homozygotes C (369). Des expériences *ex vivo* ont mis en évidence une prolifération et une induction de la voie de signalisation plus élevée en réponse à l'IL-7 chez les lymphocytes T de patients VIH « TT » en comparaison avec les patients VIH « CC ». Dans les 48 premiers mois suivant le début du traitement, aucune différence n'était observée chez les patients VIH en fonction de leur génotype. Cependant, après les 48 premiers mois et tout au long du suivi, les patients VIH ayant un génotype TT au niveau du SNP rs6897932 avaient un meilleur rétablissement que ceux ayant un génotype CC (370). Cependant, le génotype TT a été montré comme associé à la mortalité chez les patients non traités (371). Ce résultat paradoxal montre un double effet de l'axe IL-7/IL-7R chez les patients VIH. Les patients « TT » ont une réponse amplifiée à l'IL-7 par rapport aux patients « CC » entraînant une expansion des lymphocytes T CD4 porteurs du virus en l'absence de traitement alors que lors d'un traitement, la restauration du compte de lymphocytes T CD4 est accélérée.

Autres infections virales chroniques

De manière similaire aux observations chez les patients VIH, les lymphocytes T de patients atteints d'autres infections chroniques ont un profil épuisé associé à une faible expression du CD127 à leur surface (372, 373). Les études sur l'expression du récepteur de l'IL-7 dans les infections chroniques se concentrent principalement sur les lymphocytes T CD8, bien que le phénomène d'épuisement ait aussi été décrit sur les lymphocytes T CD4 dans ce contexte (223, 374). McKinney *et al.* ont mis en évidence une signature moléculaire de l'épuisement lymphocytaire T CD8 dans un modèle de souris LCMV en comparant le profil des souris ayant une infection aiguë avec celui des souris ayant une infection chronique. Ainsi, l'expression du CD127 est diminuée dans les deux types d'infection mais de manière transitoire dans le cas de l'infection aiguë contre persistante dans le cas de l'infection chronique (222). En étudiant la fonctionnalité des lymphocytes T CD8 spécifiques des virus CMV, EBV et de la grippe en fonction de leur expression du CD127, il a été montré que les lymphocytes T CD8 CD127- proliféraient

peu et produisaient moins d'IL-2 par rapport aux lymphocytes T CD8 CD127+, mettant ainsi en évidence l'association entre faible expression du CD127 et altérations fonctionnelles (375). Lorsque l'infection virale devient chronique, l'augmentation des lymphocytes T ayant une faible expression du CD127 est ainsi liée à l'augmentation de l'épuisement lymphocytaire.

Plusieurs études ont fait le lien entre la baisse d'expression du CD127, l'augmentation de l'expression de PD-1 et l'épuisement des lymphocytes T CD8 chez les patients atteints d'infections chroniques. Dans une étude chez des patients atteints d'hépatite C chronique, les lymphocytes T CD8 spécifiques du virus présentaient une forte expression du récepteur co-inhibiteur PD-1 associée à une faible expression du CD127 et à une fonctionnalité altérée (376). Ce phénotype CD127^{low}PD-1^{high} a également été identifié dans les lymphocytes T infiltrant le foie de patients atteints d'hépatite C (377). Le pourcentage de lymphocytes T CD8 CD127^{low}PD-1^{high} est élevé chez les patients atteints d'une hépatite C que l'infection soit chronique ou aiguë. Cependant, de manière similaire aux observations dans les modèles de souris LCMV cités plus haut, les patients éliminant l'infection rapidement retrouvaient des niveaux normaux de lymphocytes T CD8 CD127^{low}PD-1^{high} alors que ceux ayant une infection chronique gardaient une proportion très importante de ces cellules allant jusqu'à 80 % des lymphocytes T CD8 spécifiques du virus (378). Ainsi, ce phénotype CD127^{low}PD-1^{high} est actuellement considéré comme caractéristique des lymphocytes T épuisés (379).

La forme soluble du récepteur de l'IL-7 n'a presque pas été étudiée dans les contextes d'infections chroniques hors VIH. Seule une étude a reporté l'absence de différence entre la concentration plasmatique de sCD127 chez les patients atteints d'hépatite C en comparaison avec des volontaires sains (379).

4.4.4 Sepsis

Boomer *et al.* ont observé une diminution de l'expression du CD127 à la surface des lymphocytes T CD8 et CD4 dans la rate de patients septiques prélevée entre 30 et 180 minutes après le décès en comparaison avec des patients en état de mort cérébrale ou ayant subi une splénectomie suite à un trauma (153). En revanche, aucune différence d'expression n'était observée à la surface de lymphocytes T circulants à J1 après le diagnostic de sepsis sévère (5). Dans une autre étude, Venet *et al.* retrouvent également cette absence de régulation d'expression du CD127 à J1 chez des patients en choc septique. En revanche, une diminution de l'expression du CD127 à la surface des lymphocytes T CD8 de patients était observée à J3 (8).

Au niveau de la forme soluble du récepteur de l'IL-7, Demaret *et al.* ont observé une augmentation de la concentration plasmatique de sCD127 à J1 et J3 après le diagnostic du choc septique en

comparaison avec des volontaires sains (12). De plus, la concentration de sCD127 était significativement plus élevée chez les patients non survivants que chez les patients survivants à J28.

L'expression du gène *IL7R* a été évaluée lors d'une étude transcriptomique visant à déterminer un ensemble de gènes caractéristiques du statut fonctionnel des lymphocytes de patients de réanimation comprenant des SRIS, des sepsis, des sepsis sévères et des patients en choc septique (380). La diminution de l'expression du gène *IL7R* était associée à la présence d'une infection chez ces patients. De plus, la diminution de l'expression d'une combinaison de gènes incluant *IL7R* était associée à la mortalité à J100.

Ainsi, quelques études ont partiellement évalué l'expression des formes du récepteur de l'IL-7 dans le sepsis. Cependant, aucune étude n'a mesuré l'expression des différentes formes en parallèle chez les patients septiques.

4.5 Les traitements ciblant la voie IL-7/IL-7R

4.5.1 Traitement par des agents bloquants le récepteur de l'IL-7

A partir d'un modèle murin, Calzascia *et al.* ont montré que la production physiologique d'IL-7 dans un contexte lymphopénique entraînait le développement de clones autoréactifs même en présence de lymphocytes Treg (381). L'une des hypothèses de ce mécanisme est la suivante : l'association IL-7 et lymphopénie pourrait entraîner une augmentation de la réponse immunitaire, jusqu'à une autoréactivité (382–384). Dans ce contexte, les bloquants du CD127 sont de potentiels traitements dans les pathologies auto-immunitaires et ont été testés dans des études précliniques. Dans un modèle de souris diabétiques, le blocage du CD127 permettait de prévenir l'apparition de la maladie et entraînait une rémission totale chez les souris l'ayant développée (385, 386). Dans des modèles murins d'arthrite, le blocage du CD127 permettait de diminuer l'inflammation et la destruction des tissus (338, 387). Les anticorps bloquants anti-CD127 représentent donc une thérapie potentielle dans le traitement de l'auto-immunité.

Ce type de traitement permettrait également de prévenir le développement de la réaction du greffon contre l'hôte, qui est l'une des comorbidités les plus importantes lors de la transplantation de cellules souches hématopoïétiques. Des modèles murins ont mis en évidence le rôle de l'IL-7 dans le développement de cette pathologie (388). Neutraliser l'IL-7 permet en revanche de prévenir son développement (389).

4.5.2 Traitement par de l'IL-7 recombinante

Les propriétés de l'IL-7 dans la survie et le maintien de l'homéostasie de la population de lymphocytes T en font une cible de choix comme traitement thérapeutique de pathologies où la fonctionnalité des lymphocytes T est altérée. Entre 2005 et 2011, une quinzaine d'essais cliniques ont été initiés dans différentes pathologies : VIH, transplantation de cellules souches, hépatite B, cancers ou encore lymphocytopenie idiopathique des lymphocytes T CD4 (275). En effet, le traitement par de l'IL-7 permet de rétablir la population de lymphocytes T circulants et d'augmenter la thymopoïèse dans des contextes d'altérations des lymphocytes T (390, 391). Il permet également d'augmenter la réponse des lymphocytes T spécifiques d'antigènes lors d'une vaccination, d'infections virales ou encore dans le cadre d'immunothérapie par transfert de cellules dans le cancer (392–394).

Dans certaines de ces pathologies, les patients sont lymphopéniques (395–397). Il a été démontré que la lymphopénie entraîne une diminution de la consommation d'IL-7 par les lymphocytes T et donc par conséquent une augmentation plasmatique de l'IL-7 chez les patients comme par exemple dans le VIH ou dans le sepsis (8, 398, 399). L'idée d'un traitement par de l'IL-7 paraît alors contre-intuitive. Cependant, la dose du traitement par de l'IL-7 est beaucoup plus importante que la quantité d'IL-7 accumulée en raison de la lymphopénie.

Cancer

Des études précliniques *ex vivo* et dans des modèles murins ont montré l'intérêt du traitement par de l'IL-7 dans le cancer (400). Dans un premier essai clinique de phase I où l'IL-7 était administrée pendant 14 jours à des patients ayant un cancer métastaté, le traitement induisait une augmentation dose dépendante du nombre de lymphocytes T CD4 et CD8 circulants à partir du troisième jour avec un pic au 21^{ème} jour suivant le début du traitement. L'effet du traitement persistait jusqu'à huit semaines (284). Dans un second essai clinique chez des patients ayant un mélanome ou un sarcome métastatique, l'IL-7 permettait également d'induire une augmentation du nombre de lymphocytes T circulants avec une diminution relative de la population de lymphocytes Treg (401). Cependant, aucune de ces deux études n'a montré d'effet anti-tumoral du traitement. Dans un essai clinique de phase II chez des patients ayant un cancer du sein, l'IL-7 a permis de rétablir le nombre de lymphocytes T CD4 mais aussi de diminuer les effets secondaires hématologiques de la chimiothérapie (402). L'efficacité de l'IL-7 en tant qu'immunoadjuvant chez des patients ayant des cancers métastasés ou des sarcomes récurrents a été évaluée. L'ajout d'IL-7 a permis d'augmenter significativement la réponse immunitaire et la survie des patients (403). Suite à ces essais prometteurs, d'autres essais cliniques sont actuellement en cours (NCT01265368, NCT02652910).

Virus de l'Immunodéficience Humaine

Dans le VIH, une première étude clinique a montré que le traitement par de l'IL-7 permettait d'augmenter le nombre de lymphocytes T CD4 et CD8 circulants (404). Dans une autre étude, la fonctionnalité des lymphocytes T de patients VIH a été évaluée *ex vivo* suite au traitement par de l'IL-7 (405). La production d'IL-2 et d'IFN γ était alors augmentée suite à une stimulation avec des antigènes CMV ou VIH. Cependant, la réplication du VIH était elle aussi augmentée. Dans un essai clinique récent, l'évolution de la charge virale a été étudiée en parallèle du nombre de lymphocytes T CD4 lors du traitement par de l'IL-7 (406). La thérapie IL-7 permettait d'augmenter le nombre de lymphocytes T CD4 mais la charge virale augmentait également dans les 28 jours. Ce phénomène est probablement dû à la prolifération des cellules infectées. Des résultats similaires ont été obtenus chez des patients VIH traités par une thérapie antivirale (407). L'ajout d'IL-7 entraînait la persistance du VIH en augmentant la production virale résiduelle et en induisant la prolifération de cellules infectées latentes. Ces données mettent en évidence les limites du traitement par de l'IL-7 dans le VIH.

Transplantation de cellules souches hématopoïétiques

L'IL-7 est également un traitement prometteur pour régénérer les lymphocytes T à la suite de la transplantation de cellules souches hématopoïétiques. En effet, lors de ce type de transplantation, la préparation au traitement et la réaction du greffon contre l'hôte peuvent sévèrement endommager l'épithélium du thymus et la thymopoïèse post-transplantation, entraînant un déficit du système immunitaire (408–410). Dans ce contexte, l'IL-7 peut permettre d'améliorer l'immunocompétence du patient en restaurant la population de lymphocytes T circulants dépendamment et indépendamment du thymus (411, 412). Ainsi, des études précliniques ont montré que l'injection d'IL-7 suite à une transplantation de cellules souches hématopoïétiques permettait le rétablissement du nombre de lymphocytes T dans le thymus et dans la circulation sanguine ainsi que la restauration de leur fonctionnalité en réponse à des antigènes (390, 413). Cependant, la capacité de l'IL-7 à augmenter la réactivité des lymphocytes T peut avoir des effets nocifs dans le contexte de la transplantation de cellules souches. Dans un modèle murin de greffe de moelle osseuse, le traitement par de l'IL-7 accentuait la réaction du greffon contre l'hôte (414). Dans un premier essai clinique de phase I chez des patients ayant subi une greffe de cellules hématopoïétiques, le traitement par de l'IL-7 a permis une augmentation du nombre de lymphocytes T circulants ainsi qu'une diversification du répertoire TCR β (415). D'autres essais cliniques sont actuellement en cours afin de développer l'utilisation adéquate du traitement par de l'IL-7 dans ce contexte clinique (416).

Sepsis

L'IL-7 est un potentiel traitement immunostimulant dans le contexte du sepsis. Son efficacité a été démontrée dans des modèles animaux de sepsis. Dans un modèle polymicrobien de souris septiques, le traitement par de l'IL-7 entraînait une diminution de l'apoptose lymphocytaire, une augmentation de la production d'IFN γ ainsi qu'une baisse de la mortalité (7). Dans un autre modèle de souris septiques reproduisant une infection nosocomiale, l'IL-7 permettait de restaurer la prolifération et la fonctionnalité des lymphocytes T de souris septiques et d'améliorer leur survie (264). Le traitement par de l'IL-7 *ex vivo* sur des cellules de patients septiques permet d'améliorer la prolifération et la production d'IFN γ des lymphocytes T ainsi que de diminuer leurs altérations métaboliques (8, 249). La restauration de la fonctionnalité des lymphocytes T dans ces différentes études précliniques indique que la voie de signalisation de l'IL-7 reste entièrement opérationnelle lors d'un sepsis. Cette hypothèse a été vérifiée par Demaret *et al.* Dans cette étude, suite à une stimulation *ex vivo* de lymphocytes T de patients septiques avec de l'IL-7, la phosphorylation de STAT-5 était observée et attestait ainsi de l'activation de la voie de signalisation de l'IL-7 (417). Ces études précliniques ont donné lieu à un essai clinique récemment terminé. Les patients en choc septique sévèrement lymphopéniques ont été sélectionnés. Le traitement par de l'IL-7 induisait une augmentation de trois à quatre fois du nombre de lymphocytes T CD4 et CD8 circulants et cette augmentation persistait plusieurs semaines après l'arrêt du traitement en l'absence d'effet indésirable grave (9).

5. Conclusion

Malgré les progrès dans la prise en charge des patients, le sepsis reste aujourd'hui la première cause de mortalité en réanimation. Une réponse dérégulée du système immunitaire chez les patients septiques suite à une infection conduit à des défaillances d'organes pouvant causer la mort. La persistance de ce phénomène résulte en des altérations du système immunitaire dont l'intensité et la durée sont associées à un risque augmenté de décès et d'infections secondaires. Une immunosuppression s'installe dès le début du sepsis chez les patients et impacte de nombreuses cellules du système immunitaire. En particulier, les lymphocytes T des patients septiques présentent des altérations phénotypiques et fonctionnelles caractéristiques d'un état d'épuisement. Pour restaurer ces altérations, l'IL-7 est actuellement proposée comme traitement immunostimulant. En effet, cette cytokine permet le maintien d'une population de lymphocytes T fonctionnels. Dans des essais précliniques, le traitement par de l'IL-7 a permis d'améliorer la survie dans des modèles murins de sepsis et d'augmenter *ex vivo* la prolifération et la production d'IFN γ de lymphocytes T de patients. De plus, les résultats du premier essai clinique de l'IL-7 dans le choc septique ont récemment montré son efficacité dans la restauration du nombre de lymphocytes T chez des patients atteints d'une lymphopénie sévère, sans effet indésirable grave. L'IL-7 agit via son récepteur exprimé principalement à la surface des lymphocytes T matures et dont la chaîne spécifique est le CD127. Il existe également une forme soluble sCD127 et différents transcrits ont été identifiés. Des études ont évalué l'expression de ces formes de manière individuelle mais aucune n'a mesuré l'ensemble des formes du récepteur de l'IL-7 en parallèle. De plus, l'expression de différents transcrits IL7R n'a jamais été étudiée chez les patients septiques. La régulation de ce récepteur ne reste donc que partiellement comprise dans le contexte du sepsis. De plus, le phénotype CD127^{low}PD-1^{high} est proposé comme marqueur d'épuisement des lymphocytes T dans d'autres contextes cliniques comme le cancer ou les infections chroniques. Ce phénotype n'a cependant jamais été étudié dans le sepsis alors que les lymphocytes T de patients présentent les caractéristiques d'un état épuisé.

Résultats

1. Présentation du projet de thèse

Le sepsis est la première cause de mortalité en réanimation. Les lymphocytes T de patients septiques présentent les caractéristiques d'un état d'épuisement avec l'expression de récepteurs co-inhibiteurs en parallèle d'une prolifération et d'une fonctionnalité altérées. De plus, ces altérations sont associées à la mortalité. L'IL-7 est actuellement proposée comme immunostimulant pour améliorer la réponse des lymphocytes T des patients. Un premier essai clinique de phase II a récemment montré l'efficacité du traitement par de l'IL-7 à rétablir le nombre de lymphocytes T chez les patients en choc septique ayant une lymphopénie sévère et ce sans effet indésirable grave. L'IL-7 agit via sa liaison avec son récepteur membranaire, le CD127. Il existe également une forme soluble du CD127 et différents transcrits. De plus, le phénotype CD127^{low}PD-1^{high} est proposé comme marqueur d'épuisement dans d'autres contextes pathologiques que le sepsis. Notre travail vise à étudier l'expression des différentes formes du récepteur de l'IL-7 comme biomarqueur dans le sepsis et de mieux comprendre leur régulation, d'évaluer le phénotype CD127^{low}PD-1^{high} chez les patients en parallèle avec les altérations des lymphocytes T et enfin de développer un modèle reproduisant les altérations des lymphocytes T observées chez les patients en choc septique.

Les cinq articles relatifs à la réalisation de ce projet portent sur :

- L'évaluation de la concentration plasmatique de CD127 soluble comme marqueur pronostique du décès de patients de réanimation
- L'évaluation de l'expression de différents transcrits IL7R comme marqueurs pronostiques du décès de patients en choc septique
- L'étude de la régulation de la forme soluble du récepteur de l'IL-7 au niveau protéine et transcrits chez les patients en choc septique
- L'étude du phénotype CD127^{low}PD-1^{high} en lien avec les altérations des lymphocytes T des patients en choc septique et le développement d'un modèle *ex vivo* reproduisant ces altérations
- La mise au point d'une technique permettant la mesure de l'ATP dans les lymphocytes T de patients lymphopéniques

2. Elevated soluble IL-7 receptor concentration in non-survivor ICU patients

Contexte

Une précédente étude du laboratoire a mis en évidence une association entre la concentration plasmatique de sCD127 soluble chez des patients en choc septique et la mortalité. Le but de l'étude suivante est de confirmer ce résultat sur une cohorte plus importante de patients de réanimation.

Description de l'étude

La concentration plasmatique de sCD127 a été mesurée grâce à un ELISA standardisé et robuste dans une cohorte de 734 patients de réanimation, incluant des patients en choc septique ainsi que des patients polytraumatisés et brûlés. Les échantillons ont été collectés à J1, J3 et J6 après l'admission en réanimation. Soixante-dix-sept volontaires sains ont été utilisés comme contrôle. La concentration plasmatique de sCD127 était significativement plus faible chez les patients que chez les volontaires sains quel que soit le jour du prélèvement. Une association significative était observée au sein des patients entre la concentration plasmatique élevée de sCD127 à J1 et la mortalité à J28.

Conclusion

Cette étude confirme l'association entre la concentration plasmatique de sCD127 et la mortalité chez les patients septiques et plus globalement chez les patients de réanimation. La mesure de cette concentration pourrait donc être un outil d'identification des patients pouvant bénéficier d'une thérapie immunostimulante comme l'IL-7.

Ce travail a été publié dans Intensive Care Medicine en 2016.

LETTER



Elevated soluble IL-7 receptor concentration in non-survivor ICU patients

Estelle Peronnet^{1*} , Julie Mouillaux¹, Guillaume Monneret^{1,2}, Emmanuelle Gallet-Gorius¹, Sophie Blein-Henry¹, Alain Lepape³, Julien Textoris¹, Fabienne Venet^{1,2} and the MIP Réa Study Group

© 2016 Springer-Verlag Berlin Heidelberg and ESICM

Dear Editor,

Patients admitted to intensive care units (ICU) are prone to immunosuppression, the intensity and duration of which are associated with deleterious outcomes [1]. Currently, therapy such as IL-7 is being tested (NCT02640807) with the intention of restoring immune functions. In this context, and to follow up on a previous study in septic shock patients published in *Intensive Care Medicine* [2], we further investigated the prognostic value of the soluble form of IL-7 receptor alpha chain (or sCD127) in ICU patients. We confirmed and extended our previous results to ICU patients with systemic inflammatory response syndrome, presenting with various severity levels.

To this end, we measured sCD127 plasmatic concentration with a standardized and robust ELISA assay (Method 1 in the electronic supplementary material), in a cohort of 734 ICU patients [3]. This study was approved by our ethical institutional review board (IRB#5044). Clinical data are described in Tables 1 and 2 of the electronic supplementary material. EDTA plasma samples were collected at days 1, 3, and 6 after ICU admission. Sixty-seven healthy volunteers were used as controls.

Importantly, as previously observed in septic shock patients [2], the concentration of plasmatic sCD127 was lower in ICU patients compared to healthy volunteers (Fig. 1a). Interestingly, we observed significantly higher sCD127 concentration in non-survivor ICU patients compared to survivors (Fig. 1b), similarly to our study in

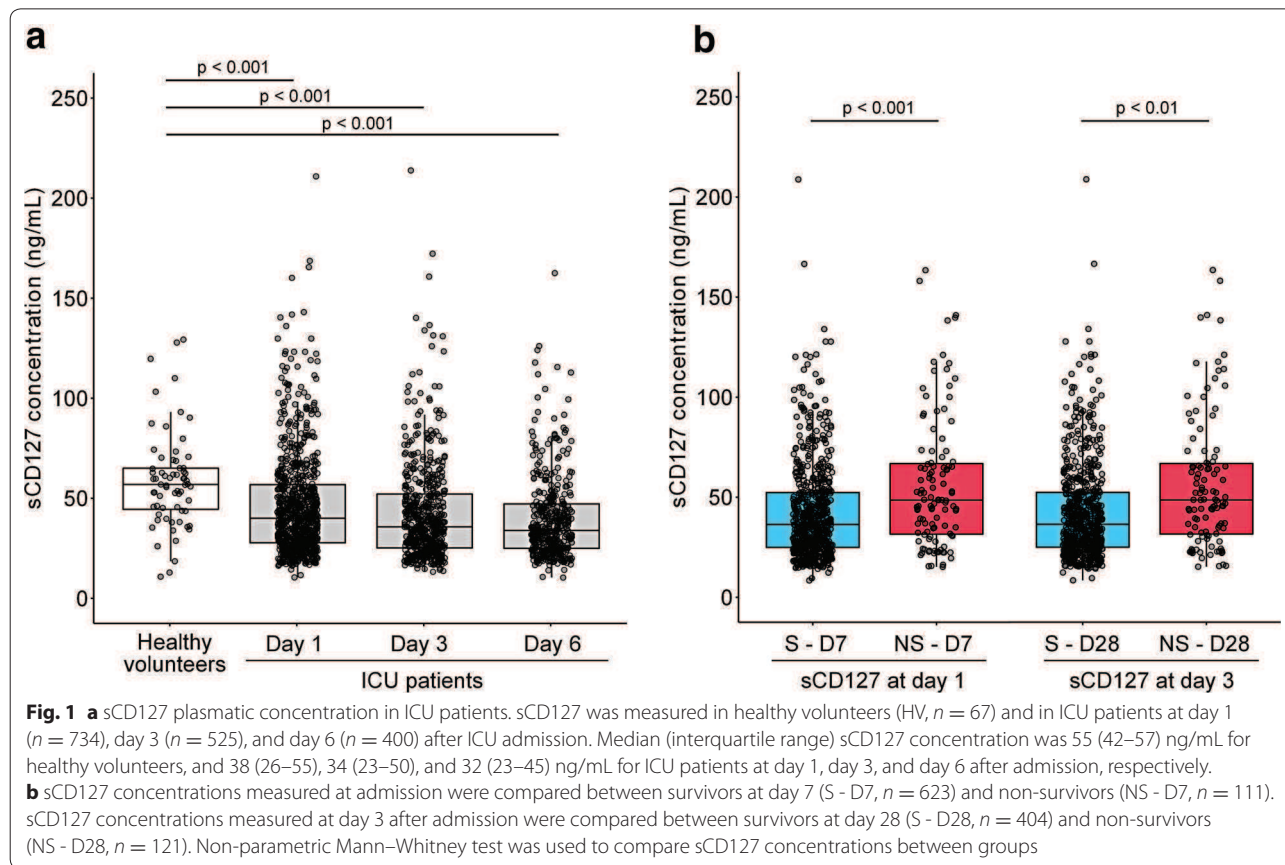
septic shock patients [2]. Moreover, a significant association was observed between high sCD127 plasmatic levels at day 1 and mortality at day 7 [Cox model HR 1.01 (1.01–1.02), $p < 0.001$]. The association was also significant between sCD127 levels at day 3 and mortality at day 28 [Cox model HR 1.01 (1.01–1.02), $p < 0.001$].

As sCD127 is mainly expressed by T cells [4], we wondered whether sCD127 concentration may be correlated with circulating T cell number and therefore whether decreased sCD127 level in ICU patients may reflect ICU-induced lymphopenia. However, as we did not observe any correlation between sCD127 concentration in ICU patients and lymphocyte count (Spearman correlation $r = -0.14$ at day 1), this suggests that sCD127 concentration regulation in patients is more complex than a simple shedding from T lymphocytes. This is all the more since non-survivor ICU patients exhibit higher sCD127 concentration than survivors, despite a lower lymphocyte count.

Overall, the present study confirms the association between increased sCD127 concentration and mortality in a large cohort of mixed ICU patients. These results suggest that sCD127 measurement could help identify the most severe patients, who may benefit from immunostimulating therapies such as IL-7. In addition, mechanisms of sCD127 concentration regulation in ICU patients appear to be complex and deserve further investigation, especially since sCD127 has been shown to be able to bind to its ligand and therefore might modify response to IL-7 treatment. It is thus of the utmost importance to further explore and understand CD127 expression regulation in critical conditions, as well as its

*Correspondence: estelle.peronnet@biomerieux.com

¹ EA 7426 Hospices Civils de Lyon-bioMérieux-UCBL1 "Pathophysiology of Injury Induced Immunosuppression", Joint Research Unit, Groupement Hospitalier Edouard Herriot, 5 Place d'Arsonval, 69003 Lyon, France
Full author information is available at the end of the article



role in response to IL-7 administration. This would likely improve any treatment based on recombinant human IL-7 in immunocompromised ICU patients.

Electronic supplementary material

The online version of this article (doi:10.1007/s00134-016-4445-x) contains supplementary material, which is available to authorized users.

Author details

¹ EA 7426 Hospices Civils de Lyon-bioMérieux-UCBL1 "Pathophysiology of Injury Induced Immunosuppression", Joint Research Unit, Groupement Hospitalier Edouard Herriot, 5 Place d'Arsonval, 69003 Lyon, France. ² Hospices Civils de Lyon, Immunology Laboratory, Groupement Hospitalier Edouard Herriot, 5 Place d'Arsonval, 69003 Lyon, France. ³ Hospices Civils de Lyon, Intensive Care Unit, Centre Hospitalier Lyon Sud, 165 chemin du Grand Revoyet, 69495 Pierre-Bénite Cedex, France.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the MIP-Réa study group for their participation in the MIP-Réa clinical study. The authors also would like to thank Héléne Vallin, Nathalie Panel, Marion Provent, and Sylvie De La Salle for their great help in patients' inclusion and Anne Portier for the clinical samples management. The authors thank Caroline Le Gall from Methodomics for statistical analysis. Funding was provided by the authors' institutions (Hospices Civils de Lyon and bioMérieux) and was part of ADNA (Advanced Diagnostic for New Therapeutic Approaches), a program dedicated to personalized medicine, coordinated by Institut Mérieux and supported by the French public agency BPI France.

Compliance with ethical standards

Conflicts of interest

All authors work in a joint research unit, co-funded by the Hospices Civils de Lyon and bioMérieux. FV, GM, and AL are co-inventors in two patents families covering soluble CD127 biomarkers. This does not alter the authors' adherence to all the Intensive Care Medicine policies on sharing data and materials.

Accepted: 4 July 2016

Published online: 9 July 2016

References

- Landelle C, Lepape A, Voirin N et al (2010) Low monocyte human leukocyte antigen-DR is independently associated with nosocomial infections after septic shock. *Intensive Care Med* 36:1859–1866
- Demaret J, Villars-Méchin A, Lepape A et al (2014) Elevated plasmatic level of soluble IL-7 receptor is associated with increased mortality in septic shock patients. *Intensive Care Med* 40:1089–1096
- Friggeri A, Cazalis M-A, Pachot A et al (2016) Decreased CX3CR1 messenger RNA expression is an independent molecular biomarker of early and late mortality in critically ill patients. *Crit Care* 20:204
- Mazzucchelli R, Durum SK (2007) Interleukin-7 receptor expression: intelligent design. *Nat Rev Immunol* 7:144–154

Elevated soluble IL-7 receptor concentration in non-survivor ICU patients

Estelle Peronnet, Julie Mouillaux, Guillaume Monneret, Emmanuelle Gallet-Gorius, Sophie Blein-Henry, Alain Lepape, Julien Textoris, Fabienne Venet for the MIP Réa study group

Supplementary material

Table 1 Patients clinical characteristics in regard with status at day 7

Variable	Total (n=734)	Survivors at day 7 (n=623)	Non Survivors at day 7 (n=111)	P value	
Characteristics on admission					
Gender, male	457 (62%)	396 (64%)	61 (55%)	0.106	
Age	65 [53-76]	64 [52-75]	71 [62-79]	<0.001	
SAPS II	56 [42-69]	53 [40-65]	80 [65-97]	<0.001	
SOFA score	9 [6-12]	8 [6-11]	13 [10-15]	<0.001	
Charlson score	2 [0-3]	2 [0-3]	2 [0-4]	0.226	
Patients by Charlson score categories				0.589	
	0	222 (30%)	193 (31%)	29 (26%)	
	1	139 (19%)	117 (19%)	22 (20%)	
	≥2	373 (51%)	313 (50%)	60 (54%)	
Mac Cabe score				<0.001	
	<i>Non fatal</i>	433 (59%)	380 (61%)	53 (48%)	
	<i>Ultimately fatal</i>	229 (31%)	194 (31%)	35 (31%)	
	<i>Rapidly fatal</i>	72 (9.8%)	49 (7.9%)	23 (21%)	
Type of admission				0.265	
	<i>Medical</i>	507 (69%)	425 (68%)	82 (74%)	
	<i>Elective surgery</i>	33 (4.5%)	31 (5%)	2 (1.8%)	
	<i>Emergency surgery</i>	194 (26%)	167 (27%)	27 (24%)	
Trauma		68 (9.3%)	64 (10%)	4 (3.6%)	0.040
Shock		499 (68%)	405 (65%)	94 (85%)	<0.001
Sepsis		506 (69%)	439 (70%)	67 (60%)	0.045
Outcomes					
ICU length of stay, Days	6 [3-13]	8 [4-14]	2 [1-3]	<0.001	
Hospital length of stay, Days	24 [12-43]	28 [18-46]	3 [2-7]	<0.001	
Biological parameters (day 1)					
Lactic acid, mmol/L (n=700)	2.2 [1.4-3.7]	2 [1.3-3.2]	4.7 [2.4-8.9]	<0.001	
Lymphocytes, 10 ⁹ /L (n=578)	0.84 [0.50-1.34]	0.84 [0.50-1.34]	0.80 [0.49-1.35]	0.555	
Platelets, 10 ³ /mm ³ (n=731)	166 [106-232]	173 [114-237]	125 [71-189]	<0.001	
Diuresis, mL/d	1387 [700-2250]	1500 [872-2400]	400 [100-1387]	<0.001	

Categorical variables are expressed as N (%) and continuous variables as median [interquartile range]. Comparisons between survivor and non-survivor patients at day 7 were performed with Chi² test for qualitative variables and Mann-Whitney test for quantitative variables.

SAPS II: simplified acute physiology score II, SOFA: sequential organ failure assessment

Table 2 Patients clinical characteristics in regard with status at day 28

Variable	Total (n= 525)	Survivors at day 28 (n=404)	Non survivors at day 28 (n=121)	P value	
Characteristics on admission					
Gender, male	341 (65%)	254 (63%)	87 (72%)	0.086	
Age	65 [53-75]	63 [51-74]	73 [62-81]	<0.001	
SAPS II	55 [42-68]	52 [40-64]	65 [53-74]	<0.001	
SOFA score	9 [6-11]	8 [6-11]	10 [8-13]	<0.001	
Delta SOFA (day 1 – day 3)	1 [0-4]	2 [0-4]	1 [-1-3]	<0.001	
Charlson score	2 [0-3]	1 [0-3]	2 [1-4]	<0.001	
Patients by Charlson score categories				<0.001	
	0	153 (29%)	136 (34%)	17 (14%)	
	1	105 (20%)	85 (21%)	20 (16%)	
	≥2	267 (51%)	183 (45%)	84 (69%)	
Mac Cabe score				<0.001	
	<i>Non fatal</i>	311 (59%)	261 (65%)	50 (41%)	
	<i>Ultimately fatal</i>	163 (31%)	113 (28%)	50 (41%)	
	<i>Rapidly fatal</i>	51 (9.7%)	30 (7.4%)	21 (18%)	
Type of admission				0.497	
	<i>Medical</i>	365 (69%)	277 (69%)	88 (73%)	
	<i>Elective surgery</i>	22 (4.2%)	16 (4%)	6 (5%)	
	<i>Emergency surgery</i>	138 (26%)	111 (27%)	27 (22%)	
Trauma	59 (11%)	55 (14%)	4 (3.3%)	0.003	
Shock	351 (67%)	265 (66%)	86 (71%)	0.311	
Sepsis	368 (70%)	282 (70%)	86 (71%)	0.877	
Outcomes					
ICU length of stay, Days	8 [5-15]	8 [4-14]	9 [5-15]	0.246	
Hospital length of stay, Days	27 [17-46]	33 [20-52]	15 [9-24]	<0.001	
Biological parameters (day 1)					
Lactic acid, mmol/L (n=499)	2.0 [1.3-3.2]	1.95 [1.3-3.0]	2.4 [1.5-4.2]	0.003	
Lymphocytes, 10 ⁹ /L (n=411)	0.82 [0.50-1.30]	0.88 [0.50-1.33]	0.72 [0.46-1.26]	0.074	
Platelets, 10 ³ /mm ³ (n=523)	167 [108-234]	171 [114-234]	157 [90-234]	0.175	
Diurese, mL/d	1400 [800-2300]	1500 [900-2400]	1100 [450-1900]	<0.001	
Biological parameters (day 3)					
Lactic acid, mmol/L (n=384)	1.4 [1.1-2.0]	1.3 [1.1-1.8]	1.8 [1.4-2.52]	<0.001	
Lymphocytes, 10 ⁹ /L (n=418)	0.88 [0.60-1.20]	0.90 [0.64-1.22]	0.77 [0.50-1.10]	0.005	
Platelets, 10 ³ /mm ³ (n=514)	153 [96-215]	156 [101-224]	138 [69-191]	0.003	
Diurese, mL/d (n=523)	1700 [1000-2500]	1800 [1200-2700]	1300 [410-2100]	<0.001	

Categorical variables are expressed as N (%) and continuous variables as median [interquartile range]. Comparisons between survivor and non-survivor patients at day 28 were performed with Chi² test for qualitative variables and Mann-Whitney test for quantitative variables.

SAPS II: simplified acute physiology score II, SOFA: sequential organ failure assessment

Method 1 ELISA protocol for sCD127 measurement in EDTA plasma

Capture monoclonal antibody R34.34 (Beckman Coulter, Villepinte, France) was diluted at 8 µg/mL in carbonate buffer (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) and coated over night at 4°C in a 96-well microplate. Wells were washed three times with TBS-Tween 0.05% (TBS-T, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), saturated for 1 h at room temperature with TBS-T containing 10% of goat serum (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) and washed. EDTA plasma samples or standard protein diluted in TBS (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) containing 5% of goat serum were incubated for 2 h at 37°C. Recombinant human CD127 Fc chimera protein (R&D Systems, Bio-Techne, Lille, France) was used as standard protein for sCD127 quantification. Plasma samples were diluted 1/8 or 1/16. After three washes in TBS-T, bound sCD127 was detected with biotinylated goat polyclonal antibody BAF306 (R&D Systems, Bio-Techne, Lille, France) diluted at 0.2 µg/mL in TBS containing 5% of goat serum and incubated for 2 h at 37°C. After three washes, streptavidin-horseradish peroxidase (Jackson ImmunoResearch, Newmarket, UK) diluted 1/50,000 in TBS containing 5% goat serum was incubated for 20 min at room temperature, before a wash step. TMB substrate (Pierce, Thermo Fisher Scientific, Wilmslow, UK) was then added and reaction was stopped after 15 min using H₂SO₄ 2 M. Absorbance was read at 450 nm on a spectrophotometer.

Limit of detection of our ELISA was 0.9 ng/mL. Repeatability and reproducibility CV were below 10% and 15%, respectively.

3. Low IL-7 receptor mRNA expression is independently associated with day 28 mortality in septic shock patients

Contexte

L'utilisation de biomarqueurs chez les patients septiques pourrait améliorer leur stratification pour bénéficier de thérapies immunostimulantes comme l'IL-7. La régulation transcriptionnelle du récepteur de l'IL-7 n'a jamais été étudiée dans le sepsis. Ainsi, cette étude a pour but d'évaluer l'expression des différents transcrits du récepteur de l'IL-7 après un choc septique et leur association avec la mortalité.

Description de l'étude

Les transcrits du récepteur de l'IL-7 ont été mesurés dans une première cohorte de 30 patients en choc septique puis dans une cohorte de validation de 177 patients. Dans la première cohorte, l'expression de tous les transcrits étudiés était diminuée à J3 après le diagnostic du choc septique en comparaison avec des volontaires sains. L'expression des transcrits à J3 était associée avec la mortalité à J28. Les patients ayant un plus grand risque de mortalité présentaient une expression des transcrits plus faible. Ces résultats ont ensuite été confirmés dans la cohorte de validation. En utilisant un seuil déterminé dans la première cohorte, l'expression du transcrit codant pour la forme membranaire du récepteur permettait de prédire la mortalité à J28.

Conclusion

Les transcrits du récepteur de l'IL-7 semblent être des biomarqueurs des altérations de la réponse immunitaire adaptative des patients en choc septique. La mesure de leurs expressions pourrait permettre de stratifier les patients pouvant bénéficier de thérapies immunostimulantes.

Ce travail a été accepté dans le journal Critical Care Medicine .

**Low IL-7 receptor mRNA expression is independently associated with day 28 mortality in
septic shock patients**

Benjamin Delwarde, MD^{1,2,3*}; Estelle Peronnet, PhD^{1,2*}; Fabienne Venet, PharmD, PhD^{1,2,4};
Elisabeth Cerrato^{1,2}; Boris Meunier^{1,2}; Julie Mouillaux^{1,2}; Alain Lepape, MD^{2,5}, Alexandre Pachot,
PharmD, PhD^{1,2}; Thomas Rimmelé, MD, PhD^{1,2,3}; Guillaume Monneret, PharmD, PhD^{1,2,4}; Julien
Textoris, MD, PhD^{1,2,3}; on behalf of the MIP Réa study group

¹ EA7426 “Pathophysiology of injury-induced immunosuppression (PI3)”, Université Claude Bernard
Lyon 1 - Hospices Civils de Lyon - bioMérieux, Lyon, France

² Hospices Civils de Lyon – bioMérieux - Université Claude Bernard Lyon 1 Joint Research Unit, Hôpital
Edouard Herriot, Lyon, France

³ Anaesthesiology and Intensive Care Medicine Department, Hospices Civils de Lyon, Hôpital Edouard
Herriot, Lyon, France

⁴ Immunology Laboratory, Hospices Civils de Lyon, Hôpital Edouard Herriot, Lyon, France

⁵ Intensive Care Unit, Hospices Civils de Lyon, Centre Hospitalier Lyon Sud, Pierre Bénite, France.

*These authors contributed equally to this work

Corresponding author

Estelle Peronnet

Address: Hospices Civils de Lyon – bioMérieux - Université Claude Bernard Lyon 1 Joint Research Unit,
Hôpital Edouard Herriot, 5 Place d’Arsonval, 69003, Lyon, France

Email: estelle.peronnet@biomerieux.com

Phone: +33 4 78 87 53 04

Fax: +33 4 72 11 95 47

The experimental work was performed at the Hospices Civils de Lyon – bioMérieux - Université Claude Bernard Lyon 1 Joint Research Unit, Lyon, France.

Conflicts of Interest and Source of Funding

All authors work in a Joint Research Unit co-funded by the Hospices Civils de Lyon, bioMérieux and Université Claude Bernard Lyon 1. BD, FV, BM, AL, TR and GM are employees of Hospices Civils de Lyon. EP, EC, JM, AP and JT are employees of bioMérieux. This study was part of ADNA (Advanced Diagnostic for New Therapeutic Approaches), a program dedicated to personalized medicine, coordinated by Institut Mérieux and supported by French public agency BPI France. BD, FV, GM, EP, EC, JT and AL are co-inventors on three patent families covering IL-7 receptor biomarkers. This does not alter the authors' adherence to all *Critical Care Medicine* policies on sharing data and materials.

Keywords

Biomarkers; Gene Expression; Intensive Care Units; Interleukin-7 Receptor; Septic Shock

Word count: 3000

Abstract

Objective: Septic shock is the primary cause of death in Intensive Care Units (ICU). A better comprehension of its pathophysiology, in particular the immune alteration mechanisms, opened new therapeutic perspectives such as the recombinant IL-7. The use of biomarkers could improve the identification of eligible patients for this therapy. The soluble form of the IL-7 receptor (IL-7R) appears as a promising candidate in this regard since an association between its high plasmatic level and mortality in critically ill patients has been demonstrated. As there are no data available on the transcriptional regulation of the IL-7 receptor gene (IL7R) in such patients, this study aimed to explore the expression level of different IL7R transcripts after septic shock and evaluate their association with mortality.

Design: Retrospective discovery cohort (30 patients) and validation cohort (177 patients)

Setting: Two French ICU (discovery study) and six French ICU (validation study)

Patients: Adult septic shock patients

Interventions: None

Measurements and Main Results: The quantification of several IL7R transcripts using specific RT-qPCR designs allowed for global evaluation of IL7R expression in whole blood. In the discovery cohort, all IL7R transcripts studied were expressed at lower levels in septic shock patients than in healthy volunteers. IL7R expression at day 3 after septic shock diagnosis was associated with day 28 mortality. Patients at a lower risk of death showed higher expression levels. These results were confirmed in the independent validation cohort. Interestingly, using a threshold obtained on the discovery cohort, we observed in the validation cohort a high negative predictive value for day 28 mortality for the transcript encoding the membrane form of IL-7R (0.86, 95% confidence interval 0.79-0.93).

Conclusions: IL7R transcripts appear as biomarkers of impaired adaptive immune response in septic shock patients and as a promising tool for patient stratification in clinical trials evaluating immunoadjuvant therapies.

Introduction

Septic shock remains the primary cause of death in Intensive Care Units (ICU) despite better understanding of the underlying pathophysiological mechanisms and improved patient management. A recent study (1) using the new Sepsis-3 definitions (2) presented an ICU mortality rate for septic shock patients of 44%.

A disproportionate inflammatory response exceeding the concomitant anti-inflammatory response is observed in the early phase of septic shock, which is usually resolved within 72h. This phase may be followed by prolonged immunosuppression which accounts for over two-thirds of deaths (3). Several studies reported impaired innate and adaptive immune responses following septic shock (4). Massive apoptosis of T cells leads to important lymphopenia (5). Also, the functionality of T lymphocytes (i.e. their proliferation and cytokine production capacity) is decreased (6).

Immunomodulating therapies have emerged as innovative and effective approaches to control dysregulated immune response following septic shock in view of either blocking an exaggerated response or boosting an altered one. It therefore appears crucial to efficiently and accurately determine the immune status of patients to provide the most effective treatment. There is however no specific clinical sign of impaired immune response. *Ex vivo* functional assays such as cytokine production or cell proliferation, although gold standards in the field, are not easily adaptable to clinical routine (7). There is now a great interest in easily measurable biomarkers to guide patient treatment.

Among the proposed immune-adjuvant treatments, the recombinant human interleukin 7 (rhIL-7) evaluated in HIV (8) or cancer (9) has already shown promising preclinical results in sepsis. The *ex vivo* use of rhIL-7 improved lymphocyte function following sepsis (6) and an *in vivo* treatment increased survival in a peritonitis mouse model (10).

The IL-7 signal is transduced *via* the IL-7 receptor (IL-7R), composed of the common γ_c and the IL-7 specific α (CD127) chains (11). As shown for other cytokine receptors, IL-7R can be found as a soluble protein (sCD127) (12). Studies have reported an association between high sCD127 plasma levels and mortality in septic shock (13) and critically ill patients (14). The mechanisms leading to the production of sCD127 are not fully understood as yet and may involve alternative splicing (12, 15) and post-transcriptional modifications (16). sCD127 is able to bind IL-7 (17) but its effect on IL-7 activity is

still controversial, some studies reporting a decrease of IL-7 activity (18, 19) whereas others show a potentialization of its effects (17, 20). As there is currently no available global transcriptional study of IL7R in septic shock patients, describing its expression modulation and evaluating its potential as a surrogate marker of septic shock-induced immune alterations appeared relevant.

The objectives of our study were to describe the transcriptional expression of IL7R during septic shock and assess the association between IL7R transcripts and day 28 (D28) mortality. This was explored in a discovery cohort and validated in a larger and independent cohort of septic shock patients.

Materials and Methods

Patients and samples

Septic shock patient discovery and validation cohorts

Septic shock patients were included from two independent existing cohorts, based on the following inclusion criteria: i) predicted ICU length of stay of at least two days and ii) presence of Systemic Inflammatory Response Syndrome due to an ongoing infection. Septic shock was defined as a sepsis-induced hypotension persisting despite adequate fluid resuscitation requiring vasopressors (21). The exclusion criteria were aplasia for the discovery cohort, completed, for the validation cohort, with recent chemotherapy or immunosuppressive treatment, high-dose or prolonged corticosteroid treatment, primary immune deficiency, and extracorporeal circulation in the month preceding ICU admission. Protocols of the discovery (#IRB 11236) and validation (#IRB 5044) cohorts were approved by local ethics committees. Non-opposition to inclusion in the protocols was systematically recorded from patients or next of kin. (See details in **Supplemental Patients Description**).

Control cohort

Whole blood samples from 19 healthy volunteers (median age 41 [35-50], male 42%) were obtained from the Etablissement Français du Sang in Lyon and used as controls. In accordance with standardized procedures for blood donation, informed consent was obtained and personal data were anonymized at the time of blood donation.

IL7R transcripts expression level measurement

Peripheral whole blood was collected in PAXgeneTM tubes (PreAnalytix, Hilden, Germany). Briefly, after extraction, total RNA was reverse transcribed in complementary cDNA. Three IL7R-specific PCR assays were designed: the "IL7R-001" PCR is specific of the IL7R-001 transcript encoding the membrane form of CD127 and the "IL7R-003" PCR of the IL7R-003 transcript encoding a sCD127 form. The "IL7R-All" PCR quantifies all IL7R transcripts studied, including the two previously described (See **Supplemental Fig. 1** and **Supplemental Table 1**). Absolute concentrations (copies/ μ L) were used to compare the expression levels of the different transcripts. For analysis of the association with D28 mortality, gene expression was normalized using HPRT1 (hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1)

as reference gene and results were expressed as Calibrated Normalized Relative Quantity (22). Experimental protocol is detailed in **Supplemental Method**.

Statistics

Chi-squared or Fisher's exact tests were used for qualitative variables assessment. Quantitative variables were compared with a Student's t-test or Mann-Whitney test. Paired Wilcoxon tests were used to compare the expression of IL7R transcripts between samples collected at two time-points. The association between D28 mortality and IL7R expression level was appreciated by univariate and multivariate Cox models. To allow comparison between models, hazard ratios were normalized to an increment from 1st to 3rd quartile (interquartile range hazard ratio or IQR HR). For multivariate analysis, confounding factors were selected using the following criteria: a correlation between the variable and IL7R expression level (Spearman $r \geq 0.15$), a significant association with D28 mortality ($p < 0.1$, Cox model), and the absence of missing values. To avoid redundancy, variables used in SOFA or SAPS II calculation were not included in multivariate models including these scores. Area Under Receiver Operating Characteristics Curves (AUC) were calculated to assess the predictive performance regarding D28 mortality. DeLong method was used for comparison of AUCs. For IL7R transcripts expression, a threshold was determined in the discovery cohort in order to maximize (i) the negative predictive value and (ii) the specificity. In the validation cohort, survival curves with 95% confidence intervals were drawn in patient groups defined according to IL7R expression threshold at D3 obtained in the discovery cohort. The log-rank test was used to compare the curves. A p value below 0.05 was considered significant. All statistics were performed with R software (version 3.2.4).

Results

Discovery cohort

To study the modulation of IL7R transcripts after septic shock, we first retrospectively included 30 patients who were sampled both at D1 and D3 after septic shock diagnosis. This enabled the evaluation of the IL7R D3/D1 expression ratio for all selected patients. Nine patients (30%) died before D28 (**Table 1**). D28 non-survivors had more comorbidities and higher severity scores at admission than survivors.

We measured IL7R expression levels using three PCR designs, of which one is specific of the IL7R-001 transcript that encodes the CD127 membrane and one of the sCD127-encoding IL7R-003 transcript. Expression levels of all IL7R transcripts studied were lower in septic shock patients than in healthy volunteers ($p < 0.001$, **Fig. 1A**). In septic shock patients, we observed a moderate increase in the expression of all IL7R transcripts between D1 and D3 ($p < 0.001$). Overall, the expression level of the transcript encoding a sCD127 form was approximately 60-fold lower than the transcript encoding the CD127 membrane form.

While IL7R expression levels at D1 showed no difference between survivors and non-survivors, those of all transcripts at D3 were lower in non-survivors ($p < 0.05$, **Fig 1B**). They also remained low in non-survivors but increased between D1 and D3 in survivors, as shown by higher D3/D1 ratios in survivors.

IL7R transcripts expression at D3 was significantly associated with D28 mortality, a higher expression level of IL7R transcripts indicating a lower risk of death (IQR HR (95% CI) 0.12 (0.02-0.81), 0.11 (0.02-0.74), 0.20 (0.04-0.93), for IL7R-All, IL7R-001 and IL7R-003, respectively, $p < 0.05$, **Supplemental Table 2**).

To estimate the performance of IL7R as a prognostic biomarker, we calculated AUC for each IL7R PCR assay at D3 and selected thresholds, in view of reaching a high negative predictive value and a high specificity (**Supplemental Table 3**). All AUCs were over 0.77, the highest one corresponding to the IL7R-001 membrane transcript.

As the IL7R-001 membrane transcript showed a high expression level and the most promising performances for D28 mortality prediction at D3, we specifically evaluated this transcript in the validation cohort.

Validation cohort

We included from a different cohort septic shock patients with available samples at D3 after septic shock diagnosis in order to confirm results from the discovery study (**Supplemental Fig. 2**). Out of the 177 selected patients, 42 died within D28 (24%) (**Table 2**). Age, SAPS II, D1 and D3 SOFA and Charlson scores were significantly higher in D28 non-survivors than in survivors. Lactate level, lymphocyte and platelet counts at D3 were also significantly different between survivors and non-survivors (**Supplemental Table 4**). The discovery and validation cohorts provided similar results in terms of comorbidities, biology and severity (data not shown).

As observed in the discovery cohort, IL7R expression level at D3 was significantly lower in D28 non-survivors compared to survivors ($p < 0.001$, **Fig. 2A**).

The validation cohort allowed confirming the significant association between D28 mortality and IL7R expression level at D3 (IQR HR 0.47 (95% CI 0.28-0.78), $p < 0.01$, **Table 3**). This association was still significant in a multivariate model adjusted for SAPS II (0.48 (0.29-0.81), $p < 0.01$, **Table 3**).

We assessed the performance of IL7R expression levels at D3 to identify D28 non-survivor patients and obtained an AUC of 0.68 (95% CI 0.59-0.78). This AUC was not statistically different from that of SOFA (0.72 (0.63-0.80)) and SAPS II (0.63 (0.53-0.72)). Interestingly, using the threshold from the discovery study, a negative predictive value of 0.86 (0.79-0.93), a positive predictive value of 0.31 (CI 0.26-0.36), a sensitivity of 0.76 (0.62-0.88) and a specificity of 0.46 (0.36-0.56) were obtained in the validation study.

Finally, survival probabilities in groups defined according to IL7R expression at D3 were significantly different ($p < 0.01$, **Fig. 2B**).

Discussion

Our study highlights for the first time the existing association between IL7R mRNA expression and D28 mortality in two independent cohorts of septic shock patients. Using a threshold obtained on the discovery cohort, IL7R expression level at D3 identified a group of septic shock patients from the validation cohort with a 2.2-fold lower risk of death. This suggests that IL7R mRNA quantification could help patient stratification in clinical trials evaluating immune-adjuvant therapies.

Given the important role of IL-7 in T-cell development and homeostasis, rhIL-7 has been evaluated in clinical trials in HIV and cancer. The first clinical trial in septic shock patients has just been completed and demonstrated rhIL-7 efficacy in restoring lymphocyte count in the absence of any severe side effect (24). We previously suggested that IL7R could be a companion biomarker for such therapy (13). Previous studies have demonstrated that CD127 expression on T-lymphocytes surface does not seem to undergo extensive regulation in septic shock (6, 25). In addition, CD127 is measured by flow cytometry, a technique which is not routinely implemented in clinical practice yet, consequently compromising its use as a biomarker in septic shock patients. Interestingly, we previously demonstrated a significant association between high plasma level of sCD127 and mortality (13, 14). Several IL7R transcripts have been identified and those lacking exon 6, the exon encoding transmembrane domain (12), may encode soluble forms of CD127.

To our knowledge, this study is the first to quantify different IL7R transcripts in septic shock patients. We set up specific PCR designs to measure (i) global IL7R expression, (ii) the membrane CD127 encoding transcript, and (iii) a soluble form of CD127 encoding transcript, whereas most of previous studies in autoimmune diseases (26, 27) or infectious diseases (28–30) evaluated only IL7R membrane transcript expression.

All transcripts studied, including that encoding a soluble form (IL7R-003), show decreased expression after septic shock. Its expression was interestingly lower in septic shock patients than in healthy volunteers, as also observed for the plasmatic level of sCD127. However, while the expression level of IL7-003 was lower in non-survivors, the sCD127 plasma concentration was higher in non-survivors (13, 14). The expression of IL7R-007, another transcript lacking exon 6, was modulated similarly to IL7R-003 (data not shown).

Combining the results obtained on proteins (membrane and soluble CD127) and on IL7R transcripts underlines the complex mechanisms involved in the regulation of this receptor. The

primary source of sCD127 has not yet been clearly determined but may be the result of concomitant shedding from the membrane and transcriptional regulation (15, 16). Moreover, despite the absence of a comprehensive evaluation of IL-7R forms, numerous molecules such as IL-7 itself, TNF, IL-6 or glucocorticoids, were shown to regulate its expression (31). This should be further considered when interpreting IL7R expression levels in pathologies leading to immune response modulation.

This study reveals the significant association of D3 IL7R expression with D28 mortality in two independent cohorts of septic shock patients and is in line with findings from Bauers *et al.*, who reports the association of IL7R in a combination of three downregulated genes in sepsis with long-term mortality (28).

The AUCs obtained for all IL7R transcripts studied were similar to those obtained for SAPS II and SOFA scores. Specifically quantifying the transcript encoding an sCD127 form actually did not prove more informative towards the identification of patients at risk of death than the full-length transcript. An interesting finding in the validation study is the high negative predictive value for D28 mortality shown by the IL7R-001 membrane expression at D3. This highlights its possible use as an exclusion biomarker for rhIL-7 treatment: IL7R expression could indeed identify patients at a lower risk of death who may not benefit from immunotherapy in order to focus treatment on the high-risk population. Interestingly, we obtained similar results when considering non septic ICU patients (data not shown). This will also be evaluated in trauma, burn, and surgical patients in the REALISM study (32).

Other markers of the adaptive immune response are associated with mortality in critically ill patients, the most studied being absolute lymphocyte count (33–35). Another indicator of the adaptive immune response is the lymphocyte proliferation assay which reflects T-cell functionality and has been found associated with mortality in sepsis patients (36). Unfortunately, long time-to-results and standardization issues make its use for rapid immune status assessment difficult (7). In this specific context, the feasibility of measuring a biomarker such as IL7R in clinical routine using automated molecular biology platform (RT-qPCR) makes it a promising tool for immune status monitoring. The high multiplex capacity of such platforms offers the possibility to integrate IL7R in a panel of biomarkers from innate and adaptive immune response that have been shown to be associated with immune alterations in ICU patients, such as CX3CR1 (37), IL10 and CD74 (38) or PD-1 (39). This could lead to the development of an integrated tool for immune characterization.

Our study, however, has some limitations. Healthy volunteers are younger than septic shock patients. Lymphocyte count and lactate level at D3, identified as potential confounding factors, might have been included in multivariate models in the validation study. In a model including IL7R-001 expression, SAPS II, lactate concentration and lymphocyte count at D3, the only parameter significantly associated with D28 mortality was lactate concentration (data not shown). However, due to a high number of missing values (36%), interpretation of such model is limited. The lower levels of IL7R transcripts in patients compared to healthy volunteers may also reflect the lower number of T cells frequently observed after septic shock (40) and not only a down-regulation of the expression. Not surprisingly, IL7R expression in whole blood was correlated with lymphocyte count (Spearman $r=0.5$). Besides the interest of IL7R expression by itself as a prognostic biomarker, its regulation in septic shock patients has to be specifically studied in isolated T lymphocytes.

Conclusions

Our results show that IL7R mRNA expression level is associated with D28 mortality in septic shock patients and presents a high negative predictive value. IL7R expression appears as a suitable marker of impaired adaptive immune response following septic shock. This marker could be evaluated in a panel of biomarkers combining innate and adaptive aspects of the immune response in order to precisely determine the immune status of patients and treat them more efficiently.

MIP Rea study group

Bernard Floccard, Guillaume Marcotte, Mathieu Page and Christian Guillaume (Hospices Civils de Lyon, Department of Anaesthesiology and Critical Care Medicine, Groupement Hospitalier Edouard Herriot, University Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France); Martin Cour, Laurent Argaud, Romain Hernu, Sylvie De La Salle, Marie Simon, and Thomas Baudry (Hospices Civils de Lyon, Medical Intensive Care Unit, Groupement Hospitalier Edouard Herriot, Lyon, France); Arnaud Friggeri, H el ene Vallin, Nathalie Panel, Marion Provent, Bernard Allaouchiche, Fabrice Thiollie, Vincent Piriou, Julien Boh e (Hospices Civils de Lyon, Intensive Care Unit, Centre Hospitalier Lyon Sud, Pierre Bénite, France); Frédéric Aubrun (Hospices Civils de Lyon, Intensive Care Unit, Hôpital de la Croix Rousse, Lyon, France), Emmanuelle Gallet-Gorius, Audrey Larue-Triolet, Christine Alberti-Segui, Marie-Ang elique Cazalis, Véronique Barbalat (Joint Research Unit HCL-bioM erieux, Groupement Hospitalier Edouard Herriot, Lyon, France), Anne Portier (Hospices Civils de Lyon, Immunology Laboratory, Groupement Hospitalier Edouard Herriot, Lyon, France).

Acknowledgements

This study received funding from bioM erieux and Hospices Civils de Lyon, and was part of ADNA (Advanced Diagnostic for New Therapeutic Approaches), a program dedicated to personalized medicine, coordinated by Institut Mérieux and supported by French public agency BPI France. The authors would like to gratefully thank Sophie Blein for her precious advice on statistical analysis and Sophie Ablott for her careful review of the manuscript.

References

1. SepNet Critical Care Trials Group: Incidence of severe sepsis and septic shock in German intensive care units: the prospective, multicentre INSEP study. *Intensive Care Med* 2016; 42:1980–1989
2. Singer M, Deutschman CS, Seymour C, et al.: The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *JAMA* 2016; 315:801–810
3. Daviaud F, Grimaldi D, Dechartres A, et al.: Timing and causes of death in septic shock. *Ann Intensive Care* 2015; 5:16
4. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D: Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2013; 13:862–874
5. Le Tulzo Y, Pangault C, Gacouin A, et al.: Early circulating lymphocyte apoptosis in human septic shock is associated with poor outcome. *Shock Augusta Ga* 2002; 18:487–494
6. Venet F, Foray A-P, Villars-Méchin A, et al.: IL-7 Restores Lymphocyte Functions in Septic Patients. *J Immunol* 2012; 189:5073–5081
7. Duffy D, Rouilly V, Libri V, et al.: Functional Analysis via Standardized Whole-Blood Stimulation Systems Defines the Boundaries of a Healthy Immune Response to Complex Stimuli. *Immunity* 2014; 40:436–450
8. Sereti I, Dunham RM, Spritzler J, et al.: IL-7 administration drives T cell-cycle entry and expansion in HIV-1 infection. *Blood* 2009; 113:6304–6314
9. Sportès C, Hakim FT, Memon SA, et al.: Administration of rhIL-7 in humans increases in vivo TCR repertoire diversity by preferential expansion of naive T cell subsets. *J Exp Med* 2008; 205:1701–1714
10. Unsinger J, Burnham C-AD, McDonough J, et al.: Interleukin-7 ameliorates immune dysfunction and improves survival in a 2-hit model of fungal sepsis. *J Infect Dis* 2012; 206:606–616
11. Noguchi M, Nakamura Y, Russell SM, et al.: Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-7 receptor. *Science* 1993; 262:1877–1880
12. Goodwin RG, Friend D, Ziegler SF, et al.: Cloning of the human and murine interleukin-7 receptors: Demonstration of a soluble form and homology to a new receptor superfamily. *Cell* 1990; 60:941–951

13. Demaret J, Villars-Méchin A, Lepape A, et al.: Elevated plasmatic level of soluble IL-7 receptor is associated with increased mortality in septic shock patients. *Intensive Care Med* 2014;
14. Peronnet E, Mouillaux J, Monneret G, et al.: Elevated soluble IL-7 receptor concentration in non-survivor ICU patients. *Intensive Care Med* 2016;
15. Rose T, Lambotte O, Pallier C, et al.: Identification and Biochemical Characterization of Human Plasma Soluble IL-7R: Lower Concentrations in HIV-1-Infected Patients. *J Immunol* 2009; 182:7389–7397
16. Vranjkovic A, Crawley AM, Gee K, et al.: IL-7 decreases IL-7 receptor α (CD127) expression and induces the shedding of CD127 by human CD8+ T cells. *Int Immunol* 2007; 19:1329–1339
17. Lundström W, Highfill S, Walsh STR, et al.: Soluble IL7R α potentiates IL-7 bioactivity and promotes autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci* 2013; 110:E1761–E1770
18. Crawley AM, Faucher S, Angel JB: Soluble IL-7R α (sCD127) Inhibits IL-7 Activity and Is Increased in HIV Infection. *J Immunol* 2010; 184:4679–4687
19. Monti P, Brigatti C, Krasmann M, et al.: Concentration and Activity of the Soluble Form of the Interleukin-7 Receptor α in Type 1 Diabetes Identifies an Interplay Between Hyperglycemia and Immune Function. *Diabetes* 2013; 62:2500–2508
20. Côté S, Matte J, Sad S, et al.: Complexed soluble IL-7 receptor α and IL-7 increase IL-7-mediated proliferation and viability of CD8+ T-cells in vitro. *Cell Immunol* 2015; 293:122–125
21. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al.: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 1992; 101:1644–1655
22. Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, et al.: qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol* 2007; 8:R19
23. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, et al.: APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med* 1985; 13:818–829
24. Francois B, Jeannet R, Daix T, et al.: Interleukin-7 restores lymphocytes in septic shock: the IRIS-7 randomized clinical trial. *JCI Insight* 2018; 3

25. Boomer JS, Shuherk-Shaffer J, Hotchkiss RS, et al.: A prospective analysis of lymphocyte phenotype and function over the course of acute sepsis. *Crit Care* 2012; 16:R112
26. Rane L, Vudattu N, Bourcier K, et al.: Alternative splicing of interleukin-7 (IL-7) and interleukin-7 receptor alpha (IL-7R α) in peripheral blood from patients with multiple sclerosis (MS). *J Neuroimmunol* 2010; 222:82–86
27. Badot V, Luijten RKM, Roon JA van, et al.: Serum soluble interleukin 7 receptor is strongly associated with lupus nephritis in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2013; 72:453–456
28. Bauer M, Giamarellos-Bourboulis EJ, Kortgen A, et al.: A Transcriptomic Biomarker to Quantify Systemic Inflammation in Sepsis — A Prospective Multicenter Phase II Diagnostic Study. *EBioMedicine* 2016; 6:114–125
29. Sieling PA, Sakimura L, Uyemura K, et al.: IL-7 in the cell-mediated immune response to a human pathogen. *J Immunol* 1995; 154:2775–2783
30. Lill M, Köks S, Soomets U, et al.: Peripheral blood RNA gene expression profiling in patients with bacterial meningitis. *Front Neurosci* 2013; 7:33
31. Mazzucchelli R, Durum SK: Interleukin-7 receptor expression: intelligent design. *Nat Rev Immunol* 2007; 7:144–154
32. Rol M-L, Venet F, Rimmelé T, et al.: The REAnimation Low Immune Status Markers (REALISM) project: a protocol for broad characterisation and follow-up of injury-induced immunosuppression in intensive care unit (ICU) critically ill patients. *BMJ Open* 2017; 7:e015734
33. Heffernan DS, Monaghan SF, Thakkar RK, et al.: Failure to normalize lymphopenia following trauma is associated with increased mortality, independent of the leukocytosis pattern. *Crit Care* 2012; 16:R12
34. Drewry AM, Samra N, Skrupky LP, et al.: Persistent Lymphopenia after Diagnosis of Sepsis Predicts Mortality. *Shock Augusta Ga* 2014; 42:383–391
35. Chung K-P, Chang H-T, Lo S-C, et al.: Severe lymphopenia is associated with elevated plasma interleukin-15 levels and increased mortality during severe sepsis. *Shock Augusta Ga* 2015; 43:569–575
36. Heidecke CD, Hensler T, Weighardt H, et al.: Selective defects of T lymphocyte function in patients with lethal intraabdominal infection. *Am J Surg* 1999; 178:288–292

37. Friggeri A, Cazalis M-A, Pachot A, et al.: Decreased CX3CR1 messenger RNA expression is an independent molecular biomarker of early and late mortality in critically ill patients. *Crit Care* 2016; 20:204
38. Peronnet E, Venet F, Maucort-Boulch D, et al.: Association between mRNA expression of CD74 and IL10 and risk of ICU-acquired infections: a multicenter cohort study. *Intensive Care Med* 2017; 43:1013–1020
39. Guignant C, Lepape A, Huang X, et al.: Programmed death-1 levels correlate with increased mortality, nosocomial infection and immune dysfunctions in septic shock patients. *Crit Care* 2011; 15:R99
40. Venet F, Davin F, Guignant C, et al.: Early assessment of leukocyte alterations at diagnosis of septic shock. *Shock Augusta Ga* 2010; 34:358–363

Table 1 Description of the discovery cohort according to survival status at day 28 after septic shock diagnosis

Parameters	Overall cohort (n=30)	Non-survivors (n=9)	Survivors (n=21)	p-value
Characteristics at admission				
Age, years	65 [53-75]	55 [52-71]	66 [54-75]	0.476
Gender, male	20 (67)	4 (44)	16 (76)	0.217
SAPS II	50 [39-59]	60 [45-70]	45 [34-52]	0.018
SOFA score D1	9 [8-12]	12 [9-16]	9 [7-9]	0.002
Comorbidities ^a (≥1)	13 (43)	8 (89)	5 (24)	0.002
Immune deficiency ^b	6 (20)	3 (33)	3 (14)	0.329
Type of admission				1.000
<i>Medical</i>	18 (60)	6 (67)	12 (57)	
<i>Elective surgery</i>	1 (3.3)	0 (0.0)	1 (4.8)	
<i>Emergency surgery</i>	11 (37)	3 (33)	8 (38)	
Major interventions during ICU stay				
Renal replacement therapy	7 (23)	5 (56)	2 (9.5)	0.017
Mechanical ventilation	24 (80)	9 (100)	15 (71)	0.143
Non-invasive ventilation	4 (13)	1 (11)	3 (14)	1.000
Outcomes				
ICU length of stay, days	11 [7-18]	10 [7-20]	11 [6-17]	1.000
Hospital length of stay, days	32 [28-45]	28 [17-35]	32 [30-46]	0.244
Survivors at ICU discharge	20 (67)	0 (0)	20 (95)	<0.001
Survivors at hospital discharge	18 (60)	0 (0)	18 (86)	<0.001

Categorical variables are expressed as number (%) and continuous variables as median [interquartile range]. Comparisons between survivor and non-survivor patients at day 28 were performed with Chi-square or Fisher's exact tests for qualitative variables and Mann-Whitney or t-tests for quantitative variables. SAPS II (Simplified Acute Physiology Score II) and SOFA (Sequential Organ Failure Assessment) score were measured after 24h of intensive care unit (ICU) stay. Values in bold indicate significance at $p < 0.05$.

^a cardiac, hepatic, respiratory or renal comorbidities

^b as defined by APACHE II score (23)

Table 2 Clinical characteristics of the septic shock patients of the validation cohort according to survival status at day 28

Parameters	Overall cohort (n=177)	Non-survivors (n=42)	Survivors (n=135)	p-value
Characteristics at admission				
Age, years	69 [58-78]	75 [63-81]	67 [57-78]	0.008
Gender, male	115 (65)	32 (76)	83 (61)	0.119
SAPS II	60 [49-71]	67 [57-78]	58 [48-70]	0.019
SOFA score D1	11 [8-13]	12 [10-14]	10 [8-13]	0.002
SOFA score D3	8 [5-12]	12 [8-15]	8 [4-11]	<0.001
Charlson score	2 [1-3]	3 [2-4]	2 [1-3]	0.014
Patients by Charlson score categories				0.017
	0 38 (21)	5 (12)	33 (24)	
	1 34 (19)	4 (9.5)	30 (22)	
	≥2 105 (59)	33 (79)	72 (53)	
Type of admission				0.876
	<i>Medical</i> 114 (64)	26 (62)	88 (65)	
	<i>Elective surgery</i> 4 (2.3)	1 (2.4)	3 (2.2)	
	<i>Emergency surgery</i> 59 (33)	15 (36)	44 (33)	
Site of primary infection				0.052
	<i>Respiratory</i> 80 (45)	18 (43)	62 (46)	
	<i>Abdominal</i> 48 (27)	17 (40)	31 (23)	
	<i>Others</i> 49 (28)	7 (17)	42 (31)	
Major interventions during ICU stay				
Mechanical ventilation	145 (82)	39 (93)	106 (79)	0.039
Duration of vasopressors, days	3 [2-5]	5 [3-8]	3 [2-5]	<0.001
Surgery	64 (36)	17 (40)	47 (35)	0.629
Transfusion	7 (4.0)	3 (7.1)	4 (3.0)	0.359
Renal replacement therapy	34 (19)	9 (21)	25 (19)	0.846
Outcomes				
ICU length of stay, days	10 [6-17]	11 [7-15]	10 [6-17]	0.930
Hospital length of stay, days	25 [15-44]	12 [8-16]	31 [21-50]	<0.001
Survivors at ICU discharge	136 (77)	8 (19)	128 (95)	<0.001
Survivors at hospital discharge	116 (66)	2 (4.8)	114 (84)	<0.001

Categorical variables are expressed as number (%) and continuous variables as median [interquartile range]. Comparisons between survivor and non-survivor patients at day 28 were performed with Chi-square or Fisher's exact tests for qualitative variables and Mann-Whitney or t-tests for quantitative variables. SAPS II (Simplified Acute Physiology Score II) was measured after 24h of intensive care unit (ICU) stay and SOFA (Sequential Organ Failure Assessment) score was measured after 24h and 72h of ICU stay. Values in bold indicate significance at $p < 0.05$.

Table 3 Association between IL7R membrane transcript (IL7R-001) expression levels at day 3 and status at day 28 after septic shock diagnosis in the validation cohort

Variables	IQR HR (95% CI)	<i>p</i> -value
Univariate Cox models		
IL7R-001 D3	0.47 (0.28-0.78)	0.004
SOFA D3	2.71 (1.74-4.21)	<0.001
SAPS II	1.57 (1.07-2.29)	0.022
Multivariate Cox models		
IL7R-001 D3	0.62 (0.38-1.0)	0.055
SOFA D3	2.30 (1.45-3.7)	<0.001
IL7R-001 D3	0.48 (0.29-0.81)	0.005
SAPS II	1.55 (1.04-2.32)	0.032

IQR HR refers to a hazard ratio normalized to an increment from 1st to 3rd quartile to allow for comparison between models. Values in bold indicate significance at $p < 0.05$.

CI: confidence interval; D3: day 3 after septic shock diagnosis; SAPS II: simplified acute physiological score II, SOFA: sequential organ failure assessment.

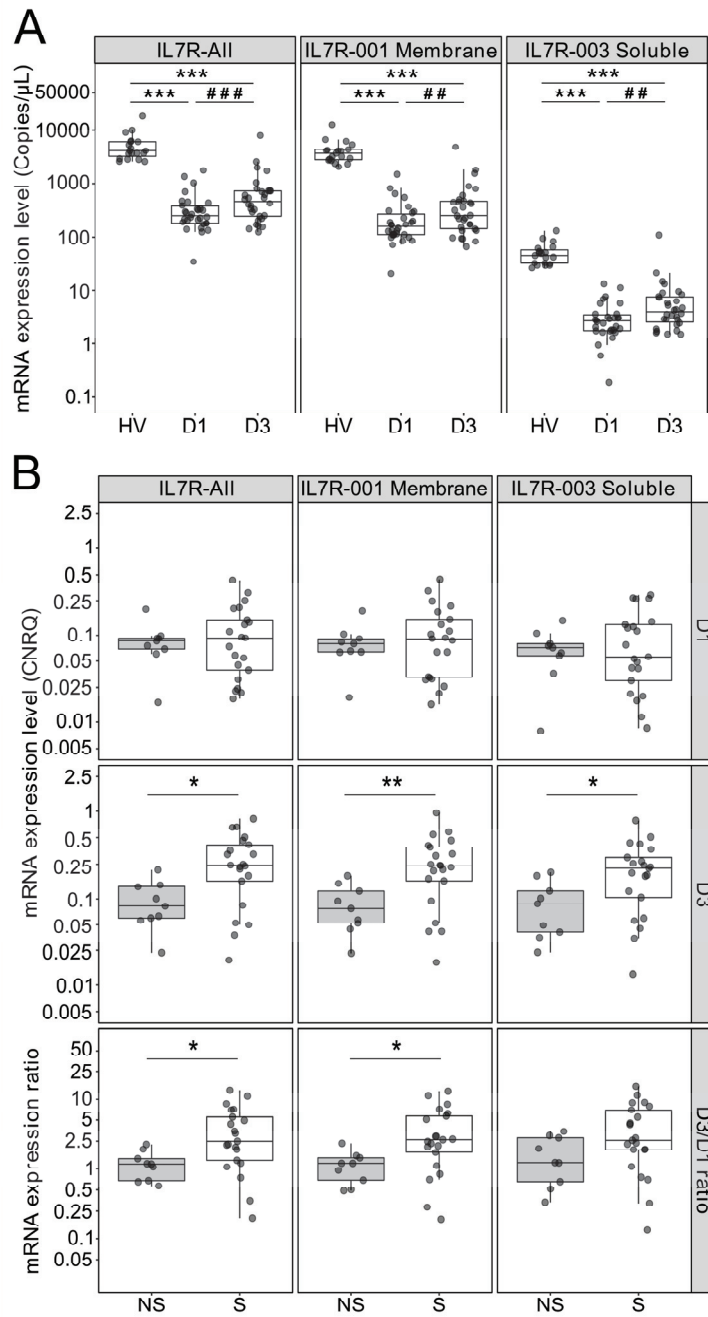


Figure 1 IL7R transcripts expression levels in the discovery cohort. **(A)** Comparison of mRNA expression between healthy volunteers (HV, n=19) and septic shock patients at day 1 (D1) and day 3 (D3) after septic shock diagnosis (n=30). mRNA levels are expressed as absolute concentration in copies/ μ L. **(B)** Comparison of mRNA expression between D28 non-survivor (NS, n=9) and survivor (S, n=21) patients, at D1 and D3 after septic shock diagnosis, and for the D3/D1 expression ratio. mRNA levels are expressed as calibrated normalized relative quantity (CNRQ) using HPRT1 as reference gene * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ Mann-Whitney test, ## $p < 0.01$ and ### $p < 0.001$ paired Wilcoxon test.

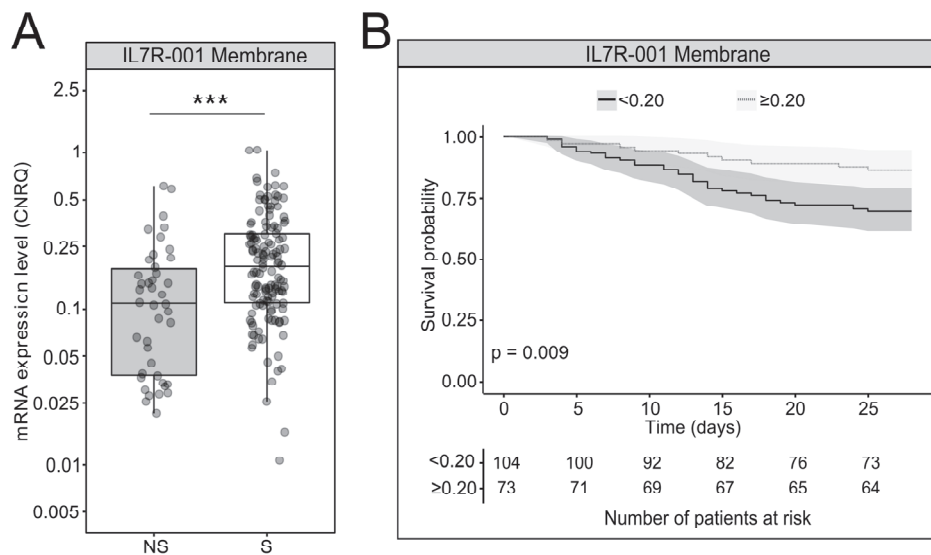


Figure 2 (A) IL7R membrane transcript (IL7R-001) expression levels in the validation cohort. Comparison of expression levels between D28 non-survivor (NS, n=42) and survivor (S, n=135) patients. IL7R expressions levels were measured at D3 after septic shock diagnosis. mRNA levels are expressed as calibrated normalized relative quantity (CNRQ) using HPRT1 as reference gene. *** $p < 0.001$ Mann-Whitney test. **(B)** Survival curves and 95% confidence intervals in patients groups of the validation cohort defined according to IL7R membrane transcript (IL7R-001) expression levels at D3, using the threshold obtained on the discovery cohort. This threshold of 0.20 is expressed as a calibrated normalized relative quantity (CNRQ) using HPRT1 as reference gene. The log-rank test was used to compare survival between groups.

Supplemental Digital Content

Low IL-7 receptor mRNA expression is independently associated with day 28 mortality in septic shock patients

Benjamin Delwarde, Estelle Peronnet, Fabienne Venet, Elisabeth Cerrato, Boris Meunier, Julie Mouillaux, Alain Lepape, Alexandre Pachot, Thomas Rimmelé, Guillaume Monneret, Julien Textoris, on behalf of the MIP Réa study group

Index

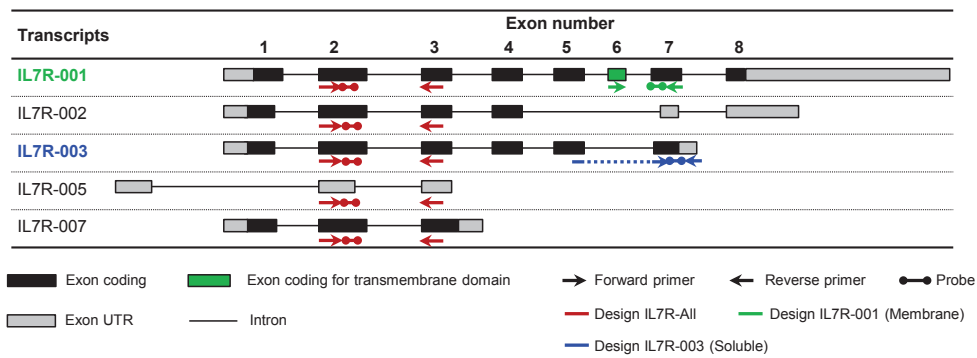
Supplemental Patients Description Discovery and validation cohorts description.....	p2
Supplemental Figure 1 IL7R transcripts detected by the different PCR designs.....	p3
Supplemental Table1 PCR assays characteristics.....	p4
Supplemental Method IL7R transcripts expression level measurement.....	p5
Supplemental Table 2 Association between IL7R transcripts expression levels and outcome at day 28 after septic shock diagnosis in the discovery cohort.....	p6
Supplemental Table 3 Area under ROC curve and performances for day 28 mortality after septic shock diagnosis in the discovery cohort.....	p7
Supplemental Figure 2 Validation cohort flowchart.....	p8
Supplemental Table 4 Biological parameters of patients from the validation cohort according to survival status at day 28 after septic shock diagnosis.....	p9
References	p10

Supplemental Patients Description Discovery and validation cohorts description

Discovery cohort: we included patients from a cohort of adult septic shock patients enrolled from December 2001 to April 2005 in two ICUs from a French university hospital (1). This study is part of a global study on ICU-induced immune dysfunctions and was approved by the local ethics committee (Comité de Protection des Personnes Sud-Est II #IRB 11236). No informed consent was needed, as this study was non-interventional and complementary blood samples were obtained during patients' routine blood sampling after completion of routine follow-up tests. Nevertheless, non-opposition to inclusion in the protocol was recorded from every patient or the patient's next of kin. This study is also registered at the French Ministry of Research and Education (#DC-2008-509). We selected patients with available samples at D1 and D3 to study the variation in IL7R expression levels between these two time-points.

Validation cohort: we included septic shock patients from a cohort of adult ICU patients enrolled from December 2009 to June 2011 in six ICUs from three French university hospitals (2). The study protocol was approved by the local ethics committee (Comité d'Ethique des Centres d'Investigation Clinique de l'Inter-Région Rhône-Alpes Auvergne #IRB 5044). No informed consent was needed, as this study was non-interventional and complementary blood samples were obtained during patients' routine blood sampling after completion of routine follow-up tests. Nevertheless, non-opposition to inclusion in the protocol was recorded from every patient or the patient's next of kin. We included septic shock patients with available peripheral whole blood sample at D3, in order to confirm the results obtained on the discovery cohort.

The Simplified Acute Physiology Score (SAPS) II was recorded at ICU admission (3) and the Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) score in the first 24 hours after admission (D1) and at day 3 (D3) (4). The chronic health status was defined using the Charlson comorbidity score (5). Length of stay and survival were measured at ICU discharge, at D28 after admission and at hospital discharge



Supplemental Figure 1 IL7R transcripts detected by the different PCR designs. IL7R transcripts structure is schematically represented from data available in Ensembl database (release 87 - GRCh38.p7). Exons targeted by primers (→ or ←) and probes (●—●) of each PCR design are indicated: IL7R-001, encoding the CD127 membrane form, IL7R-003, encoding a CD127 soluble form, and IL7R-All, specific for all studied transcripts, including the two previous ones.

Supplemental Table1 PCR assays characteristics

PCR design	Primers and probes sequences		Target exon	Detected transcripts	Product length (bp)
IL7R-All	Forward	GGAAGTGAATGGATCGCAGC	2	IL7R-001 (NM_002185)	110
	Backward	GGCACTTTACCTCCACGAG	3	IL7R-002 (ENST00000514217)	
	Probe	CTGTGCTTTGAGGACCCAGAT	2	IL7R-003 (ENST00000506850)	
			2	IL7R-005 (ENST00000511031)	
			IL7R-007 (ENST00000511982)		
IL7R-001	Forward	CTCTGTCGCTCTGTTGGTC	6	IL7R-001 (NM_002185)	99
	Backward	TCCAGAGTCTTCTTATGATCG	7		
	Probe	CTATCGTATGGCCAGTCTCC	7		
IL7R-003	Forward	GCTCAGGATTAAGCCTATCG	5-7	IL7R-003 (ENST00000506850)	131
	Backward	CACTGGGATGTTGCCAACAC	7		
	Probe	ATCATAAGAAGACTCTGGAACATCT	7		
HPRT1	Forward	CAAAGATGGTCAAGGTCGC	6	HPRT1-001 (NM_000194)	159
	Backward	GACACAAACATGATTCAAATCC	7-8		
	Probe	CAAGTTTGTGTAGGATATGCC	7		

Supplemental Method IL7R transcripts expression level measurement

Peripheral whole blood was collected in PAXgene™ tubes (PreAnalytix, Hilden, Germany). Total RNA was extracted using PAXgene™ Blood RNA Kit (PreAnalytix). Before RNA elution, the residual genomic DNA was digested using the Rnase-Free Dnase set (Qiagen, Hilden, Germany). RNA integrity was assessed with the RNA 6000 Nano Kit on a Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA). Total RNA was reverse transcribed in complementary cDNA using SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit (Life Technologies, Chicago, Illinois, USA).

Three specific PCR assays were designed (See **Supplemental Table 1** for oligonucleotides sequences). **Supplemental Figure 1** shows which IL7R exons are hybridized by the different primers and probes. The “IL7R-001” PCR is specific of the IL7R-001 transcript. This transcript, which contains the exon 6 corresponding to the transmembrane domain, encodes the full-length membrane form of CD127. The “IL7R-003” PCR is specific of the IL7R-003 transcript, encoding a CD127 soluble form. The “IL7R-All” PCR quantifies all IL7R transcripts studied, including the two previously described.

PCR reactions were performed on a LightCycler 480 instrument (Roche, Bale, Switzerland), using a LightCycler 480 Probes Master kit (Roche) following manufacturer’s instructions. Thermocycling was carried out in a final volume of 20 µL containing 0.5 µM of primers and 0.1 µM of probe, with an initial denaturation step of 10 min at 95°C, followed by 45 cycles of a touchdown PCR protocol (10 sec at 95°C, 29 sec annealing at 68-58°C, and 1 sec extension at 72°C). The Second Derivative Maximum Method was used with the LightCycler software to automatically determine the crossing point for individual samples. Standard curves were generated by using four replicates of cDNA standards and were used to perform efficiency corrected quantification. For comparison between expression levels of the different IL7R transcripts, absolute concentrations (copies/µL) were used. For analysis of association with the outcome, gene expression was normalized using HPRT1 (hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1) as reference gene and results were expressed as Calibrated Normalized Relative Quantity (6).

Supplemental Table 2 Association between IL7R transcripts expression levels and outcome at day 28 after septic shock diagnosis in the discovery cohort

IL7R transcripts	Time-point	IQR HR (95% CI)	p-value
IL7R-All	D1	0.71 (0.32-1.60)	0.407
	D3	0.12 (0.02-0.81)	0.029
	D3/D1 ratio	0.14 (0.02-1.09)	0.06
IL7R-001 (<i>Membrane</i>)	D1	0.70 (0.32-1.56)	0.385
	D3	0.11 (0.02-0.74)	0.023
	D3/D1 ratio	0.27 (0.07-1.00)	0.051
IL7R-003 (<i>Soluble</i>)	D1	0.68 (0.29-1.59)	0.370
	D3	0.20 (0.04-0.93)	0.023
	D3/D1 ratio	0.33 (0.09-1.28)	0.109

IQR HR refers to a hazard ratio normalized to an increment from 1st to 3rd quartile to allow comparison between models. Values in bold indicate significance at $p < 0.05$.

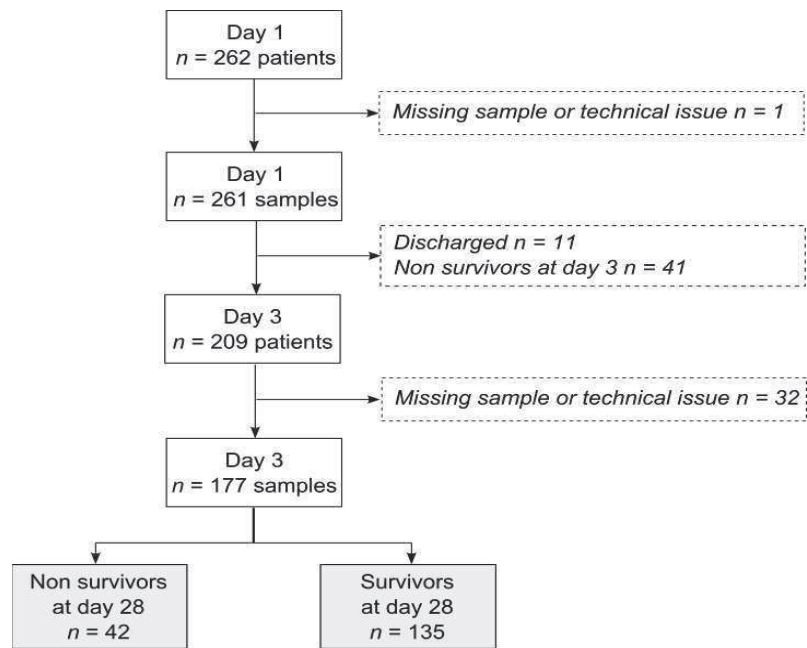
CI: confidence interval.

Supplemental Table 3 Area under ROC curve and performances for day 28 mortality after septic shock diagnosis in the discovery cohort

IL7R transcripts	Time-point	AUC (95% CI)	Threshold	Se (95% CI)	Sp (95% CI)	PPV (95% CI)	NPV (95% CI)
IL7R-All	D3	0.79 (0.63-0.96)	0.22	1 (1-1)	0.62 (0.38-0.81)	0.53 (0.41-0.69)	1 (1-1)
IL7R-001	D3	0.81 (0.65-0.97)	0.20	1 (1-1)	0.67 (0.48-0.86)	0.56 (0.45-0.75)	1 (1-1)
IL7R-003	D3	0.77 (0.61-0.94)	0.21	1 (1-1)	0.52 (0.33-0.71)	0.47 (0.39-0.6)	1 (1-1)

For each IL7R assay, a threshold was determined in the discovery cohort in order to maximize (i) the negative predictive value (NPV) and (ii) the specificity (Sp). Thresholds are expressed as calibrated normalized relative quantity (CNRQ) using HPRT1 as reference gene.

ROC: receiver operating characteristic, AUC: area under ROC curve; CI: confidence interval, Se: sensitivity, PPV: positive predictive value



Supplemental Figure 2 Validation cohort flowchart

Supplemental Table 4 Biological parameters of patients from the validation cohort according to survival status at day 28 after septic shock diagnosis

Parameters	Overall cohort (n=177)	Non-survivors (n=42)	Survivors (n=135)	p-value
Biological parameters at ICU admission				
Lactate, mmol/L (n=174)	2.45 [1.70-3.77]	3.15 [1.80-5.97]	2.30 [1.70-3.40]	0.016
Hemoglobin, g/dL	10.6 [9.30-11.9]	10.2 [9.33-11.3]	10.8 [9.20-12.2]	0.148
Neutrophils, 10 ⁹ /L (n=140)	11.3 [6.87-17.4]	7.60 [5.84-11.2]	13.4 [7.83-20.2]	0.001
Lymphocytes, 10 ⁹ /L (n=140)	0.76 [0.40-1.16]	0.60 [0.38-0.85]	0.80 [0.40-1.20]	0.122
Monocytes, 10 ⁹ /L (n=139)	0.43 [0.20-0.83]	0.34 [0.18-0.60]	0.56 [0.20-0.93]	0.079
Platelets, 10 ³ /mm ³	159 [92-233]	108 [80-187]	171 [113-242]	0.022
PaO ₂ /FIO ₂ (n=175)	166 [106-239]	172 [116-258]	162 [105-236]	0.549
Creatinine, μmol/L	150 [93-235]	164 [102-229]	141 [81-238]	0.286
Diuresis, mL/day	1250 [650-2250]	800 [263-1825]	1300 [750-2325]	0.017
Biological parameters at D3				
Lactate, mmol/L (n=145)	1.70 [1.30-2.20]	2.00 [1.65-3.22]	1.60 [1.20-2.00]	<0.001
Hemoglobin, g/dL (n =174)	10.0 [9.00-11.0]	10.2 [9.10-11.0]	10.0 [9.00-10.9]	0.669
Neutrophils, 10 ⁹ /L (n=139)	13.0 [8.13-17.7]	14.4 [9.49-17.4]	11.6 [7.91-17.7]	0.287
Lymphocytes, 10 ⁹ /L (n=139)	0.80 [0.60-1.08]	0.64 [0.40-0.91]	0.84 [0.60-1.11]	0.005
Monocytes, 10 ⁹ /L (n=139)	0.61 [0.35-0.98]	0.55 [0.35-0.82]	0.66 [0.37-0.99]	0.551
Platelets, 10 ³ /mm ³ (n=174)	136 [74-213]	79 [47-167]	147 [81-230]	0.005
PaO ₂ /FIO ₂ (n=165)	227 [160-295]	222 [147-288]	230 [169-298]	0.568
Creatinine, μmol/L (n=175)	107 [66-193]	150 [106-200]	99 [62-186]	0.020
Diuresis, mL/day	1400 [850-2300]	1075 [200-1875]	1500 [900-2550]	0.008

Parameters are expressed as median [interquartile range]. Comparisons between survivor and non-survivor patients at day 28 were performed with Mann-Whitney or t-tests. Values in bold indicate significance at p<0.05.

References

1. Landelle C, Lepape A, Français A, et al.: Nosocomial infection after septic shock among intensive care unit patients. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008; 29:1054–1065
2. Friggeri A, Cazalis M-A, Pachot A, et al.: Decreased CX3CR1 messenger RNA expression is an independent molecular biomarker of early and late mortality in critically ill patients. *Crit Care* 2016; 20:204
3. Le Gall JR, Lemeshow S, Saulnier F: A new Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study. *JAMA J Am Med Assoc* 1993; 270:2957–2963
4. Vincent JL, Moreno R, Takala J, et al.: The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med* 1996; 22:707–710
5. Charlson ME, Pompei P, Ales KL, et al.: A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J Chronic Dis* 1987; 40:373–383
6. Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, et al.: qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol* 2007; 8:R19

4. Regulation of the soluble CD127 protein and corresponding transcripts in septic shock

Contexte

Dans nos précédentes études évaluant l'expression du récepteur de l'IL-7 comme biomarqueur dans le sepsis, la protéine soluble (sCD127) avait été mesurée dans le plasma et les transcrits à partir d'échantillons de sang total. Le récepteur de l'IL-7 étant principalement exprimé dans les lymphocytes T, les niveaux d'expression ainsi mesurés peuvent être impactés par la lymphopénie dont souffrent la majorité des patients. Ainsi, la régulation de la forme soluble du récepteur de l'IL-7 chez les patients septiques n'est que partiellement comprise. Le but de cette étude est de mesurer, à partir d'échantillons de lymphocytes T purifiés de patients en choc septique, la production de sCD127 par les lymphocytes T et l'expression des transcrits correspondant à des formes solubles. Afin de mieux comprendre la régulation de la forme soluble dans le sepsis, cette étude vise également à reproduire *ex vivo* sur lymphocytes T purifiés de volontaires sains l'expression du récepteur soluble observée chez les patients.

Description

Nous avons mesuré la concentration de sCD127 dans le surnageant de lymphocytes purifiés après 48 heures de culture ainsi que l'expression des transcrits IL7R7 et IL7R3 correspondant à une forme soluble. Cette étude a été réalisée chez 38 patients en choc septique et 33 volontaires sains du même âge. La production de sCD127 était augmentée chez les patients alors que l'expression des transcrits IL7R7 et IL7R3 était diminuée en comparaison avec les volontaires sains. En testant plusieurs stimulants connus pour réguler l'expression du récepteur de l'IL-7, la régulation de la forme soluble observée chez les patients était reproduite *ex vivo* par l'activation du TCR de lymphocytes T purifiés de volontaires sains.

Conclusion

Nous avons mis en évidence une diminution de l'expression des transcrits IL7R7 et IL7R3 dans les lymphocytes T de patients en choc septique alors que ceux-ci produisaient une quantité plus importante de sCD127 en comparaison avec les volontaires sains. Cette augmentation semble être masquée au niveau plasmatique, sans doute à cause de la lymphopénie. L'activation massive des lymphocytes T chez les patients en choc septique pourrait participer à la régulation de la forme soluble du récepteur de l'IL-7.

Cette article est en cours de préparation pour une soumission au journal Intensive Care Medicine Experimental.

Regulation of the soluble CD127 protein and corresponding transcripts in septic shock

Julie Mouillaux^{1,2,*}, Camille Allam^{1,3,*}, Thomas Uberti⁴, Benjamin Delwarde⁴, Thomas Rimmelé^{1,4}, Julien Textoris^{1,2,4}, Guillaume Monneret^{1,2,3}, Estelle Peronnet^{1,2,*}, Fabienne Venet^{1,2,3,*}

1 EA 7426 « Pathophysiology of injury-induced immunosuppression (PI3) » Lyon 1 University / Hospices Civils de Lyon / bioMérieux, Lyon France

2 Joint Research Unit HCL-bioMérieux, Hôpital Edouard Herriot, Lyon, France

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

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

* These authors contributed equally to this work

Corresponding author:

Dr Fabienne Venet

Immunology laboratory

Hôpital Edouard Herriot – Hospices Civils de Lyon

5 place d'Arsonval

69437 Lyon CEDEX 03- France

e-mail: fabienne.venet@chu-lyon.fr

Tel: +33472119546

To the Editor,

Sepsis is the leading cause of mortality for critically ill patients worldwide. Septic patients develop T lymphocyte dysfunctions associated with increased risk of death and nosocomial infections (1). Therefore, IL-7 had been recently evaluated as an immuno-adjuvant therapy to reverse these alterations (2). Besides the IL-7 surface receptor (CD127), a soluble form sCD127 exists (3). We previously studied their expressions at the protein and mRNA levels in septic shock patients. They were evaluated as biomarkers of mortality and were consequently quantified in whole blood and plasma samples (4, 5). However, majority of septic shock patients are lymphopenic, while sCD127 protein is mainly released from T cells and the corresponding transcripts are mainly expressed by T cells. Therefore, their regulation remains not fully understood.

For the first time, we evaluated the release of sCD127 and the expression of the corresponding transcripts in purified T cells from septic shock patients and healthy volunteers (HV) (see supplementary material and methods). Our cohort was composed of 38 septic shock patients and 31 HV (see supplementary Table 1). Septic shock patients samples were collected at day 1 (D1), D3 and D7 after the diagnosis. The secreted protein was measured in purified T cells supernatant after 48 h of culture with a standardized ELISA assay. IL7R3, a transcript coding for a form of sCD127, and IL7R7, a transcript potentially coding for a form of sCD127, were measured with specific RT-qPCR designs on RNA from purified T cells (see supplementary Table 2). We also wanted to reproduce *ex vivo* the sCD127 regulation observed in patients. Thus, we measured sCD127 secreted protein and IL7R3 and IL7R7 mRNA transcripts expressions in purified T cells from HV after *ex vivo* stimulation using three stimuli known to regulate CD127 expression: IL-7, dexamethasone and TCR activation (6, 7) (see supplementary data material and methods).

Interestingly, the release of sCD127 tended to be higher in septic shock patients' T cells supernatant compared to HV (Fig. 1A). This result differs from the sCD127 plasmatic concentration which was found to be decreased in septic shock patients compared to HV (8). This suggests that

lymphopenia may impact the measure of sCD127 plasmatic concentration in septic shock. Both IL7R3 and IL7R7 mRNA transcripts expressions were decreased in septic shock patients' T cells (Fig. 1B). This result is concordant with a previous study from our group performed in whole blood samples from septic shock patients (4). Thus, the lower expression of IL7R3 and IL7R7 seems to come from a downregulation in T cells and does not only reflect lymphopenia.

Whereas IL-7 stimulation induced a decrease of sCD127 concentration and dexamethasone had no major impact, *ex vivo* TCR activation of purified T cells from HV led to a similar increase of sCD127 concentration as observed in patients (Fig. 1C). Thus, the association between high sCD127 plasmatic levels and mortality in ICU and septic shock patients previously reported could be explained by a higher T cell activation and inflammation in more severe patients (5, 8). TCR activation of purified T cells from HV also reproduced the downregulation of both IL7R3 and IL7R7 with a stronger effect on the latter one, whereas IL-7 induced a marked decreased of both transcripts expression and dexamethasone a slight increase (Fig. 1D).

Low sCD127 plasmatic concentration in septic shock patients compared to HV could reflect lymphopenia whereas septic shock patients' T cells seem to produce more sCD127 compared to HV, likely due to T cell activation. This could explain the higher sCD127 plasmatic concentration observed in more severe patients in our previous study. Our results also reveal an intrinsic regulation of both IL7R3 and IL7R7 in septic shock patients T cells. Their expression could thus be evaluated as specific markers of T cell dysfunctions. These results have to be reproduced in a larger confirmation cohort. Overall, *ex vivo* TCR activation reproduced a similar regulation of the soluble IL-7 receptor as observed in septic shock patients at the protein and transcripts levels. Thus, the massive T cell activation in sepsis could participate to the sCD127 regulation observed in patients. The opposite regulation between protein and mRNA transcripts supports a shedding of the surface CD127 as the main source of sCD127 production. Further experiments are required to fully characterize the mechanisms underlying the IL-7 receptor soluble form regulation in septic shock.

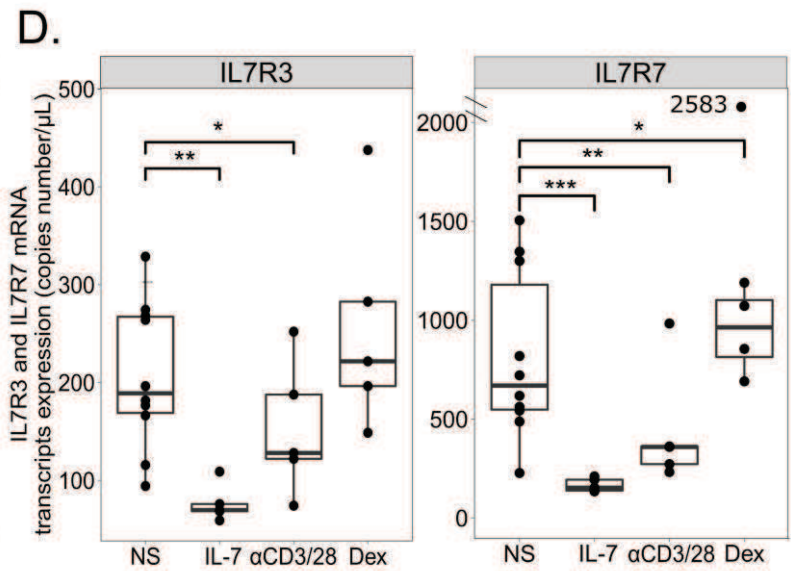
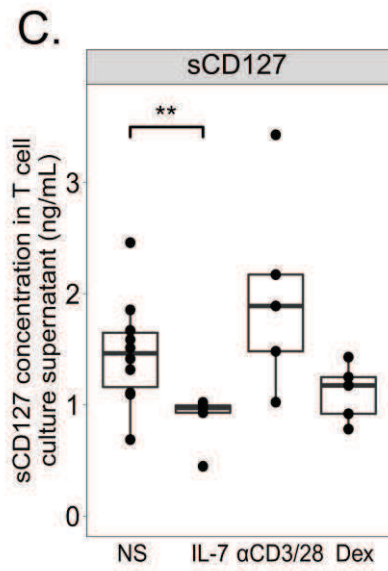
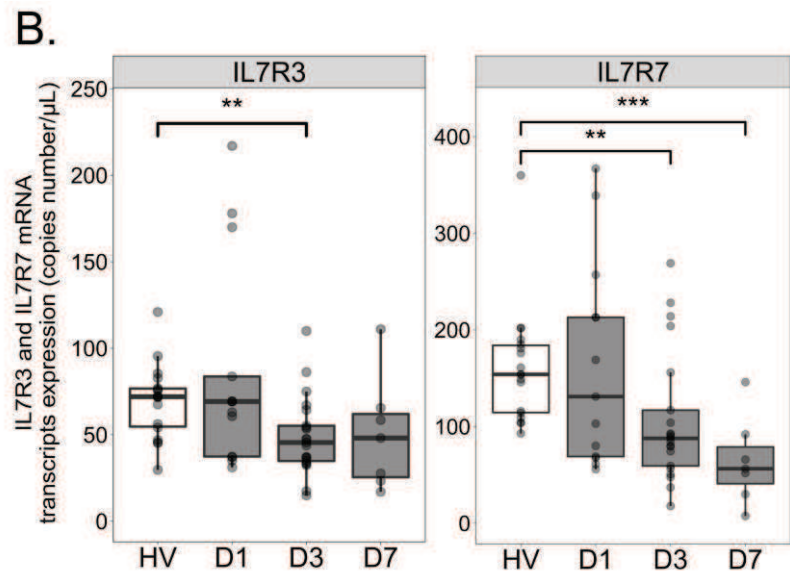
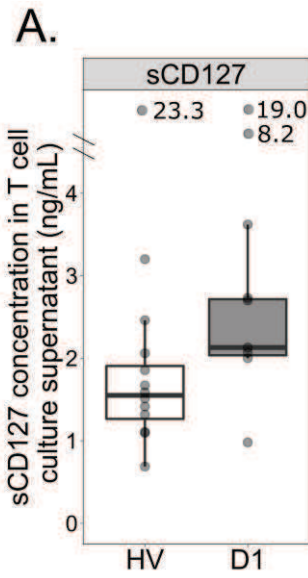
References

1. Hotchkiss, R. S., C. M. Coopersmith, J. E. McDunn, and T. A. Ferguson. 2009. Tilting toward immunosuppression. *Nat. Med.* 15: 496–497.
2. Francois, B., R. Jeannet, T. Daix, A. H. Walton, M. S. Shotwell, J. Unsinger, G. Monneret, T. Rimmelé, T. Blood, M. Morre, A. Gregoire, G. A. Mayo, J. Blood, S. K. Durum, E. R. Sherwood, and R. S. Hotchkiss. 2018. Interleukin-7 restores lymphocytes in septic shock: the IRIS-7 randomized clinical trial. *JCI Insight* 3.
3. Rose, T., O. Lambotte, C. Pallier, J.-F. Delfraissy, and J.-H. Colle. 2009. Identification and Biochemical Characterization of Human Plasma Soluble IL-7R: Lower Concentrations in HIV-1-Infected Patients. *J. Immunol.* 182: 7389–7397.
4. Delwarde, B., E. Peronnet, E. Cerrato, F. Venet, A. Lepape, T. Rimmelé, G. Monneret, and J. Textoris. 2016. IL7R transcriptional expression analysis during septic shock. *Crit. Care* 20: P025.
5. Demaret, J., A. Villars-Méchin, A. Lepape, J. Plassais, H. Vallin, C. Malcus, F. Poitevin-Later, G. Monneret, and F. Venet. 2014. Elevated plasmatic level of soluble IL-7 receptor is associated with increased mortality in septic shock patients. *Intensive Care Med.* 40: 1089–1096.
6. Alves, N. L., E. M. M. van Leeuwen, I. A. M. Derks, and R. A. W. van Lier. 2008. Differential Regulation of Human IL-7 Receptor α Expression by IL-7 and TCR Signaling. *J. Immunol.* 180: 5201–5210.
7. Franchimont, D., J. Galon, M. S. Vacchio, S. Fan, R. Visconti, D. M. Frucht, V. Geenen, G. P. Chrousos, J. D. Ashwell, and J. J. O’Shea. 2002. Positive effects of glucocorticoids on T cell function by up-regulation of IL-7 receptor alpha. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 168: 2212–2218.
8. Peronnet, E., J. Mouillaux, G. Monneret, E. Gallet-Gorius, S. Blein-Henry, A. Lepape, J. Textoris, F. Venet, and MIP Réa Study Group. 2016. Elevated soluble IL-7 receptor concentration in non-survivor ICU patients. *Intensive Care Med.* 42: 1639–1640.

9. Levy, M. M., M. P. Fink, J. C. Marshall, E. Abraham, D. Angus, D. Cook, J. Cohen, S. M. Opal, J.-L. Vincent, G. Ramsay, and SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS. 2003. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit. Care Med.* 31: 1250–1256.
10. Singer, M., C. S. Deutschman, C. W. Seymour, M. Shankar-Hari, D. Annane, M. Bauer, R. Bellomo, G. R. Bernard, J.-D. Chiche, C. M. Coopersmith, R. S. Hotchkiss, M. M. Levy, J. C. Marshall, G. S. Martin, S. M. Opal, G. D. Rubenfeld, T. van der Poll, J.-L. Vincent, and D. C. Angus. 2016. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 315: 801–810.
11. Demaret, J., A. Walencik, M.-C. Jacob, J.-F. Timsit, F. Venet, A. Lepape, and G. Monneret. 2013. Inter-laboratory assessment of flow cytometric monocyte HLA-DR expression in clinical samples. *Cytometry B Clin. Cytom.* 84: 59–62.

Figure

Figure 1 sCD127 protein release and mRNA transcripts expression in septic shock patients and in purified T cells from healthy volunteers (HV) upon *ex vivo* stimulations. (A) Soluble CD127 release was quantified in supernatants of purified T cells at D1 (n=9) for septic shock patients in comparison with HV (n=13) after 48 h of culture without any stimulation. (B) Gene expressions of the IL7R3 (left panel) and IL7R7 (right panel) transcripts were measured using RT-qPCR from RNA from purified T cells at D1 (n=13), D3 (n=20) and D7 (n=7) for septic shock patients in comparison with HV (n=18). (C) CD127 release and (D) IL7R3 (left panel) and IL7R7 (right panel) mRNA transcripts expressions were measured in purified T cells from HV stimulated with IL-7 (n=5, 10 ng/mL), anti-CD3/CD28 antibodies coated beads (n=5, α CD3/28, 1:2 bead to cells ratio), dexamethasone (n=5, Dex, 10^{-7} M) or not stimulated (n=10, NS) during 48 h. For each HV and each condition of stimulation, samples were proceeded in biological triplicates (culture wells) and technical duplicates (for ELISA only), summarized by the mean for each individual. Data are presented as Tukey boxplots. Mann-Whitney tests were used to compare values between septic shock patients and HV and between non stimulated and stimulated purified T cells from HV, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.



Supplementary material

Supplementary material and methods

Septic shock patients and healthy volunteers

This study was conducted in the Intensive Care Units (ICU) of the Hôpital Edouard Herriot (Hospices Civils de Lyon, Lyon, France). This project was approved by our Institutional Review Board for ethics (“Comité de Protection des Personnes Sud-Est II”), which waived the need for informed consent, because this study was observational and performed on residual blood after completion of routine follow-up (#IRB 11236). This study is registered at the French Ministry of Research and Teaching (#DC-2008-509), at the Commission Nationale de l’Informatique et des Libertés and on clinicaltrials.gov (NCT02803346). Non-opposition to inclusion in the study was registered for each patient. Septic shock patients were identified according to the diagnostic criteria of the American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine and to the new sepsis definition from 2016 (9, 10). Septic Shock was defined as: identifiable site of infection, persisting hypotension despite fluid resuscitation requiring vasopressor therapy, and evidence of a systemic inflammatory response. Septic shock patients were excluded if they met following exclusion criteria: age<18, immunosuppressive disease (HIV, cancer, primary immune deficiency), immunosuppressive or corticoid treatment (dosage>10 mg/day or cumulative dose >700 mg equivalent prednisolone), aplasia as defined by number of circulating neutrophils < 500 cells/mm³, extracorporeal circulation during the month prior ICU admission. mHLA-DR (AB/C), number of anti-HLA-DR antibodies bound per monocyte, was measured as previously described (11). Clinical data are presented in table I. Samples were collected at three time points after the onset of septic shock: from 24 h to 48 h (D1, n=22), 72 h to 96 h (D3, n=30) and 7 to 8 days (D7, n=10). Peripheral blood from healthy volunteers (HV) was provided by “Etablissement Français du Sang”: 31 age and gender matched HV for the septic shock patients’ cohort and 10 HV for the *ex vivo* experiments. According to the standardized

procedure for blood donation, written informed consent was obtained from HV and personal data for blood donors were anonymized at time of blood donation and before blood transfer to our research lab.

T cell purification and culture

Human T cells were isolated from HV and septic shock patients whole blood samples by antibody-based negative selection and density gradient centrifugation using a human T cell enrichment cocktail (Rosette SepTM, StemCell Technologies, Grenoble, France), according to the manufacturer's instructions. Quality of T cell purification was systematically controlled. Purified cells were labeled with a Pacific Blue (PB) anti-CD3 antibody (Ab) (Beckman Coulter, Hialeah, FL, USA) and lithium dodecyl sulfate 751 as a marker of nucleated cells (Molecular Probes, Life Technologies, Saint Aubin, France). The sample purity was systematically higher than 95 %. Purified T cells were cultured at 1×10^6 cells per mL in complete culture medium: RPMI 1640 (Eurobio, Les Ulis, France), supplemented with 10 % AB human serum (Life Technologies), 2 mM L-Glutamine (Eurobio), 1,000 IU/mL penicillin (Eurobio), 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin (Eurobio) and 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ amphotericin B (Gibco, Thermofisher scientific, Wilmslow, UK). After overnight culture, T cells were seeded in complete medium in 24-wells cell culture plates (Corning[®], Corning, NY, USA)

IL-7 receptor expression in response to different stimuli

Three stimuli were used: anti-CD3/CD28 Abs ($\alpha\text{CD3}/28$) coated beads (T cell activation/expansion kit, 1:2 bead to cells ratio according to the manufacturer's instructions, Miltenyi Biotec, Aubrun, CA, USA), IL-7 (10 ng/mL, R&D systems, Minneapolis, MN, USA) and dexamethasone (10^{-7} M, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). The purified T cells were incubated at 37 °C in humidified 5 % CO₂ atmosphere during 48 h. Triplicates were performed for each culture condition.

IL7R3 and IL7R7 mRNA level evaluation

Total RNA was extracted using an RNeasy kit (Qiagen, Hilden, Germany) from T cells after purification for septic shock patients and HV samples after 48 h culture with or without *ex vivo* stimulation of purified T cells. RNA integrity was assessed with the RNA 6000 Nano kit (Agilent technologies, Santa Clara, CA, USA). Total RNA was reversed transcribed in complementary DNA (cDNA) using SuperScript®VILO™ cDNA synthesis kit (Life Technologies). Specific PCR assays were designed to quantify two IL7R transcripts expressions: IL7R3 coding for sCD127 and IL7R7 potentially coding for sCD127 (see supplemental Table 2). Quantitative PCR was conducted on a LightCycler 480 instrument (Roche, Bale, Switzerland) using LightCycler 480 probes master kit (Roche) following the manufacturer's instructions. Thermocycling was performed in a final volume of 20 µL containing 0.5 µM of primers and 0.1 µM of probe, with an initial denaturation step of 10 min at 95 °C, followed by 45 cycles of denaturation for 10 seconds at 95 °C, annealing for 29 seconds at 68-58 °C and extension for 1 second at 72 °C. The crossing point for each sample was calculated using the second derivative maximum method with the LightCycler software. Standard curves were generated by using five replicates of cDNA standards and were used to perform efficiency corrected quantification. Reproducibility coefficients of variation were below 21 %. Results were expressed as absolute concentrations and normalized by the RNA quantity used for the reverse transcription (100 ng for septic patients purified T cells and 200 ng for *ex vivo* cultured purified T cells).

Soluble CD127 measurement

sCD127 was measured in culture supernatant of purified T cells from septic shock patients and HV with or without *ex vivo* stimulation after 48 h using a sandwich ELISA, adapted from Peronnet *et al.* (8). Maxisorb Nunc® 96-wells plates (Sigma-Aldrich) were coated overnight with the capture monoclonal antibody R34.34 (Beckman) diluted at 8 µg/mL in carbonate-bicarbonate buffer (Sigma-

Aldrich) at 4 °C. Wells were washed three times with TBS-Tween 0.05 % (TBS-T, Sigma-Aldrich) and saturated for 1 h at room temperature with TBS-T containing 5 % goat serum (Sigma-Aldrich). Recombinant human CD127 Fc chimera protein (R&D Systems) was used as standard protein for sCD127 quantification and was diluted in RPMI1640 (Eurobio) with 10 % AB human serum (Life Technologies). After three washes, the diluted standard protein was added as well as samples in duplicates for 2 h at 37 °C. Plates were washed three times and incubated with 0.2 µg/mL biotinylated polyclonal anti-human CD127 (R&D Systems) for 2 h at 37 °C in TBS containing 5 % of goat serum. After three washes, streptavidin-horseradish peroxidase (Jackson ImmunoResearch, Newmarket, UK) diluted 1/50,000 in TBS (Sigma-Aldrich) containing 10 % goat serum was incubated for 20 min at room temperature, before a wash step. Tetramethylbenzidine substrate (Pierce, Thermofisher scientific) was then added and reaction was stopped after 15 min using H₂SO₄ 2M. Absorbance was read at 450 nm on a spectrophotometer. The detection limit was 0.898 ng/mL.

Supplementary Table 1. Clinical characteristics of septic shock patients. Blood samples were obtained from 38 septic shock patients after the onset of shock. For clinical parameters, categorical data are presented as numbers of cases and percentages of the total population in brackets. Continuous data and biological parameters are presented as medians and interquartile ranges [Q1-Q3]. SAPS II (Simplified Acute Physiology Score II) and Mac Cabe score were calculated on admission. SOFA (Sequential Organ Failure Assessment) score was measured after 24 h of ICU stay. mHLA-DR (AB/C): number of anti-HLA-DR antibodies bound per monocyte.

Parameters	Septic shock patients (n=38)
Sexe, M	26 (68 %)
Age, years	72 [63-76]
SAPS II	61 [51-82]
SOFA (n=29)	8 [8-11]
Charlson co-morbidity score	
0	5 (13 %)
1	15 (40 %)
>1	16 (42 %)
Mac Cabe Score (n=30)	
Non-fatal disease	23 (64 %)
Ultimately fatal diseases	11 (30%)
Rapidly fatal diseases	2 (6 %)
Initial infection	
Pneumopathy	4 (10 %)
Abdominal infection	15 (40 %)
Urinary infection	4 (10 %)
Gastro-intestinal infection	2 (6 %)
Other	13 (34 %)
Type of admission	
Medical	20 (53 %)
Emergency Surgery	15 (40 %)
Elective Surgery	3 (8 %)
Microbiological documentation	
Gram negative	10 (26 %)
Gram positive	10 (26 %)
Other	1 (3 %)
Non-documented	17 (45 %)
Mortality at D28	13 (34 %)
Nosocomial infections	1 (2 %)
Lactate at D1 (mmol/L)	2.8 [1.7-5.4]
Lymphocytes at D3 (G/L)	1.05 [0.55-1.45]
mHLA-DR at D3 (AB/C)	8199 [3076-32790]

Supplementary Table 2 PCR assays characteristics

PCR design	Primers and probes sequences		Target exon	Product length (bp)
IL7R3	Forward	GCTCAGGATTAAGCCTATCG	5-7	
	Backward	CACTGGGATGTTGCCAACAC	7	131
	Probe	ATCATAAGAAGACTCTGGAACATCT	7	
IL7R7	Forward	GGAAGTGAATGGATCGCAGC	2	
	Backward	CAGAATGTCCAGACACAGTG	3	313
	Probe	CTGTGCTTTTGAGGACCCAGAT	2	

IL7R mRNA transcripts were named according to Ensembl release 87.

5. TCR activation mimics CD127^{low}PD-1^{high} phenotype and functional alterations of T lymphocytes from septic shock patients

Contexte

Le phénotype CD127^{low}PD-1^{high} a été décrit comme marqueur de l'épuisement des lymphocytes T dans le VIH, les infections chroniques et le cancer. Cependant, il n'a jamais été étudié dans le sepsis alors que les lymphocytes T de patients septiques présentent des altérations caractéristiques d'un état d'épuisement. De plus, le développement de ces altérations n'est que partiellement compris. L'objectif de cette étude est d'évaluer le phénotype CD127^{low}PD-1^{high} chez les patients en choc septique en lien avec les altérations des lymphocytes T et de reproduire ces altérations dans un modèle *ex vivo*.

Description de l'étude

Nous avons évalué la présence du phénotype CD127^{low}PD-1^{high} parmi les lymphocytes T de patients en choc septique et de volontaires sains du même âge. La proportion de lymphocytes T ayant ce phénotype était augmentée chez les patients. De plus, ces cellules exprimaient le marqueur d'activation tardif HLA-DR. Ces altérations phénotypiques étaient concomitantes à une altération de la production de cytokines suite à une activation *ex vivo*. L'ensemble de ces altérations ont été reproduites dans un modèle *ex vivo* d'activation de lymphocytes T de volontaires sains.

Conclusion

Ces résultats suggèrent que l'activation massive des lymphocytes T dans le choc septique pourrait participer au développement des altérations phénotypiques et fonctionnelles observées dans les lymphocytes T de patients. Le phénotype CD127^{low}PD-1^{high} pourrait être évalué comme biomarqueur de ces altérations. De plus, nous avons développé un modèle *ex vivo* d'altérations induites par l'activation pouvant permettre d'étudier de nouveaux aspects de la physiopathologie des altérations des lymphocytes T.

Cet article est soumis au Journal of Leukocyte Biology.

TCR activation mimics CD127^{low}PD-1^{high} phenotype and functional alterations of T lymphocytes from septic shock patients

Julie Mouillaux^{*†¶¶}, Camille Allam^{*†¶¶}, Morgane Gossez^{*‡}, Thomas Uberti[§], Benjamin Delwarde[§],
Jack Hayman^{*‡}, Thomas Rimmelé^{*§}, Julien Textoris^{*†§}, Guillaume Monneret^{*†‡}, Estelle
Peronnet^{*†¶¶}, Fabienne Venet^{*† § ¶¶}

*EA 7426 « Pathophysiology of injury-induced immunosuppression (PI3) » Lyon 1 University
/ Hospices Civils de Lyon / bioMérieux, Lyon France

† Joint Research Unit HCL-bioMérieux, Hôpital Edouard Herriot, Lyon, France

‡ Immunology Laboratory, Hospices Civils de Lyon, Hôpital Edouard Herriot, Lyon, France

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

¶¶ These authors contributed equally to this work

Corresponding author:

Dr Fabienne Venet

Immunology laboratory

Hôpital Edouard Herriot – Hospices Civils de Lyon

5 place d'Arsonval

69437 Lyon CEDEX 03- France

e-mail: fabienne.venet@chu-lyon.fr

Tel: +33472119546

Running title

CD127^{low}PD-1^{high} and T cell alterations in sepsis

Summary sentence

Increased CD127^{low}PD-1^{high} T cells and lymphocyte functional alterations in sepsis are reproduced *ex vivo* after TCR activation

Key words

Sepsis

Exhaustion

IL-7

Immunosuppression

Abbreviations

α CD2/3/28: α CD2/3/28 antibody coated beads

α CD3: α CD3 antibody coated beads

α CD3/28: anti-CD3/28 antibody coated beads

Ab: antibody

AF: Alexa Fluor

APC: Allophycocyanin

FITC: Fluorescein Isothiocyanate

HCV: Hepatitis C Virus

HIV: Human Immunodeficiency Virus

HV: Healthy Volunteers

IL-7R: IL-7 receptor

KRO: Krome Orange

MFI: median of fluorescence intensity

PB: Pacific Blue

PC: Phycoerythrin-Cyanin

PE: Phycoerythrin

PMA: Phorbol 12-Myristate 13-Acetate

sCD127: soluble CD127

SPADE: Spanning-tree Progression Analysis of Density-normalized Events

SOFA: Sequential Organ Failure Assessment

TCR: T Cell Receptor

Abstract

Sepsis is the leading cause of mortality for critically ill patients worldwide. Patients develop T lymphocyte dysfunctions leading to T cell exhaustion associated with increased risk of death. As IL-7 is currently tested in clinical trials to reverse these dysfunctions, it is important to evaluate the expression of its specific CD127 receptor on the T cell surface of septic shock patients. Moreover, the CD127^{low}PD-1^{high} phenotype has been proposed as a T cell exhaustion marker in chronic infections, but has never been evaluated in sepsis. The objective of this study was first to evaluate CD127 and more specifically the CD127^{low}PD-1^{high} phenotype in septic shock in parallel with functional T cell alterations. Secondly, we aimed to reproduce septic shock-induced T cell alterations in an *ex vivo* model. In patients, neither CD127 expression nor its corresponding mRNA transcript level were modified compared with normal values. However, the percentage of CD127^{low}PD-1^{high} T cells was increased while T cells also presented functional alterations. CD127^{low}PD-1^{high} T cells co-expressed HLA-DR, an activation marker, suggesting a role for T cell activation in the development of this phenotype. Indeed, TCR activation of normal T lymphocytes *ex vivo* reproduced the increase of CD127^{low}PD-1^{high} T cells and functional alterations following a second stimulation, as observed in patients. This suggests that TCR activation participates in the development of T cell phenotypic and functional alterations in septic shock. Furthermore, we provide an *ex vivo* model for the investigation of the pathophysiology of sepsis-induced T cell immunosuppression, and the testing of innovative immunostimulant treatments.

Introduction

Sepsis has recently been re-defined as a life-threatening organ dysfunction caused by a dysregulated host response to infection (1). It represents a major healthcare challenge with high incidence and mortality (2, 3). For example, it was recently showed that septic shock, *i.e.* the subset of sepsis associated with acute circulatory failure, is still associated with a crude mortality of over 45% (3). Sepsis is also associated with a high economic burden, in part due to long and costly hospital stays (4).

Septic patients develop severe immune dysfunctions affecting innate and adaptive immune responses, whose intensity and duration are associated with increased risk of death and nosocomial infections (5). Thus, innovative therapies targeting these dysfunctions are currently being evaluated in sepsis (6). More specifically, T lymphocyte dysfunctions occur during the immunosuppressive phase of sepsis and are the hallmark of an exhausted status, as described during chronic viral infections and cancer (7, 8). Indeed, most septic patients are lymphopenic (9), and the remaining T lymphocytes show a poor functional status. This includes decreased proliferation and cytokine production *ex vivo* and increased apoptosis (8, 10, 11), along with an increased expression of co-inhibitory receptors such as PD-1 (12, 13). Several clinical studies showed that these dysfunctions are associated with increased mortality or secondary infections (8, 12). Therefore, clinical trials evaluating immunoadjuvant therapies to target T cell alterations are ongoing in sepsis.

In particular, preclinical studies showed that IL-7 treatment reduced mortality in murine models of sepsis, and improved cell functionality upon *ex vivo* activation of septic shock patients T lymphocytes (10, 14, 15). A recent phase II clinical trial evaluating IL-7 in

septic shock patients showed that IL-7 treatment restored T cell count in patients with severe lymphopenia in the absence of any severe side effects (16).

IL-7 is a hematopoietic growth factor whose main role is to maintain T cell homeostasis and favor T cell functions (17). IL-7 activity is mediated through its binding to its specific IL-7 receptor (IL-7R). IL-7R is mainly expressed on T cell surface and is composed of two chains: an IL-7 specific chain (CD127), and a common receptor γ -chain (18). In respect to IL-7 functions, IL-7 receptor expression is tightly regulated at both protein and mRNA levels. For example, decreased CD127 expression on T cells has been described in several clinical contexts of T lymphocyte exhaustion, such as Human Immunodeficiency Virus (HIV), Hepatitis C Virus (HCV) infections, and cancer (19–21). In sepsis, preliminary data have been generated at the protein level, but the corresponding mRNA transcript expression has never been concomitantly studied (10, 12). In addition, the CD127^{low}PD-1^{high} T lymphocyte subset has been proposed as a T cell exhaustion marker in several clinical contexts (22). Indeed, CD127^{low}PD-1^{high} T cells were identified in chronic infections and in tumor infiltrating cells in cancer. These cells have been shown to display an exhausted functionality with poor cytokine production and proliferation (23–26). The occurrence of this specific CD127^{low}PD-1^{high} phenotype among T cells has never been specifically studied in septic shock patients.

Thus, in the present study, we aimed to evaluate CD127 expression on T cells at both protein and mRNA levels, and the development of CD127^{low}PD-1^{high} T cells in parallel with functional alterations of T lymphocytes in septic shock patients. We also aimed to evaluate the effect of T cell activation through T Cell Receptors (TCR) on the development of these phenotypic and functional alterations in an *ex vivo* model.

Material and methods

Patients and Healthy volunteers

This study was conducted in the Intensive Care Unit (ICU) of the Hôpital Edouard Herriot (Hospices Civils de Lyon, Lyon, France). This project was approved by our Institutional Review Board for Ethics (“Comité de Protection des Personnes Sud-Est II”), which waived the need for informed consent, as the study was observational and performed on residual blood, after the completion of routine follow-up (#IRB 11236). This study is registered at the French Ministry of Research and Teaching (#DC-2008-509), at the Commission Nationale de l’Informatique et des Libertés and on clinicaltrials.gov (NCT02803346). Non-opposition to inclusion in the study was registered for each patient. Septic shock patients were identified according to the diagnostic criteria of the American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine and to the new sepsis definition from 2016 (1, 27). Septic shock patients were excluded with regards to the following exclusion criteria: age<18, immunosuppressive disease (HIV, cancer, primary immune deficiency), immunosuppressive or corticoid treatment (dosage>10 mg/day or cumulative dose >700 mg equivalent prednisolone), aplasia as defined by number of circulating neutrophils < 500 cells/mm³ and extracorporeal circulation during the month prior ICU admission. Expression of HLA-DR on monocytes (mHLA-DR) was measured as previously described, and was expressed as the number of anti-HLA-DR antibodies bound per cell (AB/C) (28). Peripheral blood samples were collected at three time points after the onset of septic shock: from 24 h to 48 h (D1, n=15), 72 h to 96 h (D3, n=30) and 7 to 8 days (D7, n=10). Peripheral blood from healthy volunteers (HV) was provided by the “Etablissement Français du Sang”: 34 age and gender-matched HV

for the septic shock patients' cohort, and 13 HV for the *ex vivo* experiments. According to the standardized procedure for blood donation, written informed consent was obtained from HV and personal data for blood donors was anonymized at the time of blood donation, prior to blood transfer to our research lab.

T cell purification

Human T cells were isolated from HV and septic shock patients samples by antibody-based negative selection and density gradient centrifugation using a human T cell enrichment cocktail (Rosette SepTM, StemCell Technologies, Grenoble, France), as described in the manufacturer's instructions. Quality of T cell purification was systematically controlled. Purified cells were labeled with a Pacific Blue (PB) anti-CD3 antibody (Ab) (Beckman Coulter, Hialeah, FL, USA) and lithium dodecyl sulfate 751 as a marker of nucleated cells (Molecular Probes, Life Technologies, Saint Aubin, France). Sample purity was systematically greater than 95 %.

TCR activation and cell culture of T lymphocytes purified from healthy donors

T cells were purified as described above and cultured at 1×10^6 cells per mL in complete culture medium: RPMI 1640 (Eurobio, Les Ulis, France), supplemented with 10 % AB human serum (Life Technologies), 2 mM L-Glutamine (Eurobio), 1,000 IU/mL penicillin (Eurobio), 1,000 µg/mL streptomycin (Eurobio) and 200 µg/mL amphotericin B (Gibco, Thermofisher scientific, Wilmslow, UK). After overnight culture, T cells were seeded in a

complete culture medium in 48-well cell culture plates (Corning®, Corning, NY, USA), with or without α CD3/28 antibody coated beads (α CD3/28, T cell activation/expansion kit, Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA, 1:1 bead to cell ratio). T cells cultured with α CD3 antibody coated beads (α CD3) were used as a control condition, mimicking an incomplete activation (29). After five days of culture, HLA-DR, CD127 and PD-1 expressions were evaluated by flow cytometry. T cell functionality (cytokine production and proliferation) was then evaluated, as described below, in response to a secondary stimulation using α CD2/3/28 antibody coated beads (α CD2/3/28) (T cell activation/expansion kit, Miltenyi, 1:1 bead to cell ratio) for three days. This second stimulation step intended to mimic experiments performed when evaluating functionality of T lymphocytes from septic shock patients which are re-stimulated *ex vivo* to induce their effector functions. When testing IL-7 efficacy in improving T cell function *ex vivo*, recombinant human IL-7 (100 ng/mL, R&D systems, Minneapolis, MN, USA) was added simultaneously to α CD2/3/28 for the three days of the second activation.

CD127 mRNA level evaluation

Total RNA was extracted from T cells using an RNeasy kit (Qiagen, Hilden, Germany). RNA integrity was assessed with a RNA 6000 Nano kit (Agilent technologies, Santa Clara, CA, USA). Total RNA was reverse-transcribed into complementary DNA (cDNA) using a SuperScript®VILO™ cDNA synthesis kit (Life Technologies). A specific PCR assay amplifying the IL7R1 transcript coding for the transmembrane protein (Ensembl release 87) was used with the forward primer CTCTGTCGCTCTGTTGGTC targeting exon 6, the backward primer TCCAGAGTCTTCTTATGATCG targeting exon 7, and the probe CTATCGTATGGCCCAGTCTCC

targeting exon 7. Quantitative PCR was conducted on a LightCycler 480 instrument (Roche, Bale, Switzerland) using a LightCycler 480 probes master kit (Roche) according to the manufacturer's instructions. Thermocycling was performed in a final volume of 20 μ L containing 0.5 μ M of primers and 0.1 μ M of probe, with an initial denaturation step of 10 min at 95 $^{\circ}$ C, followed by 45 cycles of: 10 seconds denaturation at 95 $^{\circ}$ C, annealing for 29 seconds at 58-68 $^{\circ}$ C, and a 1 second extension period at 72 $^{\circ}$ C. The crossing point for each sample was calculated using the second derivative maximum method with the LightCycler software. Standard curves were generated by using five replicates of cDNA standards and were used to perform efficiency corrected quantification. Results were expressed as absolute concentrations (copy number / μ L) and normalized by the RNA quantity used for reverse transcription.

Flow cytometry

For septic shock patients and HV cohorts, flow cytometry surface stainings were performed using 50 μ L of whole blood. Erythrocytes were lysed with Versalyse solution (Beckman Coulter, Hialeah, FL, USA). Antibodies were purchased from Beckman Coulter: PB anti-CD4, Krome Orange (KRO) anti-CD8, Allophycocyanin (APC) anti-CD127, Phycoerythrin-Cyanin (PC) 7 anti-CD25, PC7 anti-CD3, Phycoerythrin (PE) anti-PD-1, PE anti-CD25, PC5.5 anti-PD-1, PC7 anti-CD127, Alexa Fluor (AF) 700 anti-CD8 and Fluorescein isothiocyanate (FITC) anti-CD38 Ab. KRO anti-HLA-DR Ab was purchased from Becton Dickinson (San Jose, CA, USA) and FITC anti-CCR7 Ab from R&D Systems. AF647 anti-FoxP3 Ab was purchased

from Biolegend (San Jose, CA, USA). To measure CD127 and PD-1 expressions, corresponding isotypic controls were purchased from Beckman Coulter.

In the *ex vivo* experiments of TCR activation of purified T cells from HV, 100 000 T lymphocytes were stained after five days of activation. Antibodies were purchased from Beckman Coulter: PB anti-CD4, FITC anti-CD8, PB anti-HLA-DR, APC anti-CD4, and KRO anti-CD8 Ab. PC7 anti-CD127 and APC anti-PD-1 Ab were purchased from Biolegend.

Flow cytometry assays were performed on a Navios cytometer (Beckman Coulter). Results were expressed as Medians of Fluorescence Intensity (MFI) for the measurement of CD127 on total CD4+ and CD8+ T lymphocytes, and as percentages of positive cells for all other parameters. Flow cytometry data were analyzed using Kaluza software (Beckman Coulter).

Septic shock patients' and healthy donors' T cell phenotypes were also evaluated through an unsupervised computational approach using the Spanning-tree Progression Analysis of Density-normalized Events (SPADE) algorithm as described by Qiu et al. (30). Analysis was performed using Cytobank (Santa Clara, CA, USA). Briefly, SPADE algorithm was used to cluster CD4+ and CD8+ T cells from patients and donors. This grouped cells that displayed a similar expression of CD127, CD38, HLA-DR, PD-1, FoxP3 and CD25 onto the same nodes. One tree containing four nodes was built for CD4+ T cells and one tree containing three nodes for CD8+ T cells. Relative expressions of each marker in each node were then compared by the MFI of cells included in the node and represented through a heatmap. These levels of expression were normalized (centered and reduced) and were

color-coded from blue (low expression) to red (high expression). Finally, the percentages of cells in each node were then compared between septic shock patients and HV.

Intracellular cytokine stainings

For septic shock patients and HV, intracellular cytokine contents were measured from a 50 μ L whole blood sample after 3 h of incubation at 37 °C with pre-coated tubes containing Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA), Ionomycin and Brefeldin A (Beckman Coulter). Intracellular staining was then performed using a PerFix-nc no centrifuge assay kit (Beckman Coulter) and tubes containing dry AF750 anti-CD3, PB anti-CD4, AF700 anti-CD8, FITC anti-IFN γ , PE anti-TNF α and PC7 anti-IL-2 Ab (DuraClone IF T Activation Tube, Beckman Coulter).

In the *ex vivo* experiments evaluating TCR activation of purified T cells from HV, T lymphocytes were incubated with Brefeldin A (Sigma, Saint Louis, MO, USA) at a final concentration of 10 μ g/mL during the last 4 h of the secondary stimulation step at 37 °C in 5 % CO₂. T cells were then stained for surface markers: PC7 anti-CD4 and KRO anti-CD8 Ab (Beckman Coulter). Samples were then fixed using lotest 3 fixing solution (Beckman Coulter) and permeabilized using BD perm/wash buffer (Becton Dickinson) according to the manufacturer's instructions. Samples were then stained for intracellular cytokines: FITC anti-IFN γ and PE anti-IL-2 Ab (Beckman Coulter), and APC anti-TNF α Ab (Biolegend). Results were expressed as percentages of positive cells for each cytokine or for the three cytokines among CD4+ and CD8+ T cells.

Proliferation assay

In the *ex vivo* experiments of TCR activation of T cells purified from HV, T cell proliferation was evaluated after three days of re-activation using α CD2/3/28 both with and without IL-7 (100 ng/ml) using a Click-it AF488 EdU Flow Cytometry assay kit (ThermoFisher Scientific), following the manufacturer's instructions and based on the protocol used in our lab (31). Cells were additionally stained with APC anti-CD4 and APC-AF750 anti-CD8 Ab from Beckman Coulter. Results were expressed as percentages of EdU positive cells (i.e. proliferating cells) among CD4+ or CD8+ T cells.

Statistical analysis

Results are presented as Tukey boxplots. Bottom and top of the box represent the first and third quartiles, respectively. The horizontal bar within the box represents the median value. Lower and higher extremities of the whiskers respectively represent the lowest datum still within 1.5 inter-quartile range of the lower quartile, and the highest datum still within 1.5 inter-quartile range of the upper quartile. Mann-Whitney unpaired tests were used to assess variations between septic shock patients and HV and Mann-Whitney paired tests were used to assess variations between *ex vivo* non stimulated and activated T cells purified from HV. Correlations were performed by calculating Spearman non-parametric coefficients. Statistical analyses were performed using R statistics software (R version 3.2.4). P-values lower than 0.05 were considered statistically significant.

Results

Septic shock patients' cohort

Thirty-one septic shock patients were included in the study. Their clinical and biological data are presented in Table 1. Twenty-three (73 %) were still alive after 28 days. The median SOFA score at admission was 8 and the median SAPS II score was 60, illustrating the severity of this cohort. The median lymphocyte count at D3 was 1.05 G/L which is below normal value (32). The median HLA-DR expression on monocytes was 7748 AB/C, characteristic of sepsis-induced immunosuppression (33).

Increased proportion of CD127^{low}PD-1^{high} T cells after septic shock

First, we evaluated CD127 surface expression on circulating CD4+ and CD8+ T cells from patients and HV (Fig. 1A). CD127 expression on the membranes of CD4+ and CD8+ T cells did not differ between septic shock patients and HV at any time-point. We only observed a slight but not significant decrease on CD8+ T cells at D3. The expression of cell surface CD127 corresponding transcript IL7R1 was similar between purified T cells from septic shock patients and HV (Fig. 1B). This result is in agreement with the absence of regulation of CD127 expression on T lymphocyte surface. Thus, membrane IL-7R expression is not strongly deregulated at both protein and transcript levels in septic shock patients' T cells compared to HV.

We then investigated whether CD127 expression might be deregulated on some specific T cell subpopulations. In particular, the CD127^{low}PD-1^{high} phenotype has been

proposed as a marker of T cell exhaustion in several clinical contexts (22, 34). We therefore measured PD-1 and CD127 expressions on circulating T cells from septic shock patients and HV. In accordance to the literature (13), we observed that PD-1 was significantly overexpressed on CD4+ T cells at D3 in septic shock patients compared to HV (Supplementary Fig. 1). Meanwhile, the percentage of CD127^{low}PD-1^{high} CD8+ T cells was significantly increased in septic shock patients at D3 and D7 compared to HV. A similar trend was observed in CD4+ T cells (Fig. 1C-D).

CD127^{low}PD-1^{high} T lymphocytes expressed HLA-DR, a late activation marker on T cells

In addition to being a marker of T cell exhaustion, PD-1 expression is known to be increased on T cells after activation (35). Thus we next evaluated whether this CD127^{low}PD-1^{high} phenotype was associated with increased expression of activation markers on T lymphocytes after septic shock. For this, we used an unsupervised computational approach using a SPADE algorithm to cluster cells in nodes according to their expressions of activation/exhaustion markers measured by flow cytometry. Cell surface marker expressions in each node in septic shock patients and HV is presented in Supplementary Figure 2. Cell surface expression of the different markers in each node are summarized in Figure 2A. First, it was observed that, among the different nodes, PD-1 was highly expressed only on node number 3 in both CD4+ and CD8+ T cells (Fig. 2A). Moreover, node number 3 in CD4+ and CD8+ T cells also displayed a CD127^{low} phenotype, thus corresponding to CD127^{low}PD-1^{high} T cells previously mentioned. Interestingly, this CD127^{low}PD-1^{high} phenotype was associated with a high expression of HLA-DR, a late activation marker on T lymphocytes, but not of

CD38 and CD25 (earlier activation markers) on both CD4+ and CD8 T cells (Fig. 2A) (36). Finally, the proportion of this specific T cell subpopulation in CD4+ T cells was significantly increased in septic shock patients compared to HV, and a similar trend was observed in CD8+ T cells (Fig. 2B). In contrast, no differences were found between patients and HV in the proportions of other nodes (data not shown).

We therefore show that the proportion of CD127^{low}PD-1^{high} T lymphocytes is increased after septic shock and that these cells concomitantly express high levels of HLA-DR, a late activation marker.

The increased proportion of CD127^{low}PD-1^{high} T cells occurred concomitantly with T lymphocytes alterations in septic shock patients

Next, we assessed whether the CD127^{low}PD-1^{high} phenotype occurred in septic shock patients in parallel with altered T cell functionality. Thus we measured intracellular IL-2, TNF α and IFN γ productions after the *ex vivo* activation of T lymphocytes from patients and HV. We observed that the percentage of IL-2 producing cells was significantly decreased among CD4+ T cells at D1 and D3, and among CD8+ T cells at D1 in septic shock patients in comparison to HV (supplementary Fig.3). In addition, the percentage of TNF α producing cells was also decreased among CD4+ T cells at D1, but not in CD8+ T cells after septic shock (Supplementary Fig.3). When evaluating the proportion of polyfunctional T cells, we showed that the proportion of triple positive CD4+ and CD8+ T cells (*ie* IL-2+TNF α +IFN γ + producing cells) was greatly reduced at D1 in septic shock patients compared with controls (Fig. 3A). This decrease was also observed in CD8+ T cells and persisted until D7 after the onset of

shock. In comparison, the proportion of triple negative CD4+ T cells (*i.e.* cells producing none of the three cytokines) was increased at D1 and D3, but no strong modifications were observed in CD8+ T cells (Fig. 3B). To note, we observed that the percentage of triple positive CD4+ T cells at D1 was inversely correlated with SOFA score ($r = -0.65$, $p\text{-value} = 0.02$) at admission.

This highlights that, concomitantly with the increased proportion of CD127^{low}PD-1^{high}HLA-DR^{high} lymphocytes, circulating T cells present functional alterations in septic shock patients.

Sepsis-induced CD127^{low}PD-1^{high} phenotype and functional T cells alterations are reproduced ex vivo after TCR activation

As CD127 and PD-1 are known to be regulated on T cells following activation, and in light of the high HLA-DR expression on CD127^{low}PD-1^{high} T cells, we hypothesized that T cell activation through TCR may play a role in the occurrence of this specific phenotype in septic shock patients' T cells. We also further questioned whether such initial activation could lead to functional alterations to a second TCR challenge as observed in septic shock. To test this hypothesis, we evaluated phenotype and functions of purified T cells from HV following *ex vivo* TCR activation.

Purified T cells from HV were cultured for five days with α CD3/28, mimicking complete TCR activation. CD3 stimulation alone, mimicking incomplete TCR activation (29), and non-stimulated T cells were used as a control. When evaluating the proportion of CD127^{low}PD-1^{high} T cells, we observed that this population was only induced in fully activated

CD4+ and CD8+ T cells, but not in T cells stimulated through CD3 alone or cells left untreated (Fig. 4A). Moreover, CD127^{low}PD-1^{high} T cells represented a large proportion of T cells in this experimental condition: around 30 % of CD4+ and 50 % of CD8+ T cells. We also observed that CD3/28 activated T cells expressed high levels of HLA-DR in comparison to non-stimulated T cells, or cells stimulated through CD3 alone (Fig. 4B). As a result, we show that a complete TCR activation *ex vivo* of purified T cells from healthy donors led to a strong induction of CD127^{low}PD-1^{high} T cells and HLA-DR expression, as observed in septic shock patients.

We then tested whether such activated T lymphocytes also presented with functional alterations to a second stimulation *ex vivo* as observed in patients. T cells activated *ex vivo* were subsequently activated with α CD2/3/28 and their cytokine production and proliferation measured (Fig. 5). As observed in septic shock patients, the percentages of triple positive IL-2+TNF α +IFN γ + T cells were markedly decreased in the α CD3/28 activated condition compared to the non-stimulated condition both in CD4+ and CD8+ (Fig. 5A) T cells. The percentages of triple negative IL-2-IFN γ -TNF α - T lymphocytes were also markedly increased in CD8+ T cells and with a strong trend in CD4+ T cells (Fig. 5B). Upon incomplete TCR activation with CD3 stimulation alone, the percentages of triple positive cells among CD4+ and CD8+ T cells were slightly decreased, whereas the percentages of triple negative cells were stable among CD4+ and slightly increased among CD8+ T cells in comparison to non-stimulated T cells. Regarding T lymphocyte proliferation, T cell activation through α CD3/28 stimulation induced a significant decrease in both CD4+ and CD8+ proliferating T cell following a second activation (Fig. 5C). Incomplete activation with α CD3 induced no major difference in the proliferation for both CD4+ and CD8+ T cells (Fig. 5C).

IL-7 partially restored T cell functionality in the ex vivo model of TCR activation

As IL-7 has been shown to efficiently restore sepsis-induced T cell proliferation in septic patients' T cells *ex vivo*, and in murine models of sepsis (10, 14), we tested IL-7 efficacy in restoring a functional status in the current model of TCR activation of T cells from HV. After the activation phase with α CD3/28, T cells purified from HV were re-stimulated *ex vivo* in the presence or absence of IL-7 and proliferation was measured.

We observed that the percentages of proliferating T cells were significantly increased in presence of IL-7 for both CD4+ and CD8+ T cells compared with T cells stimulated in the absence of this cytokine (Fig. 6). This signified that, in this model of TCR activation as observed in T cells from septic shock patients, IL-7 could improve T cell proliferation. This final result further supports the capacity of our model to reproduce *ex vivo* sepsis-induced intrinsic T cell alterations.

Overall, the present model of TCR activation of T cells from healthy donors reproduced *ex vivo* phenotypic and functional alterations of T cells, as described in septic shock patients. In addition, as observed in patients, decreased proliferation could be improved by IL-7 in this model.

Discussion

In the present study we showed that, despite the absence of a global regulation of CD127 expression on CD4+ and CD8+ T cells, the proportion of CD127^{low}PD-1^{high} cells among T lymphocytes was higher in patients than controls, as were T lymphocyte functional alterations. Interestingly, *ex vivo* TCR activation of purified T cells from HV also produced the increased proportion of CD127^{low}PD-1^{high} T cells and their strong functional alterations. In this model, as observed in patients (10), IL-7 could improve T cell proliferation. This suggests that initial T cell activation through TCR likely participates in sepsis-induced T cell immunosuppression. Moreover, we describe an *ex vivo* model to further investigate the pathophysiology of sepsis-induced T cell immunosuppression as well as to test innovative immunostimulant treatments *ex vivo*.

A recent reappraisal in sepsis pathophysiology has led to a significant gain of interest for the central role of acquired immunosuppression in this clinical context (1). Sepsis, and in particular septic shock, are associated with the development of immune dysfunctions affecting both innate and adaptive immune responses (6). Importantly, intensity and duration of sepsis-induced immune alterations are associated with increased risk of secondary infections and mortality, therefore identifying immune alterations as a novel therapeutic target in sepsis (8, 37). T lymphocyte response is highly dysfunctional in patients and a state of T cell exhaustion rapidly develops after sepsis (8, 11). Indeed, lymphocyte count, phenotype, and effector functions are markedly altered in patients and are associated with an increased risk of deleterious outcome (8, 37). In this context, IL-7 has been recently evaluated as an immuno-adjuvant therapy in sepsis and the first phase II clinical trial has just

been completed (16). This first study indicated the capacity of the IL-7 treatment in restoring T cell count in septic shock patients with severe lymphopenia, in absence of any severe side effect. Therefore it appears worthwhile to further delineate the expression of its specific cell surface receptor in septic shock patients.

Overall we did not observe any major regulation of membrane IL-7R expression on circulating T cells, at neither the protein nor the transcriptional level. This is consistent with results from Boomer et al. who also observed a similar CD127 surface expression in septic patients' T cells 24 h after the onset of shock compared to HV (12). The overall absence of membrane IL-7R regulation in patients strengthens the use of IL-7 in septic shock, and is consistent with preliminary data in preclinical models of sepsis which showed the efficacy of this molecule in restoring sepsis-induced T cell alterations (10, 14, 15, 38). Moreover, CD127 surface expression was reduced in septic shock patients' T cells following IL-7 treatment and could therefore be evaluated as a biomarker of the efficiency of IL-7 therapy (16).

This absence of global regulation of CD127 on total CD4+ and CD8+ T cells in septic shock patients does not preclude the regulation of this molecule on any specific T cell subpopulation. In particular, the CD127^{low}PD-1^{high} phenotype has been described in clinical contexts characterized by T cell exhaustion, such as cancer, HIV and HCV infections, but has never been evaluated in sepsis. For example, CD127^{low}PD-1^{high} T cells were identified in tumor infiltrating T lymphocytes from ovarian cancer patients and in liver infiltrating T lymphocytes from HCV patients (23, 24). Moreover, these CD127^{low}PD-1^{high} HCV specific T cells showed an altered proliferation upon *ex vivo* stimulation (25). Trautman et al. evaluated the functionality of CD8+ CD127^{low}PD-1^{high} HIV specific T cells (26). Upon *ex vivo* activation, these cells presented an altered production of IL-2 and TNF α . The culmination of

these results led to the description of the CD127^{low}PD-1^{high} phenotype as an exhaustion marker (22). Interestingly, we describe here for the first time a higher proportion of CD127^{low}PD-1^{high} T cells in septic shock patients compared to HV in both CD4+ and CD8+ T cells. This phenotype occurred in parallel with T cell functional alterations such as decreased cytokine production *ex vivo*, illustrating the development of T cell exhaustion in septic shock patients, as observed in chronic viral infections. This reinforces the similarities between T cell exhaustion in chronic viral infection and in sepsis. However, further studies should be initiated to better characterize this population in septic shock patients with regards to cellular functionality for example. Furthermore, as proposed in other clinical contexts, this suggests that the proportion of CD127^{low}PD-1^{high} T cells could be evaluated as a specific biomarker of T cell dysfunctions in septic shock.

In addition, we showed that these cells also expressed the late activation marker HLA-DR. A similar phenotype CD127^{low}PD-1^{high}HLA-DR^{high} was already described in tumor infiltrating T lymphocytes from metastatic melanoma patients, and was associated with an exhausted CD8+ T cell functionality (39). Meanwhile the mechanisms leading to T cell alterations are not fully understood. The co-expression of a late activation marker in parallel with a characteristic phenotype of T cell exhaustion suggests a potential role for T cell activation in the development of T cell alterations following septic shock. Similarly, Borken et al. recently showed that naïve T cells from chronic critically ill patients present an activated phenotype (40). In another study, expression of CD69, an activation marker, in T cells of septic patients increased twofold compared to non-septic critically ill patients (41). In other clinical contexts of exhaustion, chronic T cell activation occurred and could thus lead to T cell exhaustion (7). Furthermore, this potential role for T cell activation is supported by *ex vivo*

data. Indeed, we showed that after *ex vivo* TCR activation, and as observed in septic shock patients, the proportion of CD127^{low}PD-1^{high} T cells was markedly increased compared to unstimulated cells or cells stimulated through CD3 alone. Additionally, these cells were unresponsive to a second TCR activation showing decreased percentages of polyfunctional CD4⁺ and CD8⁺ T cells and decreased cell proliferation. Finally, the present model of TCR activation of purified T cells from HV reproduced the *ex vivo* phenotypic and functional alterations that were observed in septic shock patients.

To note, in our model, only full TCR activation through CD3/28 co-activation led to similar phenotypic and functional alterations to those observed in septic shock patients. Indeed, stimulation through CD3 alone did not reproduce these dysfunctions. In particular, the occurrence of CD127^{low}PD-1^{high} phenotype was only observed upon full TCR activation and in septic shock patients. Previous studies in mice and in humans showed that TCR crosslinking with anti-CD3 Ab in the absence of a co-stimulatory signal induced T cell anergy (44). While we observed that such experimental conditions led to altered T cell response, in particular in regard to cytokine production capacity, such a model of T cell anergy did not replicate sepsis-induced T lymphocyte alterations. This suggests that T cell alterations described in septic shock patients are probably more related to the phenomenon of exhaustion, as reported in chronic viral infections and cancer, than to anergy. These similarities should be further explored in dedicated experiments, for example by comparing T cell transcriptional profiles in these different conditions.

Finally, we showed that IL-7 improved T cell proliferation in our model, as observed *ex vivo* with T cells from septic patients (10, 15). This further reinforces the capacity of our model to recapitulate sepsis-induced intrinsic T cell alterations. Our model constitutes a tool

to monitor the efficiency of immuno-adjuvant treatments on T cells. To our knowledge, this is the first *ex vivo* model to reproduce phenotypic and functional T cell alterations observed in patients. This model could be used to investigate pathophysiological mechanisms leading to these alterations in septic shock. For example, a recent study from our group showed that altered metabolism plays a role in the sepsis-induced T cell alterations (45). This represents a potential pathophysiological mechanism to explore in the current *ex vivo* model. Preliminary data are already available in the literature. Patsoukis et al. showed that an increased expression of GLUT-1 following TCR activation was inhibited if T cells were pre-activated compared to non-pre-activated T cells (46). This is very similar to the absence of GLUT-1 induction upon *ex vivo* activation that is observed on T cells from septic shock patients (45).

In conclusion, we present here an evaluation of CD127 expression, and more specifically of CD127^{low}PD-1^{high} phenotype, in parallel with T cell activated/exhausted status in septic shock patients. We also developed an *ex vivo* model of TCR activation-induced T cell alterations. Our results suggest that T cell activation may participate in sepsis-induced T lymphocyte exhaustion in patients through the induction of CD127^{low}PD-1^{high} T cells. The massive initial T cell activation in sepsis could have a role in the onset of T cell exhaustion in a similar but accelerated way, as is the case in chronic T cell activation in cancer and chronic infections. Further comprehension of such activation-induced T cell exhaustion is now mandatory in order to improve our understanding of the pathophysiology of sepsis-induced T cell alterations, to develop innovative biomarkers and immuno-adjuvant therapies to restore normal lymphocyte functions in patients. Moreover, the CD127^{low}PD-1^{high} T cell subpopulation should be further investigated given its potential role as a specific marker of T cell immunosuppression in septic shock.

Authorship

JM and CA performed the experiments and the statistical analyses. JM, CA, EP and FV designed the experiments, analyzed and discussed the results, read and discussed the report. All authors drafted or revised critically the manuscript for important intellectual contents.

Acknowledgements

The authors would like to thank Elisabeth Cerrato and Anne Portier for their help in experimental procedures, Olivier Tabone for his advices on statistical analysis and data representation and Valérie Cerro and Justine Dubreuil for valuable help with the patient inclusion process in the Immunosepsis study. This work was supported by bioMérieux (JM, EP, JT) , Hospices Civils de Lyon (CA, MG, TR, TU, JH, BD, FV, GM) and Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (JM, Convention Industrielle de Formation par la Recherche convention 2015/060).

Conflict of interest disclosure

This work was supported by bioMérieux (JM, JT, EP), Hospices Civils de Lyon (CA, MG, TU, TR, JH, BD, GM, FV) and Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (Convention Industrielle de Formation par la Recherche convention 2015/060). JM, JT, GM, EP and FV work in a joint research unit, co-funded by the Hospices Civils de Lyon, bioMérieux and Lyon 1 university. FV, GM, EP and JT are co-inventors in three patents families covering IL-7 receptor biomarkers. This does not alter the authors' adherence to all the Journal of Leukocyte Biology policies on sharing data and materials.

References

1. Singer, M., C. S. Deutschman, C. W. Seymour, M. Shankar-Hari, D. Annane, M. Bauer, R. Bellomo, G. R. Bernard, J.-D. Chiche, C. M. Coopersmith, R. S. Hotchkiss, M. M. Levy, J. C. Marshall, G. S. Martin, S. M. Opal, G. D. Rubenfeld, T. van der Poll, J.-L. Vincent, and D. C. Angus. 2016. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 315: 801.
2. Angus, D. C., and T. van der Poll. 2013. Severe Sepsis and Septic Shock. *N. Engl. J. Med.* 369: 840–851.
3. Shankar-Hari M, Phillips GS, Levy ML, and et al. 2016. Developing a new definition and assessing new clinical criteria for septic shock: For the third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *JAMA* 315: 775–787.
4. Lagu, T., P. K. Lindenauer, M. B. Rothberg, B. H. Nathanson, P. S. Pekow, J. S. Steingrub, and T. L. Higgins. 2011. Development and validation of a model that uses enhanced administrative data to predict mortality in patients with sepsis. *Crit. Care Med.* 39: 2425–2430.
5. Hotchkiss, R. S., C. M. Coopersmith, J. E. McDunn, and T. A. Ferguson. 2009. Tilting toward immunosuppression. *Nat. Med.* 15: 496–497.
6. Hotchkiss, R. S., G. Monneret, and D. Payen. 2013. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* 13: 862–874.
7. Wherry, E. J. 2011. T cell exhaustion. *Nat. Immunol.* 12: 492–499.
8. Boomer, J. S., K. To, K. C. Chang, O. Takasu, D. F. Osborne, A. H. Walton, T. L. Bricker, S. D. Jarman, D. Kreisel, A. S. Krupnick, and others. 2011. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *Jama* 306: 2594–2605.

9. Drewry, A. M., N. Samra, L. P. Skrupky, B. M. Fuller, S. M. Compton, and R. S. Hotchkiss. 2014. Persistent Lymphopenia after Diagnosis of Sepsis Predicts Mortality. *Shock Augusta Ga* 42: 383–391.
10. Venet, F., A.-P. Foray, A. Villars-Méchin, C. Malcus, F. Poitevin-Later, A. Lepape, and G. Monneret. 2012. IL-7 Restores Lymphocyte Functions in Septic Patients. *J. Immunol.* 189: 5073–5081.
11. Chang, K., C. Svabek, C. Vazquez-Guillamet, B. Sato, D. Rasche, S. Wilson, P. Robbins, N. Ulbrandt, J. Suzich, J. Green, A. C. Patera, W. Blair, S. Krishnan, and R. Hotchkiss. 2014. Targeting the programmed cell death 1: programmed cell death ligand 1 pathway reverses T cell exhaustion in patients with sepsis. *Crit. Care* 18: R3.
12. Boomer, J. S., J. Shuherk-Shaffer, R. S. Hotchkiss, and J. M. Green. 2012. A prospective analysis of lymphocyte phenotype and function over the course of acute sepsis. *Crit. Care* 16: R112.
13. Tomino, A., M. Tsuda, R. Aoki, Y. Kajita, M. Hashiba, T. Terajima, H. Kano, and N. Takeyama. 2017. Increased PD-1 Expression and Altered T Cell Repertoire Diversity Predict Mortality in Patients with Septic Shock: A Preliminary Study. *PLoS One* 12: e0169653.
14. Unsinger, J., M. McGlynn, K. R. Kasten, A. S. Hoekzema, E. Watanabe, J. T. Muenzer, J. S. McDonough, J. Tschoep, T. A. Ferguson, J. E. McDunn, M. Morre, D. A. Hildeman, C. C. Caldwell, and R. S. Hotchkiss. 2010. IL-7 promotes T cell viability, trafficking, and functionality and improves survival in sepsis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 184: 3768–3779.
15. Venet, F., J. Demaret, B. J. Blaise, C. Rouget, T. Girardot, E. Idealisoa, T. Rimmelé, F. Mallet, A. Lepape, J. Textoris, and G. Monneret. 2017. IL-7 Restores T Lymphocyte

Immunometabolic Failure in Septic Shock Patients through mTOR Activation. *J. Immunol.* 199: 1606–1615.

16. Francois, B., R. Jeannet, T. Daix, A. H. Walton, M. S. Shotwell, J. Unsinger, G. Monneret, T. Rimmelé, T. Blood, M. Morre, A. Gregoire, G. A. Mayo, J. Blood, S. K. Durum, E. R. Sherwood, and R. S. Hotchkiss. 2018. Interleukin-7 restores lymphocytes in septic shock: the IRIS-7 randomized clinical trial. *JCI Insight* 3.

17. Minton, K. 2002. IL-7 fine-tunes T-cell homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* 2: 815–815.

18. Lundström, W., N. M. Fewkes, and C. L. Mackall. 2012. IL-7 in human health and disease. *Semin. Immunol.* 24: 218–224.

19. Paiardini, M., B. Cervasi, H. Albrecht, A. Muthukumar, R. Dunham, S. Gordon, H. Radziewicz, G. Piedimonte, M. Magnani, M. Montroni, S. M. Kaech, A. Weintrob, J. D. Altman, D. L. Sodora, M. B. Feinberg, and G. Silvestri. 2005. Loss of CD127 Expression Defines an Expansion of Effector CD8+ T Cells in HIV-Infected Individuals. *J. Immunol.* 174: 2900–2909.

20. Golden-Mason, L., J. R. Burton, N. Castelblanco, J. Klarquist, S. Benlloch, C. Wang, and H. R. Rosen. 2006. Loss of IL-7 receptor alpha-chain (CD127) expression in acute HCV infection associated with viral persistence. *Hepatology. Baltim. Md* 44: 1098–1109.

21. Vudattu, N. K., I. Magalhaes, M. Schmidt, V. Seyfert-Margolis, and M. J. Maeurer. 2007. Reduced numbers of IL-7 receptor (CD127) expressing immune cells and IL-7-signaling defects in peripheral blood from patients with breast cancer. *Int. J. Cancer* 121: 1512–1519.

22. McKinney, E. F., J. C. Lee, D. R. W. Jayne, P. A. Lyons, and K. G. C. Smith. 2015. T-cell exhaustion, co-stimulation and clinical outcome in autoimmunity and infection. *Nature* 523: 612–616.

23. Radziewicz, H., C. C. Ibegbu, M. L. Fernandez, K. A. Workowski, K. Obideen, M. Wehbi, H. L. Hanson, J. P. Steinberg, D. Masopust, E. J. Wherry, J. D. Altman, B. T. Rouse, G. J. Freeman, R. Ahmed, and A. Grakoui. 2007. Liver-Infiltrating Lymphocytes in Chronic Human Hepatitis C Virus Infection Display an Exhausted Phenotype with High Levels of PD-1 and Low Levels of CD127 Expression. *J. Virol.* 81: 2545–2553.
24. Matsuzaki, J., S. Gnjatic, P. Mhaweche-Fauceglia, A. Beck, A. Miller, T. Tsuji, C. Eppolito, F. Qian, S. Lele, P. Shrikant, L. J. Old, and K. Odunsi. 2010. Tumor-infiltrating NY-ESO-1-specific CD8+ T cells are negatively regulated by LAG-3 and PD-1 in human ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107: 7875–7880.
25. Bengsch, B., B. Seigel, M. Ruhl, J. Timm, M. Kuntz, H. E. Blum, H. Pircher, and R. Thimme. 2010. Coexpression of PD-1, 2B4, CD160 and KLRG1 on exhausted HCV-specific CD8+ T cells is linked to antigen recognition and T cell differentiation. *PLoS Pathog.* 6: e1000947.
26. Trautmann, L., L. Janbazian, N. Chomont, E. A. Said, S. Gimmig, B. Bessette, M.-R. Boulassel, E. Delwart, H. Sepulveda, R. S. Balderas, J.-P. Routy, E. K. Haddad, and R.-P. Sekaly. 2006. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat. Med.* 12: 1198–1202.
27. Levy, M. M., M. P. Fink, J. C. Marshall, E. Abraham, D. Angus, D. Cook, J. Cohen, S. M. Opal, J.-L. Vincent, G. Ramsay, and SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS. 2003. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit. Care Med.* 31: 1250–1256.
28. Demaret, J., A. Walencik, M.-C. Jacob, J.-F. Timsit, F. Venet, A. Lepape, and G. Monneret. 2013. Inter-laboratory assessment of flow cytometric monocyte HLA-DR expression in clinical samples. *Cytometry B Clin. Cytom.* 84: 59–62.

29. Schwartz, R. H. 1990. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* 248: 1349–1356.
30. Qiu, P., E. F. Simonds, S. C. Bendall, K. D. G. Jr, R. V. Bruggner, M. D. Linderman, K. Sachs, G. P. Nolan, and S. K. Plevritis. 2011. Extracting a cellular hierarchy from high-dimensional cytometry data with SPADE. *Nat. Biotechnol.* 29: 886–891.
31. Poujol, F., G. Monneret, A. Friggeri, T. Rimmelé, C. Malcus, F. Poitevin-Later, A. Pachot, A. Lepape, J. Textoris, and F. Venet. 2014. Flow cytometric evaluation of lymphocyte transformation test based on 5-ethynyl-2′deoxyuridine incorporation as a clinical alternative to tritiated thymidine uptake measurement. *J. Immunol. Methods* 415: 71–79.
32. Bisset, L. R., T. L. Lung, M. Kaelin, E. Ludwig, and R. W. Dubs. 2004. Reference values for peripheral blood lymphocyte phenotypes applicable to the healthy adult population in Switzerland. *Eur. J. Haematol.* 72: 203–212.
33. Monneret, G., and F. Venet. 2016. Sepsis-induced immune alterations monitoring by flow cytometry as a promising tool for individualized therapy. *Cytometry B Clin. Cytom.* 90: 376–386.
34. Legat, A., D. E. Speiser, H. Pircher, D. Zehn, and S. A. Fuertes Marraco. 2013. Inhibitory Receptor Expression Depends More Dominantly on Differentiation and Activation than “Exhaustion” of Human CD8 T Cells. *Front. Immunol.* 4: 455.
35. Duraiswamy, J., C. C. Ibegbu, D. Masopust, J. D. Miller, K. Araki, G. H. Doho, P. Tata, S. Gupta, M. J. Zilliox, H. I. Nakaya, B. Pulendran, W. N. Haining, G. J. Freeman, and R. Ahmed. 2011. Phenotype, function, and gene expression profiles of programmed death-1(hi) CD8 T cells in healthy human adults. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 186: 4200–4212.

36. Motamedi, M., L. Xu, and S. Elahi. 2016. Correlation of transferrin receptor (CD71) with Ki67 expression on stimulated human and mouse T cells: The kinetics of expression of T cell activation markers. *J. Immunol. Methods* 437: 43–52.
37. Chung, K.-P., H.-T. Chang, S.-C. Lo, L.-Y. Chang, S.-Y. Lin, A. Cheng, Y.-T. Huang, C.-C. Chen, M.-R. Lee, Y.-J. Chen, H.-H. Hou, C.-L. Hsu, J.-S. Jerng, C.-C. Ho, M.-T. Huang, C.-J. Yu, and P.-C. Yang. 2015. Severe lymphopenia is associated with elevated plasma interleukin-15 levels and increased mortality during severe sepsis. *Shock Augusta Ga* 43: 569–575.
38. Unsinger, J., C.-A. D. Burnham, J. McDonough, M. Morre, P. S. Prakash, C. C. Caldwell, W. M. Dunne Jr, and R. S. Hotchkiss. 2012. Interleukin-7 ameliorates immune dysfunction and improves survival in a 2-hit model of fungal sepsis. *J. Infect. Dis.* 206: 606–616.
39. Ahmadzadeh, M., L. A. Johnson, B. Heemskerk, J. R. Wunderlich, M. E. Dudley, D. E. White, and S. A. Rosenberg. 2009. Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood* 114: 1537–1544.
40. Borken, F., R. Markwart, R. P. Requardt, K. Schubert, M. Spacek, M. Verner, S. Rückriem, A. Scherag, F. Oehmichen, F. M. Brunkhorst, and I. Rubio. 2017. Chronic Critical Illness from Sepsis Is Associated with an Enhanced TCR Response. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 .
41. Schwulst, S. J., J. T. Muenzer, K. C. Chang, T. S. Brahmhatt, C. M. Coopersmith, and R. S. Hotchkiss. 2008. Lymphocyte phenotyping to distinguish septic from nonseptic critical illness. *J. Am. Coll. Surg.* 206: 335–342.
42. Venet, F., O. Filipe-Santos, A. Lepape, C. Malcus, F. Poitevin-Later, A. Grives, N. Plantier, N. Pasqual, and G. Monneret. 2013. Decreased T-cell repertoire diversity in sepsis: a preliminary study. *Crit. Care Med.* 41: 111–119.

43. Schmoeckel, K., S. Traffehn, C. Eger, C. Pötschke, and B. M. Bröker. 2015. Full Activation of CD4+ T Cells Early During Sepsis Requires Specific Antigen. *Shock Augusta Ga* 43: 192–200.
44. Nguyen, D. D., L. Beck, and H. L. Spiegelberg. 1995. Anti-CD3-Induced Anergy in Cloned Human Th0, Th1, and Th2 Cells. *Cell. Immunol.* 165: 153–157.
45. Venet, F., J. Demaret, B. J. Blaise, C. Rouget, T. Girardot, E. Idealisoa, T. Rimmelé, F. Mallet, A. Lepape, J. Textoris, and G. Monneret. 2017. IL-7 Restores T Lymphocyte Immunometabolic Failure in Septic Shock Patients through mTOR Activation. *J. Immunol.* 199: 1606–1615.
46. Patsoukis, N., K. Bardhan, P. Chatterjee, D. Sari, B. Liu, L. N. Bell, E. D. Karoly, G. J. Freeman, V. Petkova, P. Seth, L. Li, and V. A. Boussiotis. 2015. PD-1 alters T-cell metabolic reprogramming by inhibiting glycolysis and promoting lipolysis and fatty acid oxidation. *Nat. Commun.* 6: 6692.

Figure legends

Figure 1

CD127 expression and CD127^{low}PD-1^{high} T cells in septic shock patients and healthy volunteers (HV). (A) Cell surface expression of CD127 was measured by flow cytometry on septic shock patients' CD4+ (left panel) and CD8+ T cells (right panel) at day 1 (D1, n=15), day 3 (D3, n=21) and day 7 (D7, n=10) after the onset of shock in comparison with HV (n=20). Results are expressed as Median of Fluorescence Intensity (MFI) on selected CD4+ and CD8+ T cells. (B) Expression of IL7R1 mRNA transcript, coding for cell surface CD127, was measured using RT-qPCR extracted from RNA from purified T cells at D1 (n=13), D3 (n=20) and D7 (n=7) for septic shock patients in comparison with HV (n=18). (C) One example of a CD127 and PD-1 staining among CD8+ T cells in one HV and one septic shock patient are represented. (D) The percentage of CD127^{low}PD-1^{high} among CD4+ (left panel) and CD8+ T cells (right panel) at day 1 (D1, n=15), day 3 (D3, n=21) and day 7 (D7, n=10) after the onset of shock in comparison with HV (n=20) is represented. Data are presented as Tukey boxplots. Mann-Whitney tests were used to compare values between septic shock patients and HV, *p<0.05.

Figure 2

SPADE analysis. T cell phenotype was evaluated using a SPADE algorithm based on the expression of different markers measured by flow cytometry on whole blood samples from septic shock patients at day 3 after the onset of shock (D3, n=17) and in HV (n=14). CD4+ and CD8+ T cells from patients and donors were clustered in nodes based on their similarities of expressions of CD127, CD38, HLA-DR, PD-1, FoxP3 and CD25. One tree containing four nodes was built for CD4+ T lymphocytes and one tree containing three nodes for CD8+ T cells. (A)

Both in HV and patients, relative expressions for each marker in each node based on the Median of Fluorescence Intensity (MFI) were compared and represented through a heatmap. These levels of expression were normalized (centered and reduced) and were color-coded from blue (low expression) to red (high expression). Node 3 corresponding to CD127^{low}PD-1^{high} has been highlighted in both CD4⁺ and CD8⁺ T cells. (B) The proportion of node 3 is represented among CD4⁺ (left panel) and CD8⁺ T cells (right panel) for septic shock patients and HV. Data are presented as Tukey boxplots. Mann-Whitney tests were used to compare values between septic shock patients and HV, *p<0.05.

Figure 3

Cytokine production in septic shock patients' T cells compared to healthy volunteers (HV). Intracellular IL-2, TNF α and IFN γ staining was performed after three hours of T cell activation using PMA/Ionomycin in whole blood samples from septic shock patients at day 1 (D1, n=14), day 3 (D3=18) and day 7 (D7, n=10) after the onset of shock in comparison with HV (n=18). The percentages of polyfunctional cells simultaneously producing the three cytokines (A) or none of the three cytokines (B) are represented among CD4⁺ (right panel) and CD8⁺ (left panel) T cells. Data are presented as Tukey boxplots. Mann-Whitney tests were used to compare values between septic shock patients and HV, *p<0.05, **p<0.01.

Figure 4

Expansion of CD127^{low}PD-1^{high} T cells in an *ex vivo* model of TCR activation of purified T cells from healthy volunteers (HV, n=9). Purified T cells were activated with anti-CD3/28 antibody coated beads (α CD3/28, 1:1 bead to cell ratio), anti-CD3 antibody coated beads (α CD3, 1:1

bead to cell ratio), or not stimulated (NS) during five days. The percentage of CD127^{low}PD-1^{high} (A) as well as the percentage of HLA-DR (B) positive cells were measured by flow cytometry among CD4+ (left panel) and CD8+ T cells (right panel). Data are presented as Tukey boxplots. Mann-Whitney paired tests were used to compare values between non-stimulated and activated conditions, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Figure 5

Altered T cell functionality in an *ex vivo* model of TCR activation of purified T cells from healthy volunteers (HV, n=9). Purified T cells were activated with anti-CD3/28 antibody coated beads (α CD3/28, 1:1 bead to cell ratio), anti-CD3 antibody coated beads (α CD3, 1:1 bead to cell ratio) or not stimulated (NS) for five days. T cells were then activated a second time with anti-CD2/3/28 antibody coated beads (α CD2/3/28, 1:1 bead to cell ratio) for 3 days. Intracellular IL-2, TNF α and IFN γ staining was performed. The percentages of cells producing the three cytokines simultaneously (A) or none of the three cytokines (B) are represented for CD4+ (left panel) and CD8+ T cells (right panel). (C) The percentages of proliferating cells are represented for CD4+ (left panel) and CD8+ T cells (right panel). Data are presented as Tukey boxplots. Mann-Whitney paired tests were used to compare values between non-stimulated and stimulated conditions for, *p<0.05, **p<0.01.

Figure 6

Effect of IL-7 treatment on T cell proliferation in an *ex vivo* model of TCR activation of purified T cells from healthy volunteers (HV, n=9). T cell proliferation was evaluated on α CD3/28 pre-activated T cells after three days of activation using α CD2/3/28 antibody

coated beads in the presence and absence of IL-7. Results are presented for CD4+ (left panel) and CD8+ T cells (right panel). Mann-Whitney paired tests were used to compare values with IL-7 to those without, * $p < 0.05$.

Figure 1

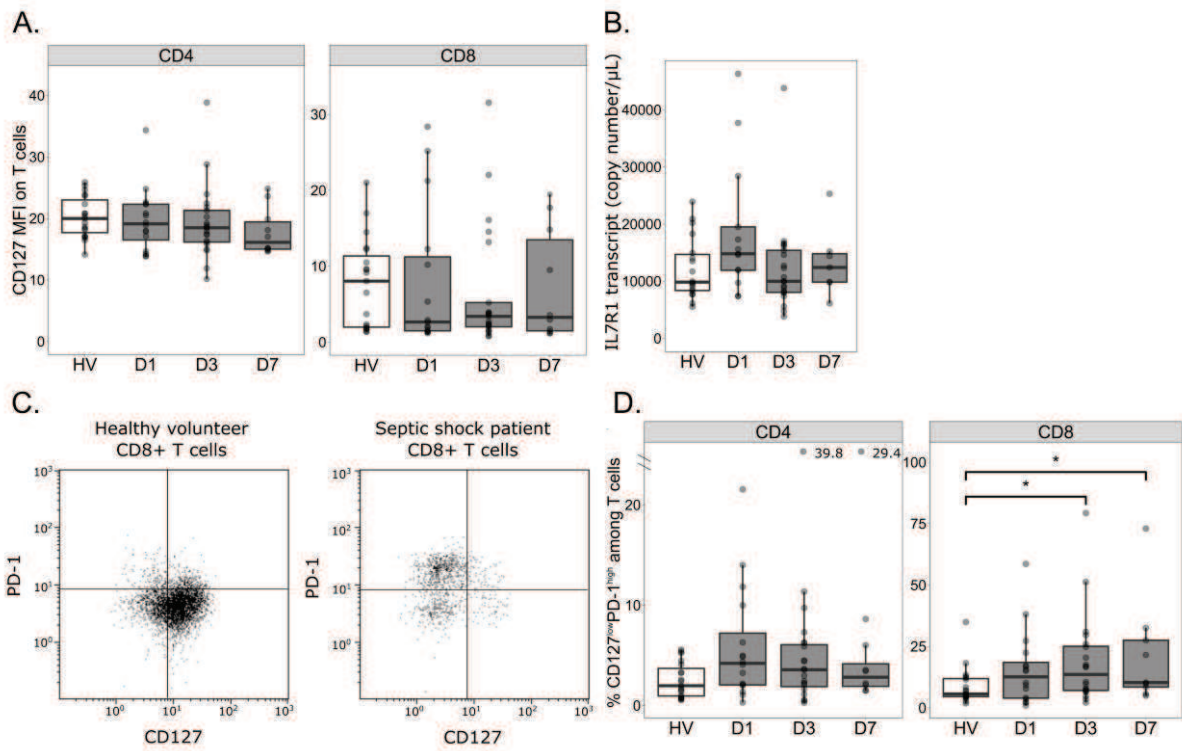


Figure 2

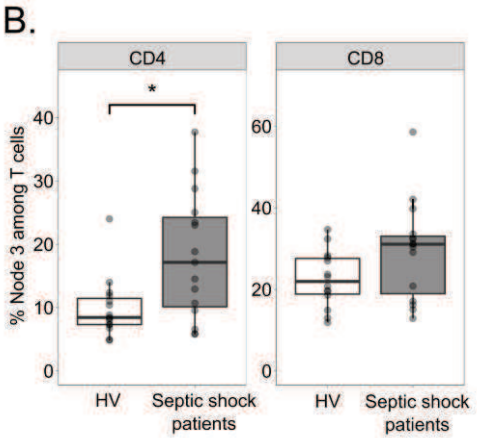
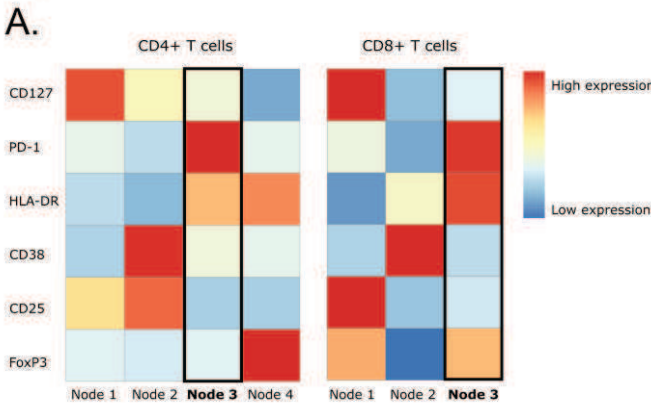


Figure 3

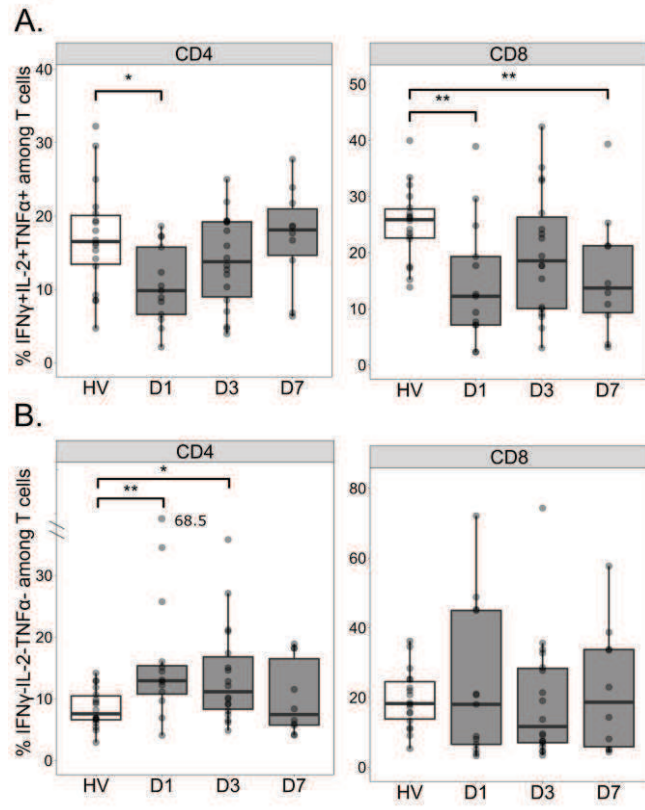
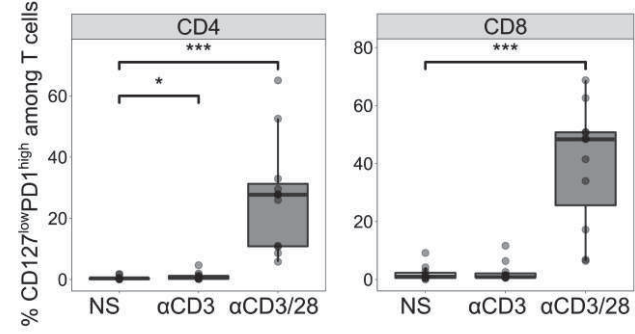


Figure 4

A.



B.

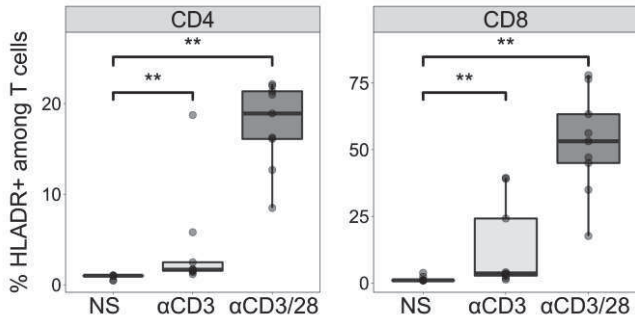
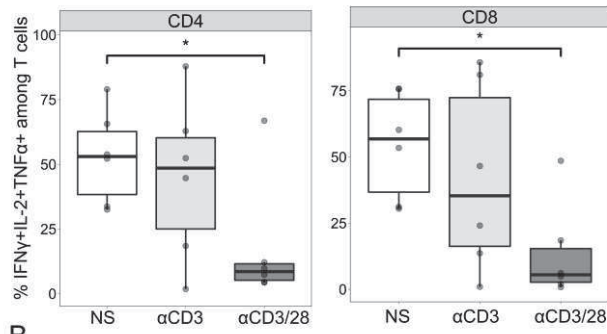
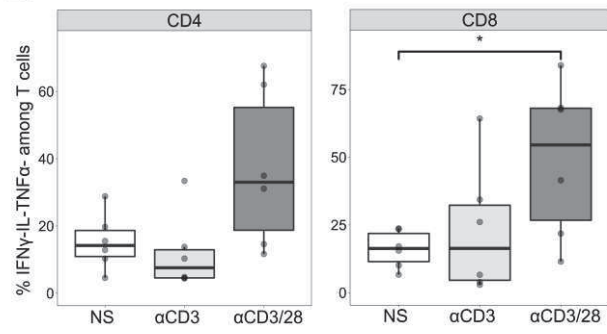


Figure 5

A.



B.



C.

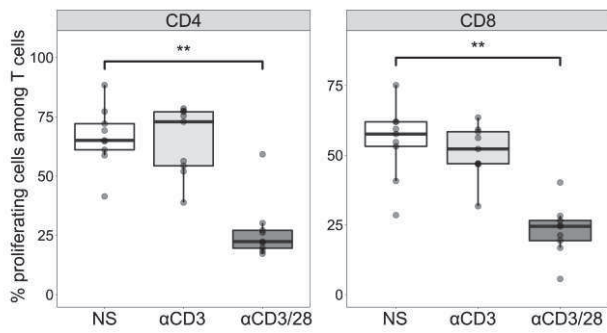


Figure 6

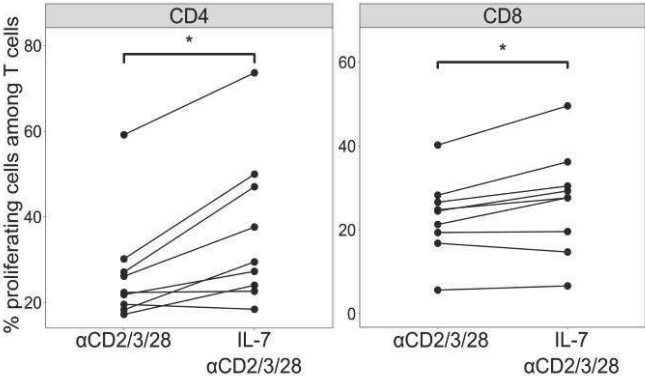
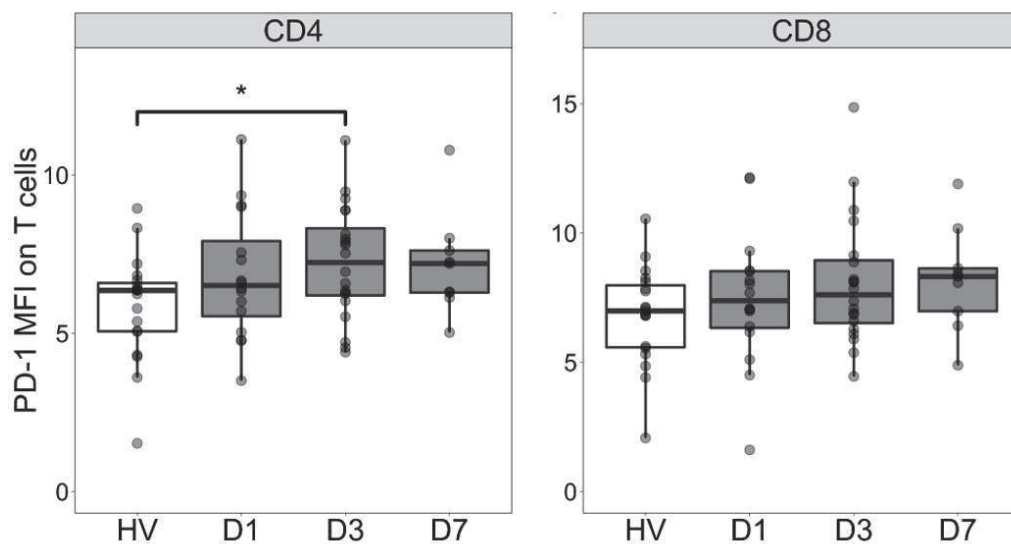


Table I. Clinical characteristics of septic shock patients. Blood samples were obtained from 31 septic shock patients after the onset of shock. For clinical parameters, categorical data are presented as numbers of cases and percentages of the total population in brackets. Continuous data and biological parameters are presented as medians and interquartile ranges [Q1-Q3]. SAPS II (Simplified Acute Physiology Score II) and Mac Cabe score were calculated on admission. SOFA (Sequential Organ Failure Assessment) score was measured after 24h of ICU stay. mHLA-DR (AB/C): number of anti-HLA-DR antibodies bound per monocyte.

Parameters	Septic shock patients (n=31)
Sexe, M	19 (62 %)
Age, years	72 [63.5-76.5]
SAPS II	60 [49.5-75.5]
SOFA (n=29)	8 [8-11]
Charlson co-morbidity score	
0	4 (13 %)
1	13 (42 %)
>1	14 (45 %)
Mac Cabe Score (n=30)	
Non-fatal disease	19 (63 %)
Ultimately fatal diseases	9 (30 %)
Rapidly fatal diseases	2 (7 %)
Initial infection	
Pneumopathy	1 (3 %)
Abdominal infection	12 (39 %)
Urinary infection	4 (13 %)
Gastro-intestinal infection	2 (6 %)
Other	12 (39 %)
Type of admission	
Medical	19 (61.5 %)
Emergency Surgery	11 (35.5 %)
Elective surgery	1 (3 %)
Microbiological documentation	
Gram negative	8 (26 %)
Gram positive	8 (26 %)
Other	1 (3 %)
Non-documented	14 (45 %)
Mortality at D28	8 (27 %)
Nosocomial infections	1 (3 %)
Lactate at D1 (mmol/L) (n=19)	2.5 [1.65-3.2]
Lymphocytes at D3 (G/L) (n=21)	1.05 [0.55-1.45]
mHLA-DR at D3 (AB/C)	7748 [2987-12532]

Supplementary Figure 1

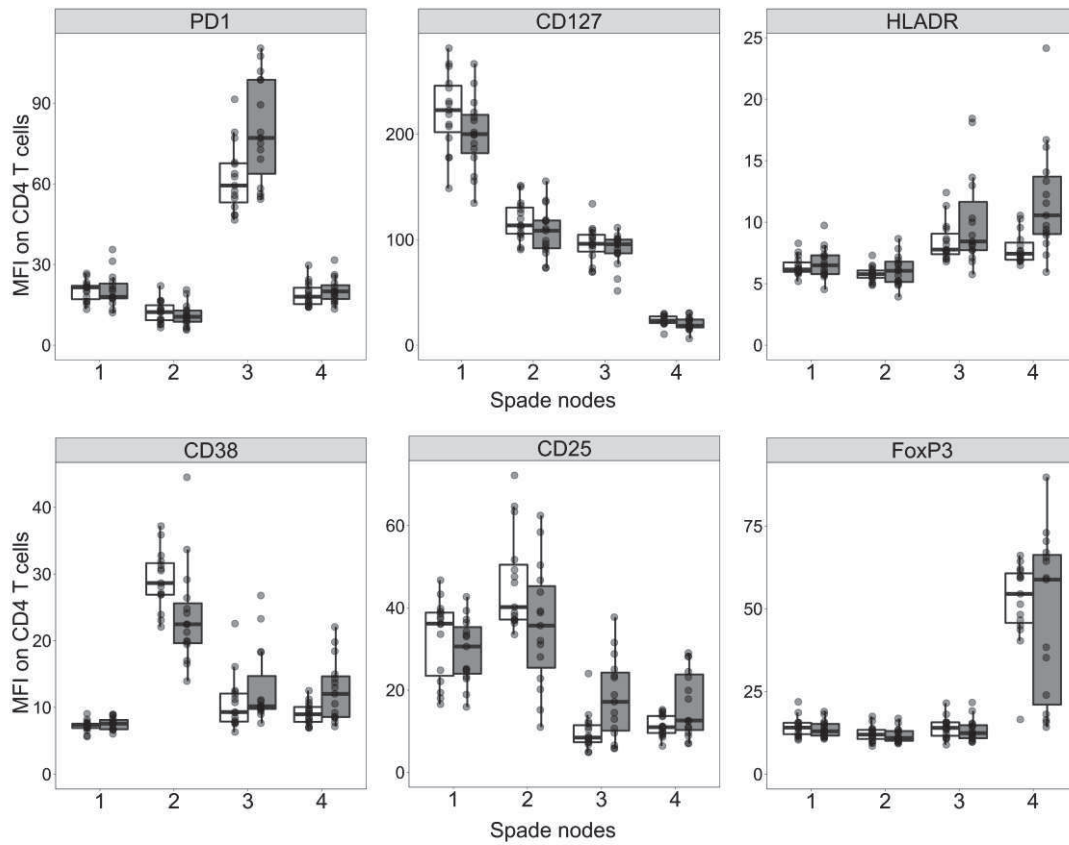
PD-1 expression in septic shock patients T cell in comparison to healthy volunteers (HV). Cell surface expression of PD-1 was measured on septic shock patients' CD4+ (left panel) and CD8+ T cells (right panel) at day 1 (D1, n=15), day 3 (D3, n=21) and day 7 (D7, n=10) after the onset of shock in comparison with HV (n=20). Results are expressed as Median of Fluorescence Intensity (MFI) on selected T cell subpopulation. Mann-Whitney tests were used to compare values between septic shock patients and HV, *p<0.05.



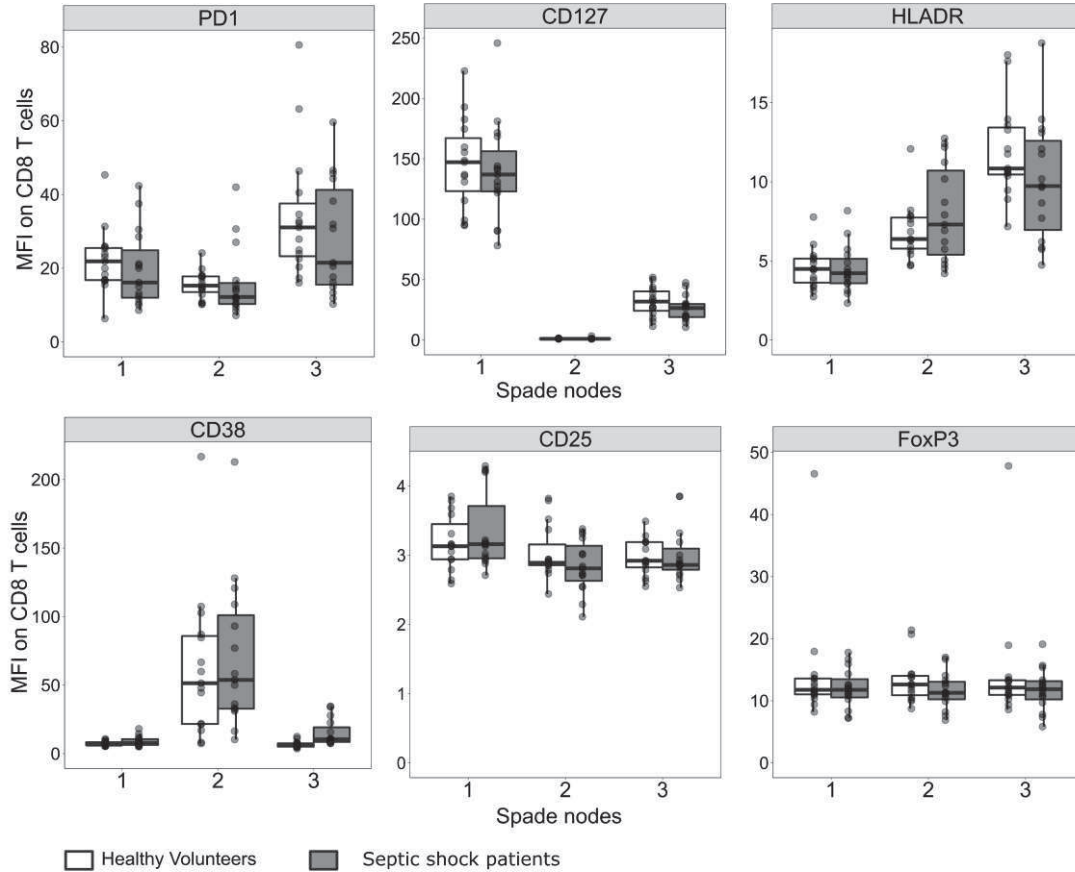
Supplementary Figure 2

Markers expression on each node. T cell phenotype was evaluated using a SPADE algorithm based on the expression of different markers measured by flow cytometry on whole blood samples in septic shock patients at day 3 after the onset of shock (D3, n=17) and in HV (n=14). CD4+ and CD8+ T cells from patients and donors were clustered in nodes based on their similarities of expression of PD-1, CD127, HLA-DR, CD38, CD25 and FoxP3 markers. One tree containing four nodes was built for CD4+ T cells and one tree containing three nodes for CD8+ T cells. The Median of Fluorescence Intensity (MFI) of the different markers for each node are represented on CD4+ (A) and CD8+ (B) T cells. Data are presented as Tukey boxplots.

A.



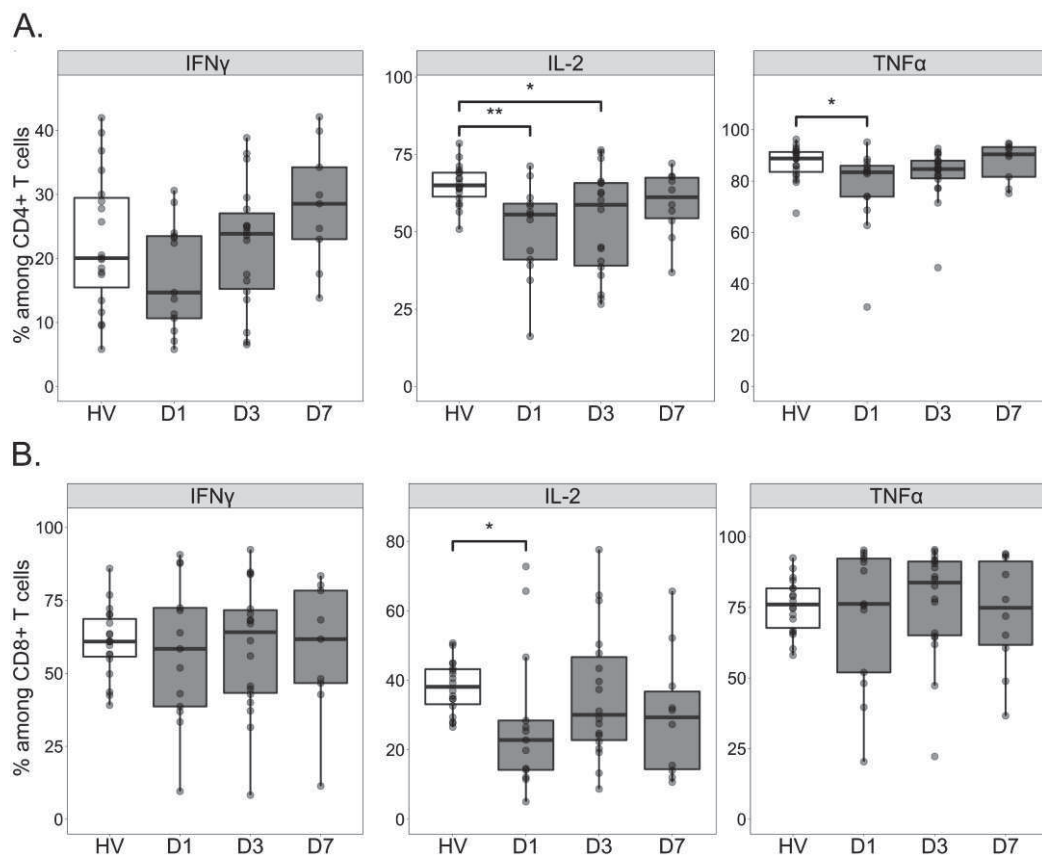
B.



□ Healthy Volunteers ■ Septic shock patients

Supplementary Figure 3

Septic shock patients T cell cytokine production in comparison to healthy volunteers (HV). Intracellular IL-2, TNF α and IFN γ staining was performed after 3 h of T cell activation using PMA/Ionomycin in whole blood samples from septic shock patients at day 1 (D1, n=14), day 3 (D3=18) and day 7 (D7, n=10) after the onset of shock in comparison with HV (n=18). The percentages of cells producing each cytokine (IFN γ : left panel, IL-2: middle panel and TNF α right panel) are represented among CD4+ (A) and CD8+ T cells (B). Data are presented as Tukey boxplots. Mann-Whitney tests were used to compare values between septic shock patients and HV, *p<0.05, **p<0.01.



6. An optimized protocol for adenosine triphosphate quantification in T lymphocytes of lymphopenic patients

Contexte

Dans plusieurs contextes cliniques, la mesure de la concentration d'ATP dans les lymphocytes T a été proposée comme biomarqueur du statut immunitaire et prédictif d'infections secondaires. Cependant, l'utilisation d'un tel biomarqueur chez des patients lymphopéniques nécessite une adaptation du protocole de dosage.

Description

Nous avons optimisé les conditions expérimentales du protocole de mesure de la concentration d'ATP à partir de lymphocytes T de volontaires sains. Nous avons évalué l'impact du type d'anticoagulant de l'échantillon sanguin, l'effet des cycles de congélation/décongélation, la dilution optimale du tampon et le mélange du réactif et de l'échantillon. Nous avons également amélioré le délai d'obtention des résultats en diminuant le temps d'incubation de 8 heures à 30 minutes. Nous avons déterminé la dose optimale de stimulant permettant d'évaluer l'augmentation de la concentration d'ATP suite à une activation des lymphocytes T. Enfin, nous avons déterminé que le nombre minimal de lymphocytes T nécessaire pour cette mesure était de 50 000 cellules, une valeur compatible avec la lymphopénie présente dans certains contextes cliniques.

Conclusion

Les conditions expérimentales de la mesure de l'ATP ainsi optimisées permettent l'analyse d'échantillons cliniques de patients lymphopéniques et l'étude de l'association entre le métabolisme des lymphocytes et l'altération de leur phénotype et de leur fonctionnalité.

Cette article a été publié dans The Journal of Immunological Methods en 2016.



Research paper

An optimized protocol for adenosine triphosphate quantification in T lymphocytes of lymphopenic patients



Thibaut Girardot^{a,b,1}, Julie Mouillaux^{a,1}, Estellie Idealisoa^a, Fanny Poujol^a, Christelle Rouget^{a,b}, Thomas Rimmelé^{a,b}, Guillaume Monneret^{a,c}, Julien Textoris^{a,b}, Fabienne Venet^{a,c,*}

^a EA 7426 (Université Claude Bernard Lyon 1 – Hospices Civils de Lyon – bioMérieux) Joint Research Unit “Pathophysiology of Injury-Induced Immunosuppression – PI3”, Hôpital Edouard Herriot, Lyon, France

^b Hospices Civils de Lyon, Anesthesia and Critical Care Medicine Department, Hôpital Edouard Herriot, Lyon, France

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 July 2016

Received in revised form 20 September 2016

Accepted 5 October 2016

Available online 6 October 2016

Keywords:

ATP content

T lymphocyte

Protocol optimization

Lymphopenia

ABSTRACT

In several clinical contexts, the measurement of ATP concentration in T lymphocytes has been proposed as a biomarker of immune status, predictive of secondary infections. However, the use of such biomarker in lymphopenic patients requires some adaptations in the ATP dosage protocol. We used blood from healthy volunteers to determine the optimal experimental settings. We investigated technical aspects such as the type of anticoagulant for blood sampling, the effect of freeze and thaw cycles, the reagent and sample mixing sequence, and the optimal dilution buffer. We also shortened the incubation time to 8 h, and even showed that a 30 min incubation may be sufficient. To evaluate the ATP rise upon lymphocyte activation, the optimal dose of stimulant was defined to be 4 µg/mL of phytohaemagglutinin. Lastly, we determined that the number of T cells needed for this measurement was as low as 50,000, which is compatible with the existing lymphopenia in clinical settings. This optimized protocol appears ready to be assessed in lymphopenic patients to further investigate the interconnection between T lymphocyte metabolism and impaired phenotype and functions.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Warburg described 60 years ago metabolic disturbances in cancer cells (Warburg, 1956). Over the past decades, the central role of cellular metabolism in cell and organ function has become progressively understood, particularly in immune cells (Buck et al., 2015). Metabolic profile seems to underlie the polarization (Gerriets and Rathmell, 2012; Jha et al., 2015) and the level of activation (Delgoffe and Powell, 2015) of these cells.

T lymphocytes play a central role in the immune response to any type of aggression. Interestingly, preferred metabolic pathways for energy production and biosynthesis of cellular elements differ between naive, activated, and memory T cells (MacIver et al., 2013). Indeed,

their effector functions are sustained by a potent activation of their metabolic machinery (Maciolek et al., 2014; Pearce et al., 2013). Consequently, a measurement of T cells metabolic profile could be a surrogate marker of lymphocyte function and global immune competence.

Adenosin-5'-tri-phosphate (ATP) is one of the most important energetic substrates. The high amount of energy needed to cover effector functions of activated T lymphocytes is supplied by an important up-regulation of the cell metabolic machinery, which can be approached by the measurement of intracellular ATP concentration. In solid organ transplantation, intra-lymphocyte ATP concentration is associated with adverse events, from acute rejection to opportunistic infections (He et al., 2013; Kobashigawa et al., 2010; Kowalski et al., 2003, 2006).

Lymphopenia is common among hospitalized patients, especially in the intensive care unit (Castelino et al., 1997; Grossbard et al., 1984), and is associated with higher mortality (Drewry et al., 2014; Heffernan et al., 2012; Vulliamy et al., 2015) and higher risk of infection (Drewry et al., 2014; Felmet et al., 2005; Gouel-Chéron et al., 2012; Rajan and Sleight, 1997). Moreover, the small amount of blood sampled

* Corresponding author at: Laboratoire Commun de Recherche Hospices Civils de Lyon – bioMérieux, Hôpital Edouard Herriot, Pavillon P, 5^{ème} étage, 5, place d'Arsonval, 69003 Lyon, France.

E-mail address: fabienne.venet@chu-lyon.fr (F. Venet).

¹ The two co-first authors contributed equally to the work.

for laboratory tests limits the quantity of lymphocytes available for ATP measurement. We thus decided to adapt the protocol for ATP measurements in lymphocytes to these constraints.

2. Materials and methods

2.1. Patient population and ethical concerns

Blood from healthy donors ($n = 12$) was provided by the French blood bank institution ("Etablissement Français du Sang"). All donors gave their explicit written consent for the use of their blood for biomedical research purposes, according to local legislation. Blood samples were collected in EDTA or heparinized tubes, anonymized upon donation, and sent to the laboratory at room temperature, to be processed on the same day.

2.2. T cell purification from whole blood

Antibody-based negative selection was used to purify T lymphocytes from healthy donors' whole blood according to manufacturer's instructions. A human T cell enrichment antibody cocktail (RosetteSep™, StemCell Technologies, Grenoble, France) was added to the blood sample. This antibody cocktail contains a mix of anti-CD16 (present on NK cells, monocytes, macrophages and neutrophils), anti-CD19 (B lymphocytes), anti-CD36 (platelets, red blood cells, monocytes), anti-CD56 (NK cells), and anti-CD66b (granulocytes) antibodies. After a 10-min period of incubation, the mix was diluted with an equal volume of DPBS 1X (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 1X, Gibco Life Technologies-Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), then carefully layered over a density gradient medium (Ficoll-Paque PLUS, GE Healthcare, Little Chalfon, UK) in specially designed tubes with insert (SepMate™ tubes, StemCell Technologies).

The tubes were centrifuged at 1200g for 10 min at room temperature (RT), leading to the isolation of a ring enriched with T lymphocytes localized in the plasma-Ficoll interface, which was collected by pipetting. Residual red blood cells were lysed with Versalys™ (Beckman Coulter, Brea, CA, USA).

2.3. Cell count and purity verification after purification procedure

At the end of the purification process, cells were counted with a flow cytometer (Navios, Beckman Coulter) using LDS (LDS 751, Molecular Probes, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and calibration beads (Flow-Count™ Fluorospheres, Beckman Coulter), which concentration is known.

Quality of T cell purification was systematically controlled. Purified cells were labeled with an anti-human CD3-Pacific Blue antibody (IOTest®, Beckman Coulter) and LDS. Sample was then processed in a flow cytometer (Navios, Beckman Coulter), and double positive (CD3+/LDS+) cells were gated. The mean sample purity was $93.6 \pm 3.5\%$ of T lymphocytes.

2.4. Ex vivo culture and stimulation

Purified T cells were diluted in RPMI (Roswell Park Memorial Institute) complete medium to achieve a concentration of 1.10^6 cells/mL. RPMI complete medium is a RPMI 1640 medium (Eurobio, Les Ulis, France), supplemented with 10% human AB serum (Life Technologies), 200 µg/mL amphotericin B (Gibco), 1000 IU/mL penicillin (Eurobio), 1000 µg/mL streptomycin (Eurobio), and 200 mM L-glutamine (Eurobio).

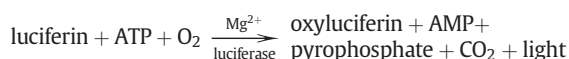
The obtained cellular solution was then distributed into two wells of a low-binding Costar® 24-wells cell culture plate (Corning®, Corning, NY, USA). One well was added with PHA (phytohaemagglutinin, Remel-Oxoid, Dardilly, France) at concentrations ranging from 0.2 to 4 µg/mL, or with anti-CD2/CD3/CD28 antibody-coated beads (T cell

activation/expansion kit, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) at concentrations ranging from 0.5 to 2 beads per cell, to represent the stimulated condition, while the other well represented the unstimulated condition. Finally, the cell culture plate was incubated in standard conditions (37 °C, 5% CO₂) for a duration ranging from 0.5 to 24 h.

Every cell culture experiments presented in this study were performed on freshly purified cells. The effect of a freeze and thaw cycle on T cell capacity to produce ATP has never been evaluated in this study.

2.5. ATP quantitative determination

After incubation, cells were aliquoted to different cell numbers (ranging from 25,000 to 100,000), then lysed (IP lysis buffer, Pierce, Thermo Fisher Scientific). An ATP determination kit (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) based on a bioluminescent method was used for measurement of intra-lymphocyte ATP concentration. In the presence of ATP, firefly luciferase catalyzes the conversion of its substrate D-luciferin into oxyluciferin, producing light in an ATP-proportional manner, as shown in the reaction equation below.



A reaction mix prepared according to manufacturer's instructions was mixed with the samples. The emitted light was measured with a spectrophotometer (Victor™ X4 Multilabel Plate Reader, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) at a wavelength of 560 nm for 1 s. Samples and standard curves were always processed in duplicates. Means of duplicates were used to calculate ATP concentration in samples and standards. The mean measured luminescence of the blank, corresponding to the background luminescence, was subtracted to all measurements. ATP concentrations were calculated from the standard curve (ranging from 0 to 1000 nM of ATP), generated from the ATP standard according to manufacturer's instructions.

2.6. Results analysis

Unless specified, results are expressed as means of the duplicates for each donor or points of the standard curves. Statistical analysis was performed with R Studio® software (RStudio Inc., Boston, MA, USA). Comparisons between groups used non parametric tests, such as Wilcoxon, Kruskal-Wallis and post-hoc Nemenyi tests, when appropriate. Paired tests were performed for matched data. Repeated measures ANOVA test was used to investigate buffer effect across time. Differences with p -values lower than 0.05 were considered significant.

3. Results

3.1. Effect of blood anticoagulant and sample stability

3.1.1. EDTA vs heparinized tubes

We initially investigated whether the use of EDTA or heparinized blood sample could significantly influence the result, by activating cells or by interfering with one reagent. We compared T cell response of two healthy donors – one sample in EDTA tube and another in heparinized tube for each donor. T cells were purified separately and stimulated or not with PHA for 24 h. For each conditions, T cells were aliquoted with four different cell numbers – 25,000, 50,000, 75,000 and 100,000. Although these results need to be confirmed on additional samples, Wilcoxon signed rank test showed no significant difference between the two anticoagulants, neither in unstimulated ($p = 0.469$) nor in stimulated ($p = 0.109$) samples (Fig. 1). To note, none of the other experiments presented thereafter were performed on heparinized tubes.

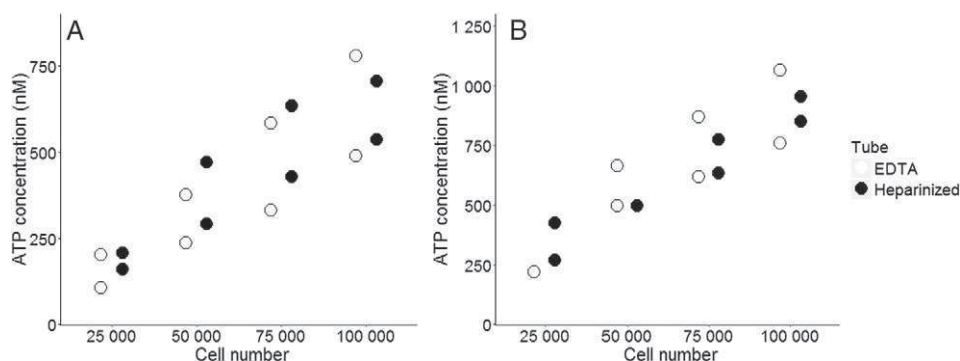


Fig. 1. Effect of blood anticoagulant on ATP concentration in purified T cells. T cells were purified from two healthy donors. For each donor, whole blood samples were collected on EDTA tubes (open circles) and heparinized tubes (black circles). T cells were left unstimulated (A) or stimulated with 4 µg/mL PHA (B), and incubated for 24 h at 37 °C, 5% CO₂. Different numbers of cells were used to measure ATP concentrations (25,000 to 100,000 cells). Samples were processed in duplicates; each point represents the mean of the duplicates corresponding to each donor.

3.1.2. Sample stability after a freeze and thaw cycle

We studied the influence of a freeze and thaw cycle to evaluate stability of ATP concentration during the process. After fresh T cells from 7 healthy volunteers were incubated with or without PHA stimulation, the obtained cell lysates were stored or not at -20°C before ATP dosage to follow this protocol. We observed no significant difference in measurements of ATP concentration between frozen and non-frozen T cell samples (Fig. 2). Moreover, the statistically significant difference between ATP levels in stimulated and unstimulated T cells was preserved after this freeze and thaw cycle. Storage of the cell lysate (obtained after the whole experiment process) at -20°C had no impact on the ATP concentration.

3.2. Repeatability and signal optimization

3.2.1. Reagent-sample sequence

The bioluminescent reaction between ATP contained in the samples and the luciferin-luciferase complex from the reaction mix starts

immediately upon contact between reagents and samples. The fastest the protocol and the measurement are performed, the more intense the signal should be, thus providing more precise results. Using dilutions from standard curve contained in the kit, we tested two procedures – putting the reagent first in the wells and then adding the samples, or putting the samples first in the wells and adding the reagent next. Our results show that the second method provides a higher signal (Fig. 3).

3.2.2. Optimal buffer and reaction time

According to manufacturer's instructions, ATP standard solutions should be diluted in distilled water, whereas T cell samples are obtained and stored in lysis buffer. We performed four standard curves to test sample stability in both diluents and optimal reaction time after adding reagents. We observed that the obtained bioluminescence intensity for the highest point of the standard curve decreased while the incubation time increased. However, the decrease was slower when samples were diluted in lysis buffer than in distilled water. Moreover, the obtained bioluminescence was significantly higher in lysis buffer than in distilled

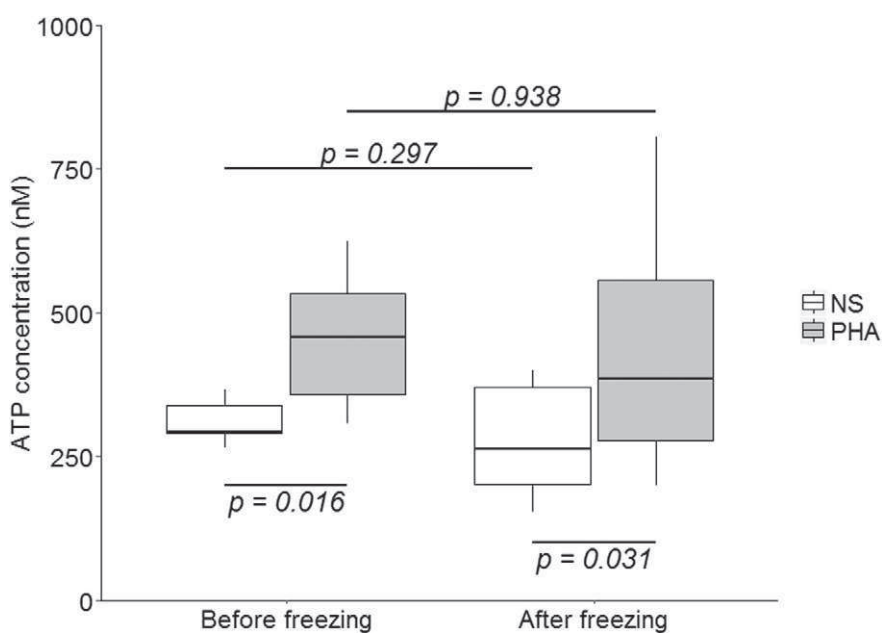


Fig. 2. Effect of freeze and thaw cycle on ATP concentration in purified T cells. T cells were purified from seven healthy donors. After 24 h incubation with 4 µg/mL PHA (grey boxes) or without (NS, white boxes), ATP levels were measured in duplicates in samples containing 50,000 T cells before and after freezing of the obtained cell lysate. Wilcoxon signed-rank tests were used to compare results between freezing conditions and between stimulated and unstimulated samples. Data are presented as Tukey boxplots. Bottom and top of the box represent the first and third quartiles, respectively. The horizontal bar in the box represents the median value. Lower and higher extremities of the whiskers respectively represent the lowest datum still within 1.5 inter-quartile ratio (IQR) of the lower quartile, and the highest datum still within 1.5 IQR of the upper quartile.

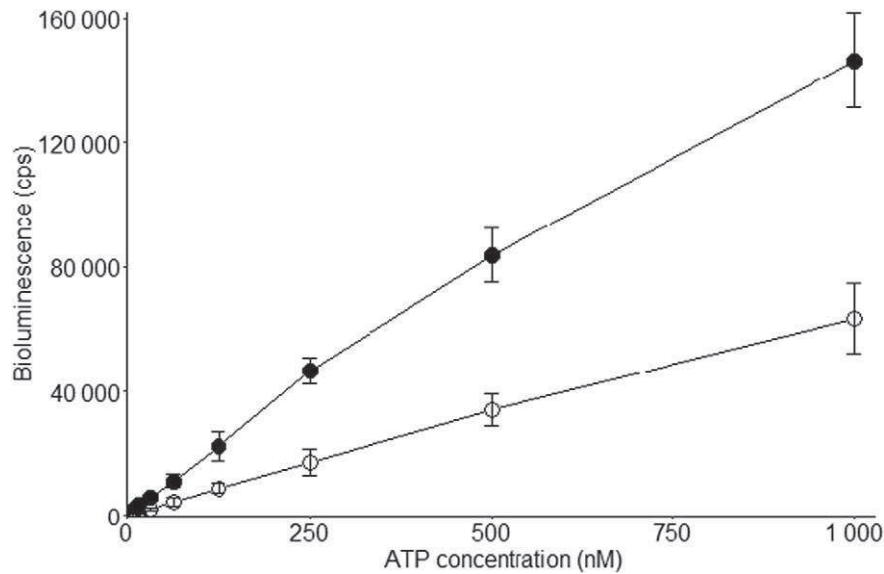


Fig. 3. Effect of reagent order on ATP concentration measurement. Two procedures were tested to get the higher signal for the standard curves during the bioluminescent assay: the reagent solution dropped first in well followed by the sample (open circles), and the samples dropped first in well followed by the reagent solution (black circles). Samples containing various concentrations of standard ATP (0 to 1000 nM) were measured in duplicates for luciferin/luciferase-induced bioluminescence (in counts per second – cps). Each procedure was tested 3 times. Points represent the median of the 3 measures, error bars represent standard deviations.

water ($p < 1.10^{-7}$). Variability was also lower when samples were diluted in lysis buffer (Fig. 4). Similar patterns were observed for the other points of the standard curve (data not shown). Therefore, for an optimized measure, it should be recommended to dilute standard solutions in lysis buffer and to systematically incubate only 3 min with the reaction mix solution before measuring bioluminescence.

3.3. Optimized experimental settings

3.3.1. Minimal cell number

We determined the minimal necessary cell number required to be able to detect a difference in ATP concentrations while performing the measure in stimulated and unstimulated T cells. We tested four T cell numbers – 25,000, 50,000, 75,000 and 100,000. T cells were purified

from eight healthy donor's blood and stimulated or not with 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PHA. As expected, T cell activation by PHA led to a significant increase in ATP concentration in a cell number dependent manner (Fig. 5). We observed that 25,000 T cells generated an, although detectable, very weak signal. Fifty thousand T cells produced a higher bioluminescence and were enough to highlight statistically different ATP concentrations between stimulated and unstimulated samples. Higher cell numbers did not result in enhanced difference between stimulated and unstimulated conditions, neither in lower variability.

3.3.2. Influence of the dose of stimulant

We tested different concentrations of PHA (0.2, 0.4 and 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) on T cells from five healthy volunteer's blood to evaluate any stimulant dose-response. After 24 h incubation, we calculated the ratio for each

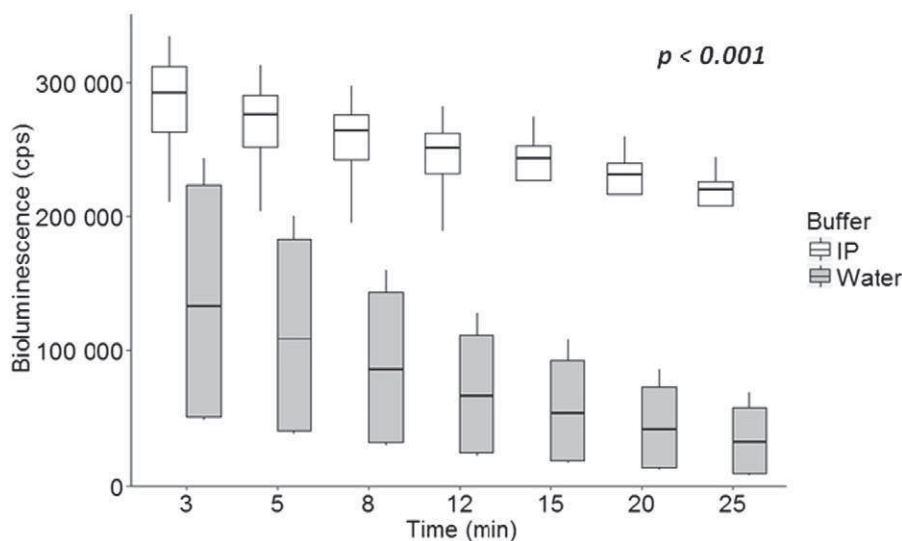


Fig. 4. Effect of diluent and reaction time on ATP concentration measurement. Samples containing standard ATP 1000 nM were measured for luciferin/luciferase-induced bioluminescence (in counts per second – cps), when diluted in IP buffer (white boxes) or in distilled water (grey boxes) at different incubation times: 3, 5, 8, 12, 15, 20 and 25 min. Repeated measures ANOVA test was used to analyze the effect of diluent on ATP concentration measurement at the different incubation times. Data from 4 replicates are presented as Tukey boxplots. Bottom and top of the box represent the first and third quartiles, respectively. The horizontal bar in the box represents the median value. Lower and higher extremities of the whiskers respectively represent the lowest datum still within 1.5 IQR of the lower quartile, and the highest datum still within 1.5 IQR of the upper quartile. Similar pattern were observed for other ATP concentrations samples (data not shown).

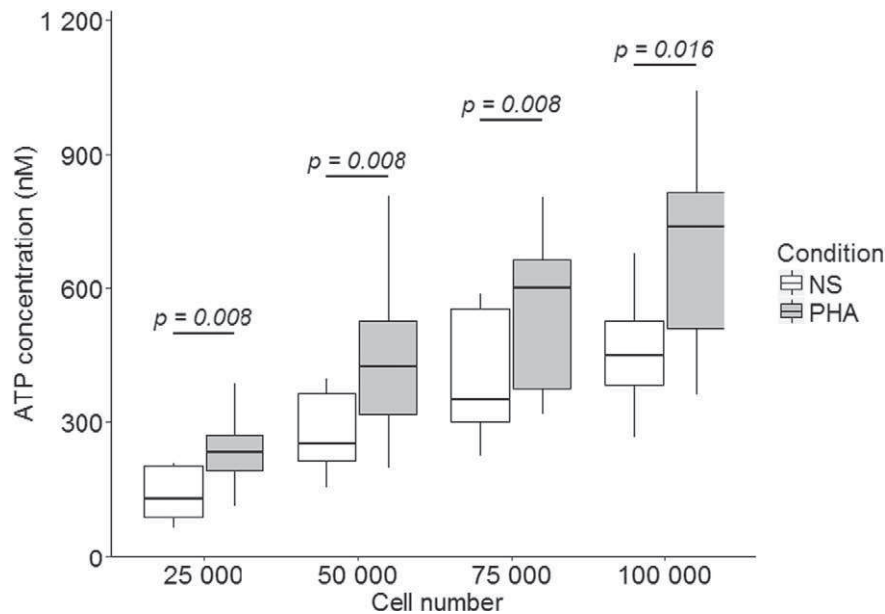


Fig. 5. Effect of cell number on ATP concentration in purified T cells. T cells were purified from eight healthy volunteers. After 24 h incubation with 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PHA (grey boxes) or with no stimulant (NS, white boxes), ATP levels were measured in duplicates in samples containing various number of T cells (25,000, 50,000, 75,000 and 100,000). Wilcoxon signed-rank tests were used to compare results between stimulated and unstimulated samples for each cell number. Data are presented as Tukey boxplots. Bottom and top of the box represent the first and third quartiles, respectively. The horizontal bar in the box represents the median value. Lower and higher extremities of the whiskers respectively represent the lowest datum still within 1.5 IQR of the lower quartile, and the highest datum still within 1.5 IQR of the upper quartile.

dose between ATP concentration in stimulated and unstimulated cells. We observed a limited effect of the stimulant at low doses (0.2 and 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$), but a more important effect at 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of PHA ($p = 0.067$ versus unstimulated samples, post-hoc Nemenyi test) (Fig. 6A). These results suggest that 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of PHA remains the optimal dose to activate T cell metabolism.

We also tested a second stimulant. We chose anti-CD2/CD3/CD28 antibody-coated beads to reproduce physiological activation of T cells. Different beads to cell ratio were tested (0.5, 1, and 2) on purified T cells from the same five healthy volunteer's blood. After 24 h of incubation, we calculated the ratio for each dose between ATP concentration in stimulated and unstimulated cells (Fig. 6B). Overall comparison between the different beads/cell ratios with Kruskal-Wallis test revealed a statistically significant p -value of 0.012. Post-hoc Nemenyi test further demonstrated that the difference between unstimulated cells and cells stimulated with a beads/cell ratio of 2 was statistically significant ($p = 0.0073$). The difference between unstimulated cells and cells stimulated with a beads/cell ratio of 1 showed a trend towards statistical significance ($p = 0.0984$). To note, the rise in ATP concentration due to stimulation was less important with beads than with PHA for a similar number of stimulated T cells.

3.3.3. Effect of incubation duration

We initially chose 24 h as the duration of stimulation. We tested four other time points (30 min, 1 h, 3 h, and 8 h) to determine which incubation time enables to obtain the greatest stimulation effect. The ratio of ATP concentrations between stimulated and unstimulated cells at the different time points are presented on Fig. 7. We observed a similar increase (around 250%) at 0.5, 1, 3, and 24 h. 8 h of incubation led to the greatest ratio and the lowest variability. However, a significant rise in ATP concentration could be detected as early as 30 min after stimulation.

4. Discussion

Our results describe how an intra-lymphocyte ATP quantification protocol can be adapted to match clinical constraints where patients exhibit lymphopenia.

Growing evidence demonstrates the link between bioenergetics and lymphocyte function. While effector T cells rely mostly on aerobic glycolysis to produce energy and biomolecules (Donnelly and Finlay, 2015), regulatory T lymphocytes depend on exogenous fatty acid oxidation to support oxidative phosphorylation (Loftus and Finlay, 2016; Michalek et al., 2011). Memory T cells have an increased mitochondrial mass, and use both oxidative phosphorylation and aerobic glycolysis upon re-activation, allowing their rapid recall to an already known stimulus (van der Windt et al., 2013). This balance between glucose and lipid metabolism is driven by the AMPK-PI3K-Akt-mTOR pathway. mTOR is predominant in activated and/or proliferative T cells, whereas AMPK dominance leads to quiescent and regulatory T cells (Howie et al., 2014). Thus, the differentiation and function of lymphocytes is linked to their preferential energetic pathways (Gerriets and Rathmell, 2012). In line, markers of lymphocyte metabolic status have been proposed as surrogate markers of lymphocyte functions.

Particularly, ATP synthesis by CD4+ T lymphocytes has been extensively studied in the field of solid organ transplantation, as it may reflect the global effect of the interaction between the combined immunosuppression drug regimen and the patient's immune system much better than the plasma levels of each drug (Zeevi and Lunz, 2013). Indeed, an accurate adaptation of immunosuppression is needed to minimize, on the one hand the risk of infection and cancer due to over-immunosuppression, and on the other hand the risk of acute rejection caused by insufficient immunosuppression. Lower ATP values have been associated with infections, when higher ATP concentrations correlated with a higher risk of graft rejection (Kowalski et al., 2006). Repeated measurements of ATP production by CD4+ lymphocytes, rather than absolute values, have been proposed to predict adverse events (Quaglia et al., 2014). However, whether the low ATP responses measured during infectious episodes reflect inadequate over-dosage of immunosuppressive drugs or sepsis-induced immunosuppression remains unclear (Bhorade et al., 2008).

Optimal ranges of immune response (expressed as ATP content in CD4+ lymphocytes) have been proposed as a target to achieve balanced immunosuppression (Kobashigawa et al., 2010; Kowalski et al., 2006; Thai et al., 2006). A retrospective study also suggested an association between all-cause mortality and a low CD4+ response during the

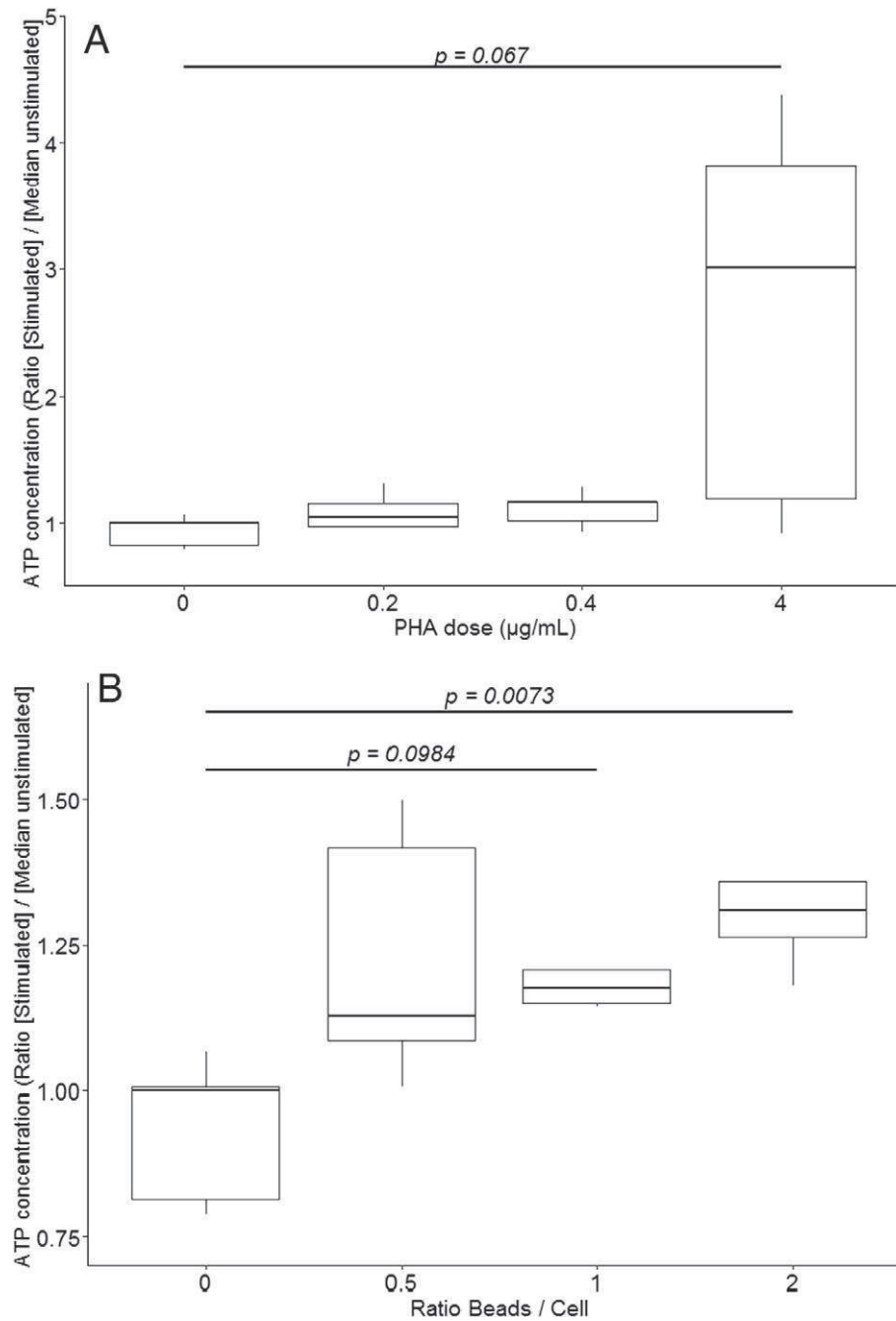


Fig. 6. Effect of stimulant concentration on ATP concentration in purified T cells. T cells were purified from five healthy volunteers. After 24 h incubation with various doses of PHA (0.2, 0.4 and 4 µg/mL, A) or anti-CD2/CD3/CD28 antibody-coated beads (0.5, 1, and 2 beads per cell, B), ATP levels were measured in samples containing 50,000 T cells. Samples were processed in duplicates. Data are presented as Tukey boxplots. Bottom and top of the box represent the first and third quartiles, respectively. The horizontal bar in the box represents the median value. Lower and higher extremities of the whiskers respectively represent the lowest datum still within 1.5 IQR of the lower quartile, and the highest datum still within 1.5 IQR of the upper quartile. Multiple comparisons between groups used Kruskal-Wallis test and post-hoc Nemenyi test.

post-transplantation early follow-up (Berglund et al., 2011). Very recently, in a randomized controlled trial involving liver transplant recipients, patients whose tacrolimus dosage was adapted according to ATP response had a lower 1-year mortality, and fewer long-lasting infections. Although the difference did not reach statistical significance, rejections were also slightly more common in this group (Ravaioli et al., 2015). These results support the rationale for the measurement of ATP concentration in T cells as a surrogate marker of global immune functionality. However, the use of intra-lymphocyte ATP measurement in clinical contexts characterized by very low circulating lymphocyte number requires several technical optimizations. This represented the goal of the current study.

First, we demonstrated that 50,000 T cells are sufficient to highlight an increase in intracellular ATP between stimulated and unstimulated cells. This low amount of lymphocytes will be easy to sample from lymphopenic patients' blood. De facto, 50,000 T cells can be purified from less than 300 µL of septic shock patients' whole blood in our experience. This optimized protocol can therefore be used in clinical settings. In addition, we believe that it is important to normalize the number of cells in which ATP content is measured. Indeed, the number of T cells may be an independent factor of the global immune response, represented by ATP concentration. If no cell normalization is performed, differences in ATP content may either reflect a modification of cell metabolism, or simply a variation in the number of ATP-producing cells.

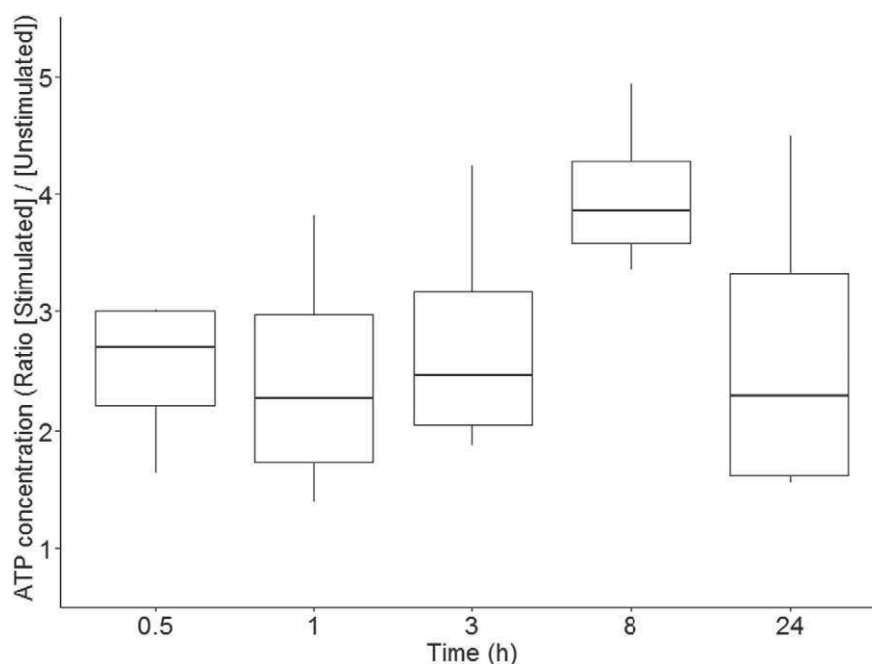


Fig. 7. Effect of incubation time on ATP concentration in purified T cells. T cells were purified from four healthy volunteers. After various periods of incubation (0.5, 1, 3, 8 and 24 h) with or without 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PHA, ATP levels were measured in samples containing 50,000 T cells. Samples were processed in duplicates. Data are presented as Tukey boxplots. Bottom and top of the box represent the first and third quartiles, respectively. The horizontal bar in the box represents the median value. Lower and higher extremities of the whiskers respectively represent the lowest datum still within 1.5 IQR of the lower quartile, and the highest datum still within 1.5 IQR of the upper quartile.

Secondly, we showed that 8 h of stimulation led to the highest ratio of ATP concentration between stimulated and control samples, with a minimal variability. Interestingly, the effect of PHA stimulation could be observed after a very short culture. Indeed, a greater than 100% rise in ATP concentration was noted as early as 30 min after stimulation. A similar increase could also be observed at all other time points. Consequently, if this result is confirmed on a bigger cohort, the assay could be drastically shortened. This is of great interest for a future routine clinical application – being able to answer quickly to clinicians would facilitate the spread of this technique.

Third, we believe that a positive selection of T cells might modify their metabolism, as the binding of CD4+ coated beads to lymphocytes may result in the activation of intra-cellular pathways. We chose a negative selection to exclude all unwanted immune cells by crosslinking it to red blood cells with a commercially available antibody cocktail, allowing their elimination in the pellet during the density gradient centrifugation step. With this technique, the proportion of T lymphocytes in the purified samples is almost always higher than 90% in our experience.

We first chose PHA as the stimulant of T lymphocytes. This lectin is a potent stimulant that activates many intra-lymphocyte signaling pathways (Valentine et al., 1985). This stimulation is easily available in most immunology laboratories, justifying its choice for a technique optimization process. We also evaluated anti-CD2/CD3/CD28 antibody-coated beads, which provide the two signals needed to completely activate T lymphocytes via surface receptors (Li and Kurlander, 2010). For both stimuli, we observed a dose-dependent response in ATP concentration measurement. However, ATP concentration measured after TCR stimulation with anti-CD2/CD3/CD28 antibody-coated beads was much lower than with PHA for a similar number of stimulated T cells. This might be related with the capacity of each stimuli to activate T cells within the stimulation duration used in our experiment.

Among all immunological T cell tests available, the place of ATP quantification remains to be precisely defined. Activated T cells require energy as well as cellular elements to proliferate, which can both be supplied by the metabolic switch towards aerobic glycolysis. As a result, it would be interesting to explore if intra-cellular ATP concentration

correlates with reference functional T cell testings for example markers of T cell proliferation, such as tritiated thymidine or 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU, a DNA base analog) incorporation, or cytokine production. One could guess that such correlation may exist, but if not, the ATP quantification test could be useful in cases where defects in energy production and cell proliferation are decoupled.

In addition, now that this experimental procedure for ATP concentration measurement in lymphopenic patients has been designed, feasibility of the implementation of this protocol in a routine practice now needs to be evaluated. This will include the evaluation of the performances of this test (intra- and interoperator repeatability, limit of detection and limit of quantification of the method). It would also be interesting to evaluate the effect of cryopreservation before culture and stimulation on cell capacity to produce ATP. This should now be performed in a further dedicated study.

This work presents several limitations. First, it would be interesting to test other stimulants, like PMA/ION (phorbol myristate acetate/ionomycin), which directly activates protein kinase C and NFAT pathways in the cytoplasm (Chatila et al., 1989; Suzawa et al., 1983), or OKT3 for surface receptor-dependent activation. Indeed, different pathways for activation could induce different patterns of bioenergetic response. Secondly, we chose to purify total T cells. It would be interesting to compare whether ATP content variation after stimulation are similar between CD4+ and CD8+ lymphocytes.

5. Conclusion

This study reports an optimization and standardization of the intra-cellular ATP dosage protocol in T lymphocytes, making its use in lymphopenic patients possible. The cell number can be lowered to 50,000 T cells. This is compatible with limitations in clinical settings that drastically reduce the number of T cells available. We also demonstrated that incubation time, with or without stimulation by PHA, can be lowered at least to 8 h, but may also be as short as 1/2 h. This will allow a very quick answer to physicians, which is a critical point for biomarkers.

Regarding technical features, we determined that blood can be sampled into EDTA or heparinized tubes, and that a freeze and thaw cycle of the cell lysate obtained at the end of the experiment process did not affect significantly the results, allowing concomitant processing of different samples on the same lecture plate. We also proved that the sample should be put in the reading plate before the reagent mix, that the solution used to dilute samples should be the lysis buffer rather than distilled water, and that the incubation time should be as short as 3 min to ensure maximal signal and minimal variability.

In summary, our protocol for ATP determination in T lymphocytes is characterized by 1) a normalized T cell number, 2) a very low number of cells needed, 3) a very short incubation duration, 4) a negative selection process, avoiding potential modifications induced by a positive selection. This lymphopenia-adapted protocol could now serve as a new tool to further investigate T cells bioenergetics and its implications in larger clinical studies, for example in the context of injury and sepsis-induced immunosuppression.

Fundings

This work was funded by Hospices Civils de Lyon (Lyon, France) and bioMérieux (Marcy-l'Étoile, France) within the context of the Joint Research Unit HCL-bioMérieux, in which this work was conducted. The funders had no implication in the design of the study, in the collection, analysis, or interpretation of the data, nor in the preparation of the manuscript and the decision to submit it for publication.

Authors' contributions

TG contributed to the interpretation of the data and wrote the manuscript; JM performed experiments and wrote a part of the manuscript; EI and FP performed the experiments; EI, JM, FP, CR, JT and FV contributed to the conception and design of the study, the acquisition, analysis and interpretation of the data; TR, GM, JT and FV reviewed the manuscript for important intellectual content; all authors gave their final approval for the definite version of the manuscript to be published.

Conflicts of interest

Julie MOUILLAUD, Estellie IDEALISOA, Fanny POUJOL and Julien TEXTORIS are employees of bioMérieux.

References

- Berglund, D., Bengtsson, M., Biglarnia, A., Berglund, E., Yamamoto, S., von Zur-Mühlen, B., Lorant, T., Tufveson, G., 2011. Screening of mortality in transplant patients using an assay for immune function. *Transpl. Immunol.* 24, 246–250. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trim.2010.12.005>.
- Bhorade, S.M., Janata, K., Vigneswaran, W.T., Alex, C.G., Garrity, E.R., 2008. Cylex ImmuKnow assay levels are lower in lung transplant recipients with infection. *J. Heart Lung Transplant.* 27, 990–994. <http://dx.doi.org/10.1016/j.healun.2008.06.005>.
- Buck, M.D., O'Sullivan, D., Pearce, E.L., 2015. T cell metabolism drives immunity. *J. Exp. Med.* 212, 1345–1360. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20151159>.
- Castelino, D.J., McNair, P., Kay, T.W., 1997. Lymphocytopenia in a hospital population—what does it signify? *Aust. NZ J. Med.* 27, 170–174.
- Chatila, T., Silverman, L., Miller, R., Geha, R., 1989. Mechanisms of T cell activation by the calcium ionophore ionomycin. *J. Immunol.* 143, 1283–1289.
- Delgoffe, G.M., Powell, J.D., 2015. Feeding an army: the metabolism of T cells in activation, energy, and exhaustion. *Mol. Immunol.* 68, 492–496. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2015.07.026>.
- Donnelly, R.P., Finlay, D.K., 2015. Glucose, glycolysis and lymphocyte responses. *Mol. Immunol.* 68, 513–519. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2015.07.034>.
- Drewry, A.M., Samra, N., Skrupky, L.P., Fuller, B.M., Compton, S.M., Hotchkiss, R.S., 2014. Persistent lymphopenia after diagnosis of sepsis predicts mortality. *Shock* 42, 383–391. <http://dx.doi.org/10.1097/SHK.0000000000000234>.
- Felmet, K.A., Hall, M.W., Clark, R.S.B., Jaffe, R., Carrillo, J.A., 2005. Prolonged lymphopenia, lymphoid depletion, and hypoprolactinemia in children with nosocomial sepsis and multiple organ failure. *J. Immunol.* 174, 3765–3772.
- Gerriets, V.A., Rathmell, J.C., 2012. Metabolic pathways in T cell fate and function. *Trends Immunol.* 33, 168–173. <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2012.01.010>.
- Gouel-Chéron, A., Venet, F., Allaouchiche, B., Monneret, G., 2012. CD4+ T-lymphocyte alterations in trauma patients. *Crit. Care* 16, 432. <http://dx.doi.org/10.1186/cc11376>.
- Grossbard, L.J., Desai, M.H., Lemeshow, S., Teres, D., 1984. Lymphocytopenia in the surgical intensive care unit patient. *Am. Surg.* 50, 209–212.
- He, J., Li, Y., Zhang, H., Wei, X., Zheng, H., Xu, C., Bao, X., Yuan, X., Hou, J., 2013. Immune function assay (ImmuKnow) as a predictor of allograft rejection and infection in kidney transplantation. *Clin. Transpl.* 27, E351–E358. <http://dx.doi.org/10.1111/ctr.12134>.
- Heffernan, D.S., Monaghan, S.F., Thakkar, R.K., Machan, J.T., Cioffi, W.G., Ayala, A., 2012. Failure to normalize lymphopenia following trauma is associated with increased mortality, independent of the leukocytosis pattern. *Crit. Care* 16, R12. <http://dx.doi.org/10.1186/cc11157>.
- Howie, D., Waldmann, H., Cobbold, S., 2014. Nutrient sensing via mTOR in T cells maintains a tolerogenic microenvironment. *Front. Immunol.* 5, 409. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2014.00409>.
- Jha, A.K., Huang, S.C.-C., Sergushichev, A., Lampropoulou, V., Ivanova, Y., Loginicheva, E., Chmielewski, K., Stewart, K.M., Ashall, J., Everts, B., Pearce, E.J., Driggers, E.M., Artyomov, M.N., 2015. Network integration of parallel metabolic and transcriptional data reveals metabolic modules that regulate macrophage polarization. *Immunity* 42, 419–430. <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2015.02.005>.
- Kobashigawa, J.A., Kiyosaki, K.K., Patel, J.K., Kittleson, M.M., Kubak, B.M., Davis, S.N., Kawano, M.A., Ardehali, A.A., 2010. Benefit of immune monitoring in heart transplant patients using ATP production in activated lymphocytes. *J. Heart Lung Transplant.* 29, 504–508. <http://dx.doi.org/10.1016/j.healun.2009.12.015>.
- Kowalski, R., Post, D., Schneider, M.C., Britz, J., Thomas, J., Deierhoj, M., Lobashevsky, A., Redfield, R., Schweitzer, E., Heredia, A., Reardon, E., Davis, C., Bentelejewski, C., Fung, J., Shapiro, R., Zeevi, A., 2003. Immune cell function testing: an adjunct to therapeutic drug monitoring in transplant patient management. *Clin. Transpl.* 17, 77–88.
- Kowalski, R.J., Post, D.R., Mannon, R.B., Sebastian, A., Wright, H.L., Sigle, G., Burdick, J., Elmagd, K.A., Zeevi, A., Lopez-Cepero, M., Daller, J.A., Gritsch, H.A., Reed, E.F., Jonsson, J., Hawkins, D., Britz, J.A., 2006. Assessing relative risks of infection and rejection: a meta-analysis using an immune function assay. *Transplantation* 82, 663–668. <http://dx.doi.org/10.1097/01.tp.0000234837.02126.70>.
- Li, Y., Kurlander, R.J., 2010. Comparison of anti-CD3 and anti-CD28-coated beads with soluble anti-CD3 for expanding human T cells: differing impact on CD8 T cell phenotype and responsiveness to restimulation. *J. Transl. Med.* 8, 104. <http://dx.doi.org/10.1186/1479-5876-8-104>.
- Loftus, R.M., Finlay, D.K., 2016. Immunometabolism: cellular metabolism turns immune regulator. *J. Biol. Chem.* 291, 1–10. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.R115.693903>.
- Maciulek, J.A., Pasternak, J.A., Wilson, H.L., 2014. Metabolism of activated T lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.* 27, 60–74. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coi.2014.01.006>.
- MacIver, N.J., Michalek, R.D., Rathmell, J.C., 2013. Metabolic regulation of T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 31, 259–283. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095956>.
- Michalek, R.D., Gerriets, V.A., Jacobs, S.R., Macintyre, A.N., MacIver, N.J., Mason, E.F., Sullivan, S.A., Nichols, A.G., Rathmell, J.C., 2011. Cutting edge: distinct glycolytic and lipid oxidative metabolic programs are essential for effector and regulatory CD4+ T cell subsets. *J. Immunol.* 186, 3299–3303. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1003613>.
- Pearce, E.L., Poffenberger, M.C., Chang, C.-H., Jones, R.G., 2013. Fueling immunity: insights into metabolism and lymphocyte function. *Science* 342, 1242454. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1242454>.
- Quaglia, M., Cena, T., Fenoglio, R., Musetti, C., Cagna, D., Radin, E., Roggero, S., Amoroso, A., Magnani, G., Stratta, P., 2014. Immune function assay (immunknow) drop over first 6 months after renal transplant: a predictor of opportunistic viral infections? *Transplant. Proc.* 46, 2220–2223. <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2014.07.050>.
- Rajan, G., Sleigh, J.W., 1997. Lymphocyte counts and the development of nosocomial sepsis. *Intensive Care Med.* 23, 1187.
- Ravaioli, M., Neri, F., Lazzarotto, T., Bertuzzo, V.R., Di Gioia, P., Stacchini, G., Morelli, M.C., Ercolani, G., Cescon, M., Chierighin, A., Del Gaudio, M., Cucchetti, A., Pinna, A.D., 2015. Immunosuppression modifications based on an immune response assay: results of a randomized, controlled trial. *Transplantation* 99, 1625–1632. <http://dx.doi.org/10.1097/TP.0000000000000650>.
- Suzawa, T., Hyodo, S., Kishi, T., Kashiwa, H., Kittaka, E., Sakano, T., Usui, T., 1983. Induction of human T-lymphocyte colonies by phorbol myristate acetate. *Immunology* 50, 575–580.
- Thai, N.L., Blisard, D., Tom, K., Basu, A., Smetanka, C., Tan, H., Bentelejewski, C., Glidewell, J., Britz, J., Kowalski, R., Shapiro, R., Fung, J., Marcos, A., Zeevi, A., 2006. Pancreas transplantation under alemtuzumab (Campath-1H) and tacrolimus: correlation between low T-cell responses and infection. *Transplantation* 82, 1649–1652. <http://dx.doi.org/10.1097/01.tp.0000250655.14026.5c>.
- Valentine, M.A., Tsoukas, C.D., Rhodes, G., Vaughan, J.H., Carson, D.A., 1985. Phytohemagglutinin binds to the 20-kDa molecule of the T3 complex. *Eur. J. Immunol.* 15, 851–854. <http://dx.doi.org/10.1002/eji.1830150821>.
- van der Windt, G.J.W., O'Sullivan, D., Everts, B., Huang, S.C.-C., Buck, M.D., Curtis, J.D., Chang, C.-H., Smith, A.M., Ai, T., Faubert, B., Jones, R.G., Pearce, E.J., Pearce, E.L., 2013. CD8 memory T cells have a bioenergetic advantage that underlies their rapid recall ability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 14336–14341. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1221740110>.
- Vulliamy, P.E., Perkins, Z.B., Brohi, K., Manson, J., 2015. Persistent lymphopenia is an independent predictor of mortality in critically ill emergency general surgical patients. *Eur. J. Trauma Emerg. Surg.* <http://dx.doi.org/10.1007/s00068-015-0585-x>.
- Warburg, O., 1956. On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 124, 269–270.
- Zevei, A., Lunz, J., 2013. Cylex ImmuKnow cell function assay. *Methods Mol. Biol.* 1034, 343–351. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-62703-493-7_21.

Discussion

Malgré les progrès dans la prise en charge des patients, le sepsis reste aujourd'hui la première cause de mortalité en réanimation (418). Une réponse dérégulée du système immunitaire apparaît chez les patients septiques suite à une infection (4). La persistance de ce phénomène entraîne des altérations du système immunitaire dont l'intensité et la durée sont associées à un risque augmenté de décès et d'infections secondaires (419). Lorsque la phase d'immunosuppression devient prédominante, les lymphocytes T des patients septiques présentent des altérations phénotypiques et fonctionnelles caractéristiques d'un état d'épuisement. Pour restaurer ces altérations, l'IL-7 est actuellement proposée comme traitement immunostimulant. En effet, cette cytokine permet le maintien d'une population de lymphocytes T fonctionnels. Dans des essais précliniques, le traitement par de l'IL-7 a permis d'augmenter la survie dans des modèles murins de sepsis. Chez les patients, il a permis d'augmenter la prolifération et la production *ex vivo* d'IFN γ des lymphocytes T et de diminuer leurs altérations métaboliques (7, 8, 249, 264). De plus, les résultats du premier essai clinique de l'IL-7 dans le choc septique ont récemment montré son efficacité dans la restauration du nombre de lymphocytes T chez des patients atteints d'une lymphopénie sévère ainsi qu'une absence d'effet indésirable grave (9). L'IL-7 agit via son récepteur exprimé principalement à la surface des lymphocytes T matures et dont la chaîne spécifique est le CD127 (275). Il existe également une forme soluble sCD127 et différents transcrits ont été identifiés (11). Des études ont évalué l'expression de ces différentes formes de manière individuelle mais aucune n'a mesuré l'ensemble des formes du récepteur de l'IL-7 en parallèle (5, 8). La régulation de ce récepteur ne reste donc que partiellement comprise dans le contexte du sepsis. De plus, le phénotype CD127^{low}PD-1^{high} est proposé comme marqueur d'épuisement des lymphocytes T dans d'autres contextes cliniques comme le cancer ou les infections chroniques (379). Ce phénotype n'a cependant jamais été étudié dans le sepsis.

L'objectif principal de ce travail de thèse se partageait en deux parties. Dans un premier temps, nous avons étudié la régulation du récepteur de l'IL-7 dans le sepsis et évalué son utilisation comme biomarqueur. Nous avons également étudié le phénotype CD127^{low}PD-1^{high} en lien avec les altérations lymphocytaires T des patients septiques. Dans un second temps, l'objectif était de mettre au point un modèle *ex vivo* à partir de lymphocytes T purifiés de volontaires sains reproduisant les altérations phénotypiques et fonctionnelles intrinsèques des lymphocytes T de patients septiques. La mise au point de ce modèle avait pour but de mieux comprendre la physiopathologie des altérations des lymphocytes T dans le sepsis mais également de créer un outil permettant d'explorer de nouveaux aspects de ces altérations et de tester des traitements immunomodulateurs innovants.

Le récepteur de l'IL-7 comme biomarqueur

Une étude du laboratoire avait mis en évidence une augmentation de la concentration plasmatique de sCD127 chez les patients en choc septique en comparaison avec des volontaires sains (12). De plus, une association entre la concentration plasmatique de sCD127 et la mortalité était observée. Nous avons confirmé ces résultats sur une plus grande cohorte de patients de réanimation comprenant des patients septiques et en choc septique mais également des patients non septiques polytraumatisés ou brûlés. La concentration plasmatique de sCD127 était plus faible chez les patients que le prélèvement effectué soit à J1, J3 ou J6 après admission en comparaison avec les volontaires sains. En revanche, au sein des patients, la concentration plasmatique de sCD127 était plus élevée chez les patients non survivants à J7 et J28 sur des prélèvements effectués respectivement à J1 et J3 après admission. Ces résultats confirment le rôle de la concentration plasmatique sCD127 comme marqueur de sévérité chez les patients septiques et, plus généralement, chez les patients de réanimation.

Dans l'une de nos études, l'expression de différents transcrits du gène *IL7R* a été mesurée à partir d'échantillons de sang total de patients en choc septique et de volontaires sains. L'association entre leur expression et la mortalité a également été évaluée. Quatre designs spécifiques de PCR ont été mis en place : un design ciblant l'ensemble des transcrits *IL7R*, un design ciblant le transcrit *IL7R1* codant pour le CD127, un design ciblant le transcrit *IL7R3* codant pour une forme de sCD127 et un dernier design ciblant le transcrit *IL7R7* codant potentiellement pour une forme de sCD127. Sur une première cohorte de 30 patients en choc septique, l'expression de chacun des transcrits mesurés était diminuée chez les patients à J1 et J3 après le diagnostic du choc septique en comparaison avec des volontaires sains. De plus, leur expression à J3 était plus faible chez les patients non survivants à J28 en comparaison avec les patients survivants. Ces résultats ont été reproduits sur une cohorte de validation de plus de 170 patients en choc septique. En utilisant un seuil déterminé à partir de la première cohorte, l'expression des transcrits *IL7R* à J3 dans la cohorte de validation permettait d'identifier un groupe de patients avec un risque de décès de plus deux fois supérieur à celui des autres patients. Une analyse multivariée avec le SAPS II a également permis de mettre en évidence une association indépendante entre l'expression des transcrits *IL7R1* et *IL7R3* et la survenue du décès. Ces transcrits pourraient donc être des biomarqueurs de l'altération de la réponse immunitaire adaptative dans le choc septique. Ils pourraient ainsi être utilisés comme marqueurs de stratification pour des thérapies immunoadjuvantes.

Ces résultats ayant été obtenus à partir d'échantillons sur sang total, nous avons reproduit ces mesures à partir d'échantillons de lymphocytes T purifiés d'une petite cohorte de patients en choc septique et de volontaires sains afin de déterminer si la baisse d'expression observée des transcrits venait uniquement de la lymphopénie ou également d'une régulation au sein des lymphocytes T. En

effet, la plupart des patients sont lymphopéniques et les transcrits IL7R sont majoritairement exprimés dans les lymphocytes T matures circulants. Nous avons observé une baisse d'expression des transcrits IL7R3 et IL7R7 à partir de lymphocytes T purifiés de patients en choc septique en comparaison avec les volontaires sains. En revanche, nous avons observé une expression similaire du transcrit IL7R1 chez les patients et chez les volontaires sains. Ce résultat est concordant avec l'absence globale de régulation de la protéine CD127 à la surface des lymphocytes T de patients. La baisse d'expression des transcrits IL7R3 et IL7R7 correspondant à des formes solubles semble donc être indépendante de la lymphopénie car elle est également présente sur lymphocytes T purifiés. A l'inverse, la baisse d'expression du transcrit IL7R1 est observée uniquement sur sang total et semble donc être principalement le reflet de la lymphopénie. L'expression des transcrits IL7R3 et IL7R7 à partir de lymphocytes T purifiés corrélait avec le score SOFA des patients en choc septique. Bien que ce résultat ait été obtenu sur une petite cohorte de patients, l'expression des transcrits correspondant à des formes solubles sur lymphocytes T purifiés de patients semblent être associée à la sévérité du sepsis. Ainsi, ces transcrits pourraient être des marqueurs de l'altération des lymphocytes T associés à la sévérité. Dans l'optique d'utiliser l'expression de ces transcrits en routine clinique, l'expression du transcrit IL7R1 pourrait être un outil de normalisation. En effet, son expression n'est pas régulée dans les lymphocytes T de patients en choc septique par rapport aux volontaires sains. La baisse de l'expression du transcrit IL7R1 sur sang total semble donc refléter la lymphopénie. Ainsi, normaliser l'expression des transcrits IL7R3 et IL7R7 mesurée sur sang total par l'expression du transcrit IL7R1 permettrait de s'affranchir de l'effet de la lymphopénie.

Lors de l'étude de l'expression du récepteur de l'IL-7 *ex vivo* sur des lymphocytes T de volontaires sains en réponse à différents stimulants, nous avons observé une diminution de l'expression du CD127 membranaire suite à une stimulation par de l'IL-7 dès deux heures, se prolongeant de manière marquée jusqu'à 48 h de culture (**Figure 20**). Cette baisse d'expression du récepteur suite à son interaction avec l'IL-7 a déjà été décrite dans la littérature (303, 314, 317). Ce mécanisme a été caractérisé comme altruiste (10). En effet, l'IL-7 est présente en quantité limitée. La diminution d'expression du CD127 à la surface des lymphocytes ayant interagi avec l'IL-7 permet aux autres lymphocytes T d'accéder à la cytokine. Cette diminution d'expression pourrait ainsi être utilisée comme marqueur de suivi dans le cadre d'un traitement par de l'IL-7 chez les patients septiques. Dans l'essai clinique IL-7 dans le sepsis, l'expression du CD127 à la surface des lymphocytes T CD4 et CD8 des patients en choc septique était significativement impactée par la thérapie (9).

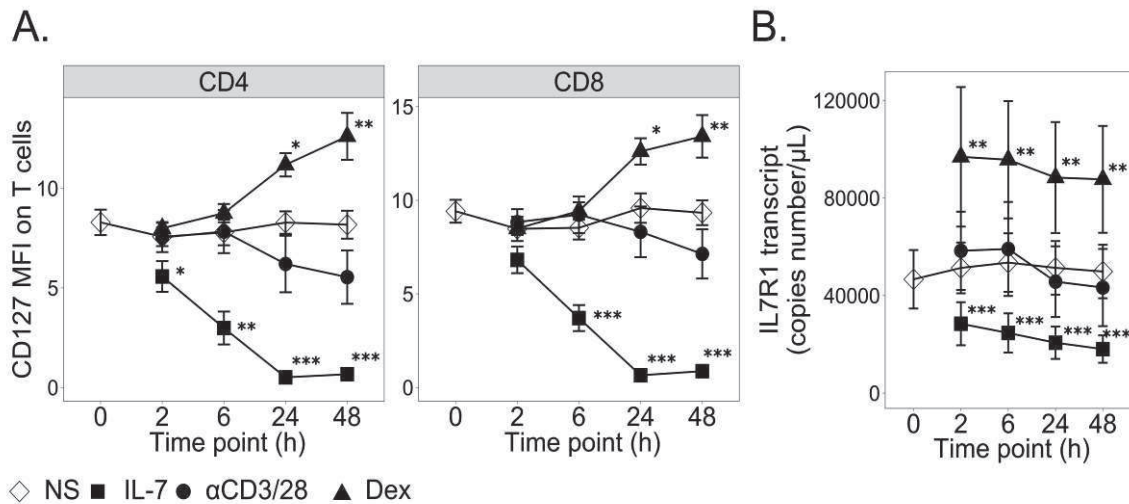


Figure 20 : Expression du CD127 membranaire sur des lymphocytes T purifiés de volontaires sains en réponse à différents stimulants (Non stimulé [NS] n=10, IL-7 n=5, billes avec à leur surface des anticorps anti-CD3/CD28 [αCD3/28] n=5, dexaméthasone [Dex] n=5, voir matériel et méthodes « Regulation of the soluble CD127 protein and corresponding transcripts in septic shock »). (A) Expression du CD127 à la surface des lymphocytes T CD4 et CD8 mesurée par cytométrie en flux. (B) Expression du transcrit IL7R1 mesurée par qPCR.

Dans l'ensemble, nos études montrent plusieurs possibilités d'utilisation des formes du récepteur de l'IL-7 comme biomarqueurs dans le sepsis. Tout d'abord, au vu de la diminution d'expression du CD127 suite à une stimulation par de l'IL-7 *ex vivo* ainsi que chez les patients en choc septique lors du traitement, la forme membranaire pourrait être utilisée comme marqueur de suivi de l'efficacité du traitement. Ensuite, nous avons démontré la performance de la concentration plasmatique de CD127 soluble comme marqueur de sévérité des patients septiques et, plus généralement, des patients de réanimation. Enfin, nous avons mis en évidence l'association entre l'expression des transcrits IL7R1, IL7R3 et IL7R7 et la mortalité des patients en choc septique. La mesure de ces transcrits pourrait être évaluée comme marqueur de l'altération de la réponse adaptative et incluse dans un panel de marqueurs mesurant différents aspects du statut immunitaire du patient.

Régulation des différentes formes du récepteur de l'IL-7

L'évaluation de l'expression des différentes formes du récepteur de l'IL-7 sur lymphocytes T purifiés chez des patients en choc septique et *ex vivo* sur des lymphocytes T de volontaires sains en réponse à différents stimulants nous a permis de mieux comprendre la régulation du récepteur dans le sepsis.

Chez les patients en choc septique, nous avons observé une absence globale de régulation du CD127 à la surface des lymphocytes T ainsi que du transcrit correspondant IL7R1. L'expression du CD127 à la

surface des lymphocytes T circulants de patients septiques avait déjà été évaluée dans deux études. Boomer *et al.* ont observé des niveaux d'expression similaires du CD127 à la surface de lymphocytes T de patients atteints de sepsis sévère 24 h après le diagnostic (J1) en comparaison avec des volontaires sains (5). L'évolution au cours du temps de l'expression du CD127 chez les patients a également été mesurée. Aucun changement d'expression n'était observé pour le CD127 à la surface des lymphocytes T CD4 entre le J1 et le J7 après le développement du sepsis sévère. En revanche, l'expression du CD127 était diminuée à la surface des lymphocytes T CD8 à J7 en comparaison avec celle à J1. Dans une autre étude menée précédemment au laboratoire, Venet *et al.* ont également observé une expression similaire du CD127 sur les lymphocytes T CD4 de patients septiques et de volontaires sains (8). L'expression du CD127 à la surface des lymphocytes T CD8 était diminuée chez les patients à J3 en comparaison avec les volontaires sains. De manière similaire aux deux publications précédentes, nous n'avons observé aucune différence d'expression du CD127 à la surface des lymphocytes T CD4 entre patients en choc septique à J1, J3 et J7 et volontaires sains. Nous n'avons observé aucune différence significative pour les lymphocytes T CD8 mais nous avons constaté une tendance à une diminution de l'expression du CD127 à J3 après le choc septique comme observé chez les patients septiques dans l'étude de Venet *et al.* L'absence de diminution significative dans notre étude par rapport à celle de Venet *et al.* peut s'expliquer par la petite taille des deux cohortes. L'absence globale de régulation du CD127 à la surface des lymphocytes T de patients est un argument supplémentaire pour l'utilisation de l'IL-7 comme thérapie immunostimulante. En effet, le récepteur est toujours présent à la surface des lymphocytes T de patients et peut donc interagir avec l'IL-7 administrée comme traitement. De plus, la voie de l'IL-7 est toujours activable sur les lymphocytes T de patients septiques puisque le traitement permet de restaurer en partie leur prolifération *ex vivo* et que la phosphorylation de STAT5 a été observée dans des lymphocytes T de patients septiques suite à une stimulation IL-7 *ex vivo* (8, 417).

Au niveau de la forme soluble, nous avons observé une augmentation de la production de sCD127 avec, en parallèle, une baisse d'expression des transcrits codant pour une forme soluble IL7R3 et IL7R7. La stimulation *ex vivo* par l'IL-7 de lymphocytes T purifiés de volontaires sains induit une baisse d'expression des formes membranaire et soluble du récepteur au niveau protéines et transcrits. La stimulation par de la dexaméthasone induit plutôt une augmentation de l'expression des différentes formes. L'activation *ex vivo* du TCR de lymphocytes T purifiés de volontaires sains reproduit globalement la régulation de l'expression de la forme soluble du récepteur de l'IL-7 observée chez les patients : une augmentation de la production de sCD127 avec, en parallèle, une baisse des transcrits solubles. L'activation des lymphocytes T semble donc jouer un rôle dans la régulation de la forme soluble du récepteur de l'IL-7 dans le sepsis. La régulation opposée de l'expression des transcrits et de la protéine suggère un clivage de la protéine membranaire plutôt qu'une régulation transcriptionnelle comme

source de production de la protéine soluble. Ce type de mécanisme avait déjà été suggéré suite à l'activation *ex vivo* de lymphocytes T (303). De plus, ce type de régulation est observée dans le cas du récepteur de l'IL-2, ou CD25. En effet, le CD25 est exprimé à la surface des lymphocytes T et cette protéine est clivée pour libérer du CD25 soluble suite à leur activation (420). Chez les patients atteints du VIH, contexte où l'activation des lymphocytes T est chronique, la concentration plasmatique du sCD127 est augmentée (310, 319, 368). Ainsi, l'activation chronique du TCR pourrait jouer un rôle dans la surproduction de sCD127. Lorsque nous avons mesuré la concentration de sCD127 dans les surnageants de culture de lymphocytes T purifiés après 48 h, nous avons observé une tendance à l'augmentation de la concentration de sCD127 chez les patients en choc septique en comparaison avec les volontaires sains. Ainsi, il semblerait que les lymphocytes T de patients en choc septique produisent une quantité plus importante de sCD127. Au niveau plasmatique, cette surproduction n'apparaît pas puisque la concentration de sCD127 est plus faible chez les patients que chez les volontaires sains. Elle pourrait donc être masquée par la lymphopénie. En revanche, une concentration plasmatique de sCD127 plus élevée chez les patients est associée à une plus forte mortalité. Au vu des résultats obtenus *ex vivo*, cette augmentation de la concentration plasmatique de sCD127 chez les patients les plus sévèrement atteints pourrait traduire une activation des lymphocytes T plus importante chez ces patients. L'augmentation de la concentration de sCD127 plasmatique est également observée dans la sclérose en plaque, autre contexte d'inflammation (349, 421, 422). Cependant, dans cette pathologie, plusieurs études identifient le SNP rs6897932 du gène *IL7R* comme principale cause de cette augmentation. En effet, la présence de ce SNP induit l'augmentation de l'épissage alternatif du transcrite *IL7R1* et ainsi une présence plus importante du transcrite *IL7R3*. Il semblerait donc que les individus possédant ce SNP aient un ratio de CD127/sCD127 diminué et par conséquent une concentration plus importante de sCD127 plasmatique en comparaison avec les individus ne possédant pas ce SNP. Il serait intéressant d'évaluer la présence de ce SNP chez les patients septiques en comparaison avec des volontaires sains.

Nous n'observons pas de régulation globale du CD127 membranaire chez les patients septiques en comparaison avec les volontaires sains ni au niveau protéique ni au niveau transcriptionnel. Cependant, si un clivage à la membrane est à l'origine de la production de sCD127 chez les patients, une baisse de l'expression du CD127 à la surface des lymphocytes T devrait être observée. L'effet additif de plusieurs paramètres régulant l'expression du CD127 à la surface des lymphocytes T pourrait expliquer ce résultat. Par exemple, suite à la stimulation *ex vivo* de lymphocytes T purifiés de volontaires sains, nous avons observé un effet totalement opposé de la dexaméthasone et de l'IL-7 sur l'expression du CD127 et du transcrite *IL7R1* : une augmentation de l'expression suite à une stimulation par de la dexaméthasone et une baisse d'expression marquée suite à une stimulation par de l'IL-7 (**Figure 20**). On peut supposer que

dans un contexte où ces deux éléments seraient présents, leurs effets pourraient se compenser. D'autres éléments que la dexaméthasone induisent une augmentation de l'expression du CD127 comme le TNF α ou l'IL-2 suite à une activation des lymphocytes T (316, 423, 424). Or, chez les patients septiques, l'orage cytokinique entraîne une augmentation de la concentration plasmatique de plusieurs cytokines pro-inflammatoires dont le TNF α et l'IL-2 (423). Plusieurs mécanismes opposés de régulation du CD127 membranaire pourraient donc se mettre en place simultanément chez les patients, avec par exemple une baisse d'expression du CD127 suite au clivage de la protéine et une augmentation de son expression induite par les cytokines pro-inflammatoires. Cette combinaison de paramètres pourrait ainsi résulter en une absence globale de régulation du CD127 membranaire.

Sous-population de lymphocytes T CD127^{low}PD-1^{high}

Pour la première fois, nous avons mis en évidence une augmentation de la proportion de la population CD127^{low}PD-1^{high} au sein des lymphocytes T de patients en choc septique en comparaison avec des volontaires sains. Cette population a déjà été identifiée dans des contextes d'épuisement lymphocytaire autre que le sepsis. Trautmann *et al.* ont observé une population PD-1^{high} parmi les lymphocytes T CD8 spécifiques du VIH qui exprimaient faiblement le CD127 (259). De plus, suite à une activation, ces lymphocytes T avaient une production altérée d'IL-2 et de TNF α . Dans le cancer, ce phénotype CD127^{low}PD-1^{high} a été observé dans des lymphocytes T infiltrant et associés aux tumeurs de l'ovaire (425). Ce phénotype a également été observé dans des lymphocytes T infiltrant le foie de patients atteints d'hépatite C (377). De plus, suite à une activation *ex vivo*, les lymphocytes T CD8 spécifiques du virus de l'hépatite C présentant un phénotype CD127^{low}PD-1^{high} ne proliféraient pas (376). Suite à ces observations, le phénotype CD127^{low}PD-1^{high} est actuellement considéré comme caractéristique de l'état d'épuisement des lymphocytes T (14). Chez les patients en choc septique, nous avons observé une augmentation de la proportion de lymphocytes T CD127^{low}PD-1^{high} concomitante avec des altérations fonctionnelles des lymphocytes T de patients. Ainsi, ce phénotype caractéristique d'un épuisement lymphocytaire T dans d'autres contextes pathologiques comme les infections chroniques et le cancer (259, 360, 425) pourrait également être un marqueur de l'épuisement des lymphocytes T dans le sepsis. La lymphopénie est fréquemment proposée pour stratifier les patients pouvant bénéficier d'un traitement visant à rétablir la fonctionnalité des lymphocytes dans le sepsis, comme le traitement par de l'IL-7 par exemple (9). La mesure de cette population CD127^{low}PD-1^{high} chez les patients pourrait être plus spécifique des altérations lymphocytaires T que la lymphopénie et pourrait donc être un meilleur outil de stratification pour les thérapies ciblant les lymphocytes T. Cependant, des études complémentaires sont nécessaires afin de mieux caractériser cette population et son association avec les altérations fonctionnelles des lymphocytes T.

La diminution de l'expression du CD127 ainsi que l'augmentation de l'expression de PD-1 sont également observées suite à une activation des lymphocytes T (287, 426). De plus, les lymphocytes T de patients septiques au stade précoce de la pathologie présentent un phénotype activé (376). Une étude évaluant l'expression de PD-1 sur des lymphocytes T CD8 de patients VIH et de volontaires sains a montré que son expression ne semblait pas corrélérer avec un épuisement lymphocytaire mais plutôt avec le stade de différenciation des lymphocytes T CD8 et leur statut d'activation (427). Lors de leur activation, l'expression de PD-1 était augmentée simultanément avec l'expression de marqueurs d'activation comme CD38 et HLA-DR. Nous avons donc évalué l'expression de marqueurs d'activation sur les lymphocytes T CD127^{low}PD-1^{high}. Nous avons observé que cette sous-population de lymphocytes T exprimait également HLA-DR, un marqueur tardif d'activation mais n'exprimait ni CD25 ni CD38, des marqueurs d'activation plus précoces. De façon intéressante, ce phénotype CD127^{low}PD-1^{high}HLA-DR^{high} avait déjà été observé dans des lymphocytes T infiltrant les tumeurs de patients atteints de mélanome métastatique et avait été associé à un épuisement des lymphocytes T CD8 (428). Dans notre étude, l'augmentation de la proportion de cette population est concomitante avec des altérations fonctionnelles des lymphocytes T. Cette co-expression d'un marqueur d'activation tardif sur les lymphocytes CD127^{low}PD-1^{high} de patients en choc septique suggère un rôle de l'activation des lymphocytes T dans l'expansion de cette sous-population mais également dans le développement des altérations fonctionnelles des lymphocytes T.

Modèle ex vivo d'altérations des lymphocytes T induites par l'activation

Pour tester l'hypothèse d'un rôle de l'activation des lymphocytes T dans les altérations induites par le sepsis, nous avons mis au point un modèle d'altérations induites par l'activation à partir de lymphocytes T purifiés de volontaires sains. Nous avons observé une augmentation massive de la population CD127^{low}PD-1^{high} suite à une activation *ex vivo* de lymphocytes T purifiés de volontaires sains. Puis, nous avons évalué si cette activation des lymphocytes T induisait également une altération de leur fonctionnalité. Suite à une seconde activation, nous avons mesuré la prolifération et la production de cytokines des cellules. Nous avons observé que ces deux paramètres étaient fortement altérés. Ainsi, l'activation des lymphocytes T reproduit les altérations fonctionnelles observées chez les patients en choc septique ainsi que l'expansion concomitante des lymphocytes T CD127^{low}PD-1^{high}.

Ce modèle d'altérations induites par l'activation des lymphocytes T nous renseigne sur l'un des mécanismes de l'immunosuppression des lymphocytes T lors d'un sepsis. En effet, l'activation semble induire des altérations intrinsèques aux lymphocytes T similaires à celles observées chez les patients. Or, le sepsis induit une activation massive des lymphocytes T (429). Nos résultats montrent que l'épuisement lymphocytaire T est accompagné de l'expression du marqueur tardif d'activation HLA-DR

ainsi que de celle du récepteur co-inhibiteur PD-1, également présent suite à une activation. Nous pouvons alors émettre l'hypothèse que le développement de cette immunosuppression provient d'un mécanisme physiologique de régulation de l'activation. En effet, la voie de signalisation de PD-1 vise à éviter une suractivation des lymphocytes T (**Figure 21**) (430). Dans le cas d'infections aiguës, elle induit un contrôle de l'activation afin de prévenir les lésions tissulaires mais également de permettre un retour à l'homéostasie de la réponse du système immunitaire. Ainsi, dans un contexte où la stimulation antigénique est massive, la voie de signalisation de PD-1 pourrait passer d'un rôle de contrôle de la réponse immunitaire à l'induction de l'épuisement des lymphocytes T.

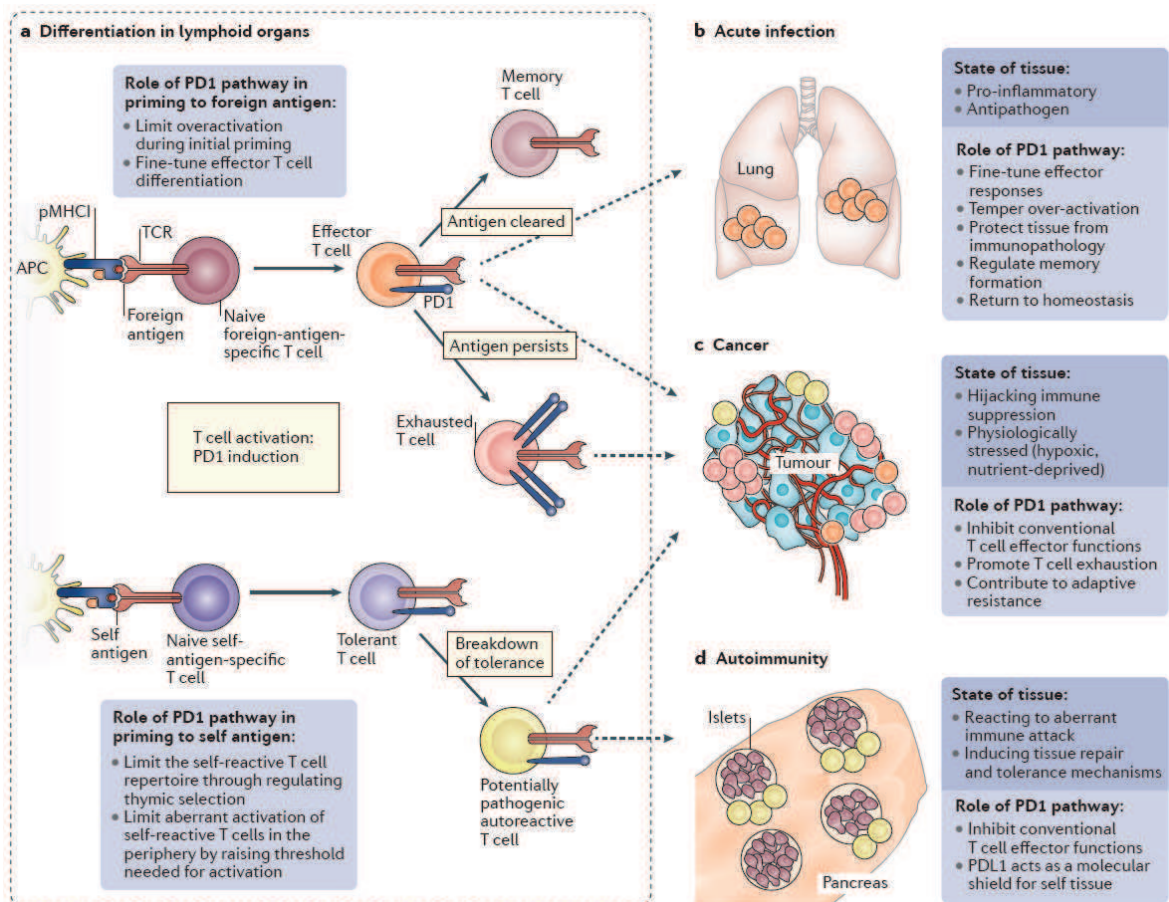


Figure 21: Rôles de PD-1 dans les infections aiguës, la tolérance et le cancer (430).

Notre modèle d'altérations induites par l'activation présente des similitudes avec le modèle de tolérance à l'endotoxine, qui mime les altérations monocytaires induites par le sepsis (431). En effet, suite à une première activation *ex vivo* du TCR, les lymphocytes T ne répondent plus à une seconde activation : leur prolifération et leur production de cytokines sont altérées. Le modèle de tolérance à l'endotoxine comporte également deux stimulations identiques. Des cellules mononuclées du sang périphérique (« Peripheral Blood Mononuclear Cells » [PBMC]) de volontaires sains sont stimulées une première fois *ex vivo* par du LPS. Puis, lors d'une seconde stimulation par du LPS, les monocytes ne

produisent plus de cytokines pro-inflammatoires (174). En revanche, leur production d'IL-10 est augmentée, illustrant le fait que les monocytes sont encore activables mais que cette activation s'oriente vers une action anti-inflammatoire. Le terme de reprogrammation des monocytes est employé pour caractériser cette réorientation de leur fonctionnalité vers une action anti-inflammatoire (174). Cette reprogrammation s'effectue en partie via des modifications épigénétiques (432). Au vu de la similitude entre notre modèle et le modèle de tolérance à l'endotoxine, nous pouvons alors émettre l'hypothèse que ce type de reprogrammation pourrait se dérouler également au sein des lymphocytes T de patients septiques. Il serait intéressant d'évaluer le profil épigénétique des lymphocytes T de patients septiques afin de mettre en évidence une éventuelle reprogrammation.

Poujol *et al.* ont étudié la capacité du modèle de tolérance à l'endotoxine à reproduire les altérations lymphocytaires T observées chez les patients septiques à partir de PBMC de volontaires sains. La réponse des lymphocytes T dans ce modèle était altérée mais de manière indirecte. En effet, la présentation de l'antigène aux lymphocytes T était diminuée. L'activation des lymphocytes T était donc plus faible et leur réponse en prolifération et production de cytokines était ainsi diminuée. L'absence d'altérations intrinsèques des lymphocytes T dans ce modèle a été confirmée en utilisant un stimulant direct des lymphocytes T. La réponse des lymphocytes T à cette activation n'était alors pas altérée. Ce modèle ne reproduisait donc pas les altérations intrinsèques des lymphocytes T. Notre modèle d'altérations des lymphocytes T induites par l'activation est actuellement le seul modèle reproduisant les altérations intrinsèques des lymphocytes T observées dans le sepsis.

Il est également intéressant de noter que notre modèle diffère des modèles d'anergie lymphocytaires T. L'anergie est caractérisée par une activation incomplète des lymphocytes T induisant une altération de leur fonctionnalité (433). L'anergie est modélisée *ex vivo* par une stimulation CD3 seule. Les cellules ne répondent que partiellement à cette activation et deviennent dysfonctionnelles lors d'une deuxième activation, même si celle-ci est accompagnée d'une co-stimulation (434). Nous avons également testé l'activation CD3 sans co-stimulation dans notre modèle d'altérations induites par l'activation. Cette stimulation n'induit pas la présence de la population CD127^{low}PD-1^{high}. Suite à une seconde activation, les lymphocytes T stimulés via le CD3 en l'absence de co-stimulation prolifèrent normalement mais ont une production de cytokines altérée. Ainsi, une stimulation CD3 induit des altérations des lymphocytes T mais ne reproduit pas celles observées chez les patients septiques. Ce résultat indique que les lymphocytes T de patients septiques deviennent épuisés et non pas anergiques.

Au vu de la complexité de la physiopathologie du sepsis, les mécanismes induisant les altérations des lymphocytes T sont probablement multifactoriels. Ces altérations peuvent être intrinsèques aux lymphocytes T, comme c'est le cas lors de leur activation massive reproduite dans notre modèle. Ces

altérations peuvent également être extrinsèques aux lymphocytes T et provenir de facteurs solubles ou d'interactions avec d'autres cellules du système immunitaire. C'est le cas par exemple de la baisse de la présentation d'antigènes aux lymphocytes T reproduite dans le modèle de tolérance à l'endotoxine. L'IL-10 pourrait également participer au développement de ces altérations. En effet, une stimulation par l'IL-10 *ex vivo* induit une altération de la prolifération des lymphocytes T ainsi qu'une diminution de leur production d'IL-2 et d'IFN γ (435). Or, la concentration plasmatique d'IL-10 est augmentée chez les patients septiques (125, 436). Les médiateurs suppresseurs S100A8/A9 sont un autre exemple d'inducteur potentiel de l'immunosuppression des lymphocytes T. En effet, ces médiateurs sont impliqués dans l'inhibition de la fonctionnalité des lymphocytes T et leur concentration plasmatique ainsi que l'expression de leur gène sont augmentées chez les patients septiques (172, 437). Au vu de la complexité de la réponse immunitaire lors du sepsis et du grand nombre de paramètres affectés, les altérations des lymphocytes T sont donc probablement induites par un ensemble de facteurs. Notre modèle d'altérations induites par l'activation reproduit un aspect de l'induction de l'immunosuppression des lymphocytes T parmi un ensemble complexe de plusieurs paramètres.

Il est intéressant de noter que l'IL-7 permet d'améliorer la prolifération des lymphocytes T dans notre modèle comme observé *ex vivo* sur des lymphocytes T de patients septiques. Ce résultat nous permet de valider en partie notre modèle comme reproduisant les altérations lymphocytaires T induites par le sepsis. Cela suggère également que d'autres traitements immunoadjuvants potentiels ciblant les altérations lymphocytaires T pourraient être testés grâce à notre modèle. Des études complémentaires visant à mieux caractériser le modèle sont nécessaires afin de le valider de manière plus approfondie.

En particulier, dans d'autres contextes d'épuisement des lymphocytes T, les altérations du métabolisme semblent également être à l'origine de leurs altérations fonctionnelles (438). Un travail récent de notre groupe a mis en évidence le rôle central des altérations métaboliques dans les altérations des lymphocytes T induites par le sepsis (249). Suite à une activation *ex vivo*, plusieurs altérations métaboliques sont observées dans les lymphocytes T de patients en choc septique en comparaison avec des volontaires sains : la glycolyse, la phosphorylation oxydative, la production d'ATP, l'expression de GLUT1 ainsi que l'entrée du glucose dans la cellule. Lors de travaux de mise au point technique auxquels j'ai participé, la production d'ATP dans les lymphocytes T a été évaluée grâce à une méthode permettant une mesure chez des patients lymphopéniques. Lorsqu'un lymphocyte T est activé, d'importants changements dans le métabolisme de la cellule surviennent (439). En effet, les lymphocytes T ont alors un besoin plus important en énergie ce qui entraîne une augmentation de la phosphorylation oxydative, principale source de production d'énergie des lymphocytes T quiescents, mais également une augmentation très marquée de la glycolyse. On parle alors de switch métabolique.

La voie de signalisation de PD-1 semble intervenir dans le métabolisme des lymphocytes T, notamment en inhibant ce switch métabolique (440). En effet, dans un modèle de présentation prolongée d'antigènes, le besoin énergétique cellulaire était augmenté à la fois au niveau de la phosphorylation oxydative et de la glycolyse mais cette demande énergétique était limitée par un contrôle de la consommation de glucose en partie via la voie de signalisation PD-1 (438). L'expression de PD-1 est augmentée dans notre modèle d'altérations lymphocytaires T induites par l'activation et chez les patients septiques. Notre modèle pourrait donc permettre d'explorer l'aspect bioénergétique des altérations lymphocytaires T induites par le sepsis et d'étudier également le rôle de PD-1 dans ces altérations.

Conclusion et perspectives

Nos travaux ont permis d'évaluer l'expression du récepteur de l'IL-7 comme biomarqueur dans le sepsis et de mieux comprendre sa régulation. Ces résultats sont essentiels dans la perspective de l'utilisation en clinique du traitement par de l'IL-7 comme immunomodulateur. L'absence de régulation globale du CD127 à la surface des lymphocytes T de patients en choc septique est un argument supplémentaire en faveur de ce traitement. Nous avons confirmé le rôle de la concentration plasmatique de sCD127 comme marqueur de gravité dans le choc septique et, plus généralement, chez les patients de réanimation. De plus, nous avons mis en évidence l'association de l'expression des transcrits IL7R correspondant à des formes solubles avec la mortalité ainsi que la régulation intrinsèque de leur expression dans les lymphocytes T. Enfin, la proportion augmentée de lymphocytes T CD127^{low}PD-1^{high} chez les patients en choc septique en fait également un candidat potentiel comme marqueur spécifique des altérations lymphocytaires T. Des études complémentaires sont nécessaires pour une meilleure caractérisation de cette population nouvellement identifiée dans le sepsis. En effet, la fonctionnalité de ces cellules n'a pas été évaluée spécifiquement dans notre étude. Afin de déterminer si cette sous-population de lymphocytes T est épuisée, nous envisageons de trier ces cellules et de mesurer leur fonctionnalité suite à une activation *ex vivo*. Une étude transcriptomique pourrait également permettre de mieux caractériser cette sous-population. De plus, évaluer son profil épigénétique pourrait mettre en évidence une éventuelle reprogrammation des lymphocytes T dans le sepsis, à l'image de celle observée dans les monocytes.

Dans un deuxième temps, nous avons développé un modèle d'altérations induites par l'activation à partir de lymphocytes T purifiés de volontaires sains reproduisant les altérations observées chez les patients en choc septique. Suite à une première activation, les lymphocytes T présentaient les altérations phénotypiques observées chez les patients. Leur prolifération ainsi que leur production de cytokines étaient ensuite altérées lors d'une seconde activation. La présence de la sous-population CD127^{low}PD-1^{high} dans notre modèle nous permet de l'étudier via cet outil sans dépendre des prélèvements de patients ni d'être limité par la lymphopénie présente chez la majorité d'entre eux. De plus, ce modèle est un outil qui pourra permettre de mieux comprendre la physiopathologie des altérations lymphocytaires T dans le sepsis et de tester des traitements immunomodulateurs innovants. Les altérations métaboliques étant récemment proposées comme inducteurs de l'épuisement et au vu de la présence de ces altérations chez les patients septiques, nous mesurons actuellement des paramètres bioénergétiques afin d'évaluer si notre modèle reproduit également les altérations métaboliques des lymphocytes T. De plus, notre modèle induit une surexpression de PD-1 alors que sa

voie de signalisation semble être impliquée dans les altérations métaboliques lors de l'épuisement des lymphocytes T. Il serait donc intéressant de tester l'effet de traitements anti-PD-1 sur les altérations des lymphocytes T induites par l'activation dans notre modèle.

Références

1. Singer, M., C. S. Deutschman, C. W. Seymour, M. Shankar-Hari, D. Annane, M. Bauer, R. Bellomo, G. R. Bernard, J.-D. Chiche, C. M. Coopersmith, R. S. Hotchkiss, M. M. Levy, J. C. Marshall, G. S. Martin, S. M. Opal, G. D. Rubenfeld, T. van der Poll, J.-L. Vincent, and D. C. Angus. 2016. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 315: 801.
2. Fleischmann, C., A. Scherag, N. K. J. Adhikari, C. S. Hartog, T. Tsaganos, P. Schlattmann, D. C. Angus, K. Reinhart, and International Forum of Acute Care Trialists. 2016. Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 193: 259–272.
3. Vincent, J.-L., J. C. Marshall, S. A. Ñamendys-Silva, B. François, I. Martin-Loeches, J. Lipman, K. Reinhart, M. Antonelli, P. Pickkers, H. Njimi, E. Jimenez, and Y. Sakr. 2014. Assessment of the worldwide burden of critical illness: the Intensive Care Over Nations (ICON) audit. *Lancet Respir. Med.* 2: 380–386.
4. Hotchkiss, R. S., G. Monneret, and D. Payen. 2013. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* 13: 862–874.
5. Boomer, J. S., J. Shuherk-Shaffer, R. S. Hotchkiss, and J. M. Green. 2012. A prospective analysis of lymphocyte phenotype and function over the course of acute sepsis. *Crit. Care* 16: R112.
6. Heidecke, C. D., H. Weighardt, T. Hensler, H. Bartels, and B. Holzmann. 2000. [Immune paralysis of T-lymphocytes and monocytes in postoperative abdominal sepsis. Correlation of immune function with survival]. *Chir. Z. Für Alle Geb. Oper. Medizin* 71: 159–165.
7. Unsinger, J., M. McGlynn, K. R. Kasten, A. S. Hoekzema, E. Watanabe, J. T. Muenzer, J. S. McDonough, J. Tschoep, T. A. Ferguson, J. E. McDunn, M. Morre, D. A. Hildeman, C. C. Caldwell, and R. S. Hotchkiss. 2010. IL-7 promotes T cell viability, trafficking, and functionality and improves survival in sepsis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 184: 3768–3779.
8. Venet, F., A.-P. Foray, A. Villars-Méchin, C. Malcus, F. Poitevin-Later, A. Lepape, and G. Monneret. 2012. IL-7 Restores Lymphocyte Functions in Septic Patients. *J. Immunol.* 189: 5073–5081.
9. Francois, B., R. Jeannet, T. Daix, A. H. Walton, M. S. Shotwell, J. Unsinger, G. Monneret, T. Rimmelé, T. Blood, M. Morre, A. Gregoire, G. A. Mayo, J. Blood, S. K. Durum, E. R. Sherwood, and R. S. Hotchkiss. 2018. Interleukin-7 restores lymphocytes in septic shock: the IRIS-7 randomized clinical trial. *JCI Insight* 3.
10. Mazzucchelli, R., and S. K. Durum. 2007. Interleukin-7 receptor expression: intelligent design. *Nat. Rev. Immunol.* 7: 144–154.
11. Rose, T., O. Lambotte, C. Pallier, J.-F. Delfraissy, and J.-H. Colle. 2009. Identification and Biochemical Characterization of Human Plasma Soluble IL-7R: Lower Concentrations in HIV-1-Infected Patients. *J. Immunol.* 182: 7389–7397.

12. Demaret, J., A. Villars-Méchin, A. Lepape, J. Plassais, H. Vallin, C. Malcus, F. Poitevin-Later, G. Monneret, and F. Venet. 2014. Elevated plasmatic level of soluble IL-7 receptor is associated with increased mortality in septic shock patients. *Intensive Care Med.* 40: 1089–1096.
13. Wherry, E. J. 2011. T cell exhaustion. *Nat. Immunol.* 12: 492–499.
14. McKinney, E. F., J. C. Lee, D. R. W. Jayne, P. A. Lyons, and K. G. C. Smith. 2015. T-cell exhaustion, co-stimulation and clinical outcome in autoimmunity and infection. *Nature* 523: 612–616.
15. Bone, R. C., R. A. Balk, F. B. Cerra, R. P. Dellinger, A. M. Fein, W. A. Knaus, R. M. Schein, and W. J. Sibbald. 1992. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 101: 1644–1655.
16. Levy, M. M., M. P. Fink, J. C. Marshall, E. Abraham, D. Angus, D. Cook, J. Cohen, S. M. Opal, J.-L. Vincent, G. Ramsay, and SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS. 2003. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit. Care Med.* 31: 1250–1256.
17. Kleinpell, R. M., C. A. Schorr, and R. A. Balk. 2016. The New Sepsis Definitions: Implications for Critical Care Practitioners. *Am. J. Crit. Care* 25: 457–464.
18. Brun-Buisson, C. 2006. [Epidemiology of severe sepsis]. *Presse Médicale Paris Fr.* 1983 35: 513–520.
19. Gaieski, D. F., J. M. Edwards, M. J. Kallan, and B. G. Carr. 2013. Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the United States. *Crit. Care Med.* 41: 1167–1174.
20. Iwashyna, T. J., C. R. Cooke, H. Wunsch, and J. M. Kahn. 2012. Population burden of long-term survivorship after severe sepsis in older Americans. *J. Am. Geriatr. Soc.* 60: 1070–1077.
21. Group, T. E. S. 2004. EPISEPSIS: a reappraisal of the epidemiology and outcome of severe sepsis in French intensive care units. *Intensive Care Med.* 30: 580–588.
22. Sterling, S. A., M. A. Puskarich, A. F. Glass, F. Guirgis, and A. E. Jones. 2017. The Impact of the Sepsis-3 Septic Shock Definition on Previously Defined Septic Shock Patients*. *Crit. Care Med.* 45: 1436.
23. Mellhammar, L., S. Wullt, Å. Lindberg, P. Lanbeck, B. Christensson, and A. Linder. 2016. Sepsis Incidence: A Population-Based Study. *Open Forum Infect. Dis.* 3: ofw207.
24. Torio, C. M., and R. M. Andrews. 2006. National Inpatient Hospital Costs: The Most Expensive Conditions by Payer, 2011. In *Healthcare Cost and Utilization Project (HCUP) Statistical Briefs* Agency for Healthcare Research and Quality (US).
25. Adrie, C., C. Alberti, C. Chaix-Couturier, E. Azoulay, A. De Lassence, Y. Cohen, P. Meshaka, C. Cheval, M. Thuong, G. Troché, M. Garrouste-Orgeas, and J.-F. Timsit. 2005. Epidemiology and economic evaluation of severe sepsis in France: age, severity, infection site, and place of acquisition (community, hospital, or intensive care unit) as determinants of workload and cost. *J. Crit. Care* 20: 46–58.

26. Weycker, D., K. S. Akhras, J. Edelsberg, D. C. Angus, and G. Oster. 2003. Long-term mortality and medical care charges in patients with severe sepsis. *Crit. Care Med.* 31: 2316–2323.
27. Rudd, K. E., A. Delaney, and S. Finfer. 2017. Counting Sepsis, an Imprecise but Improving Science. *JAMA* 318: 1228.
28. Liu, L., S. Oza, D. Hogan, J. Perin, I. Rudan, J. E. Lawn, S. Cousens, C. Mathers, and R. E. Black. 2015. Global, regional, and national causes of child mortality in 2000–13, with projections to inform post-2015 priorities: an updated systematic analysis. *The Lancet* 385: 430–440.
29. Pawar, A., A. Raut, V. Kalrao, J. Jacob, I. Godha, and R. Thomas. 2016. Etiology and Clinical Outcomes of Neonatal and Pediatric Sepsis. *Arch. Pediatr. Infect. Dis.* 4: e33602.
30. Hsia, R. Y., N. A. Mbembati, S. Macfarlane, and M. E. Kruk. 2012. Access to emergency and surgical care in sub-Saharan Africa: the infrastructure gap. *Health Policy Plan.* 27: 234–244.
31. Baelani, I., S. Jochberger, T. Laimer, D. Otieno, J. Kabutu, I. Wilson, T. Baker, and M. W. Dünser. 2011. Availability of critical care resources to treat patients with severe sepsis or septic shock in Africa: a self-reported, continent-wide survey of anaesthesia providers. *Crit. Care* 15: R10.
32. Baker, T., E. Lugazia, J. Eriksen, V. Mwafongo, L. Irestedt, and D. Konrad. 2013. Emergency and critical care services in Tanzania: a survey of ten hospitals. *BMC Health Serv. Res.* 13: 140.
33. Linder, A., D. Guh, J. H. Boyd, K. R. Walley, A. H. Anis, and J. A. Russell. 2014. Long-term (10-year) mortality of younger previously healthy patients with severe sepsis/septic shock is worse than that of patients with nonseptic critical illness and of the general population. *Crit. Care Med.* 42: 2211–2218.
34. Wang, H. E., J. M. Szychowski, R. Griffin, M. M. Safford, N. I. Shapiro, and G. Howard. 2014. Long-term mortality after community-acquired sepsis: a longitudinal population-based cohort study. *BMJ Open* 4: e004283.
35. Friedman, G., E. Silva, and J. L. Vincent. 1998. Has the mortality of septic shock changed with time. *Crit. Care Med.* 26: 2078–2086.
36. Martin, G. S., D. M. Mannino, S. Eaton, and M. Moss. 2003. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N. Engl. J. Med.* 348: 1546–1554.
37. Delaloye, J., and T. Calandra. 2014. Invasive candidiasis as a cause of sepsis in the critically ill patient. *Virulence* 5: 161–169.
38. Carlet, J., A. Ben Ali, and A. Chalfine. 2004. Epidemiology and control of antibiotic resistance in the intensive care unit. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 17: 309–316.
39. Paul, M., V. Shani, E. Muchtar, G. Kariv, E. Robenshtok, and L. Leibovici. 2010. Systematic Review and Meta-Analysis of the Efficacy of Appropriate Empiric Antibiotic Therapy for Sepsis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54: 4851–4863.

40. de Prost, N., K. Razazi, and C. Brun-Buisson. 2013. Unrevealing culture-negative severe sepsis. *Crit. Care* 17: 1001.
41. Phua, J., W. J. Ngerng, K. C. See, C. K. Tay, T. Kiong, H. F. Lim, M. Y. Chew, H. S. Yip, A. Tan, H. J. Khalizah, R. Capistrano, K. H. Lee, and A. Mukhopadhyay. 2013. Characteristics and outcomes of culture-negative versus culture-positive severe sepsis. *Crit. Care* 17: R202.
42. Esper, A. M., M. Moss, C. A. Lewis, R. Nisbet, D. M. Mannino, and G. S. Martin. 2006. The role of infection and comorbidity: Factors that influence disparities in sepsis. *Crit. Care Med.* 34: 2576–2582.
43. Angus, D. C., W. T. Linde-Zwirble, J. Lidicker, G. Clermont, J. Carcillo, and M. R. Pinsky. 2001. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit. Care Med.* 29: 1303–1310.
44. Martin, G. S., D. M. Mannino, and M. Moss. 2006. The effect of age on the development and outcome of adult sepsis. *Crit. Care Med.* 34: 15–21.
45. Danai, P. A., M. Moss, D. M. Mannino, and G. S. Martin. 2006. The epidemiology of sepsis in patients with malignancy. *Chest* 129: 1432–1440.
46. Mrus, J. M., L. Braun, M. S. Yi, W. T. Linde-Zwirble, and J. A. Johnston. 2005. Impact of HIV/AIDS on care and outcomes of severe sepsis. *Crit. Care* 9: R623–R630.
47. Galbois, A., P. Aegerter, P. Martel-Samb, C. Housset, D. Thabut, G. Offenstadt, H. Ait-Oufella, E. Maury, B. Guidet, and Collège des Utilisateurs des Bases des données en Réanimation (CUB-Réa) Group. 2014. Improved prognosis of septic shock in patients with cirrhosis: a multicenter study*. *Crit. Care Med.* 42: 1666–1675.
48. Esper, A. M., M. Moss, and G. S. Martin. 2009. The effect of diabetes mellitus on organ dysfunction with sepsis: an epidemiological study. *Crit. Care* 13: R18.
49. Schuetz, P., P. Castro, and N. I. Shapiro. 2011. Diabetes and Sepsis: Preclinical Findings and Clinical Relevance. *Diabetes Care* 34: 771–778.
50. Stegenga, M. E., J.-L. Vincent, G. M. Vail, J. Xie, D. J. Haney, M. D. Williams, G. R. Bernard, and T. van der Poll. 2010. Diabetes does not alter mortality or hemostatic and inflammatory responses in patients with severe sepsis*. *Crit. Care Med.* 38: 539.
51. Falagas, M. E., and M. Kompoti. 2006. Obesity and infection. *Lancet Infect. Dis.* 6: 438–446.
52. Kolyva, A. S., V. Zolota, D. Mpatsoulis, G. Skroubis, E. E. Solomou, I. G. Habeos, S. F. Assimakopoulos, N. Goutzourelas, D. Kouretas, and C. A. Gogos. 2014. The role of obesity in the immune response during sepsis. *Nutr. Diabetes* 4: e137.
53. Shane, A. L., and B. J. Stoll. 2014. Neonatal sepsis: Progress towards improved outcomes. *J. Infect.* 68: S24–S32.

54. Sørensen, T. I. A., G. G. Nielsen, P. K. Andersen, and T. W. Teasdale. 1988. Genetic and Environmental Influences on Premature Death in Adult Adoptees. *N. Engl. J. Med.* 318: 727–732.
55. Netea, M. G., and J. W. M. van der Meer. 2011. Immunodeficiency and Genetic Defects of Pattern-Recognition Receptors. *N. Engl. J. Med.* 364: 60–70.
56. Meyer, N. J. 2015. Finding a Needle in the Haystack: Leveraging Bioinformatics to Identify a Functional Genetic Risk Factor for Sepsis Death. *Crit. Care Med.* 43: 242–243.
57. Lorenz, E., J. P. Mira, K. L. Frees, and D. A. Schwartz. 2002. Relevance of Mutations in the TLR4 Receptor in Patients With Gram-Negative Septic Shock. *Arch. Intern. Med.* 162: 1028.
58. Agnese, D. M., J. E. Calvano, S. J. Hahm, S. M. Coyle, S. A. Corbett, S. E. Calvano, and S. F. Lowry. 2002. Human toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections. *J. Infect. Dis.* 186: 1522–1525.
59. Nakada, T., J. A. Russell, J. H. Boyd, S. A. Thair, and K. R. Walley. 2015. Identification of a nonsynonymous polymorphism in the SVEP1 gene associated with altered clinical outcomes in septic shock. *Crit. Care Med.* 43: 101–108.
60. Rautanen, A., T. C. Mills, A. C. Gordon, P. Hutton, M. Steffens, R. Nuamah, J.-D. Chiche, T. Parks, S. J. Chapman, E. E. Davenport, K. S. Elliott, J. Bion, P. Lichtner, T. Meitinger, T. F. Wienker, M. J. Caulfield, C. Mein, F. Bloos, I. Bobek, P. Cotogni, V. Sramek, S. Sarapuu, M. Kobilay, V. M. Ranieri, J. Rello, G. Sirgo, Y. G. Weiss, S. Russwurm, E. M. Schneider, K. Reinhart, P. A. H. Holloway, J. C. Knight, C. S. Garrard, J. A. Russell, K. R. Walley, F. Stüber, A. V. S. Hill, and C. J. Hinds. 2015. Genome-wide association study of survival from sepsis due to pneumonia: an observational cohort study. *Lancet Respir. Med.* 3: 53–60.
61. Gauer, R. 2013. Early Recognition and Management of Sepsis in Adults: The First Six Hours. *Am. Fam. Physician* 88: 44–53.
62. Dellinger, R. P., M. M. Levy, J. M. Carlet, J. Bion, M. M. Parker, R. Jaeschke, K. Reinhart, D. C. Angus, C. Brun-Buisson, R. Beale, T. Calandra, J.-F. Dhainaut, H. Gerlach, M. Harvey, J. J. Marini, J. Marshall, M. Ranieri, G. Ramsay, J. Sevransky, B. T. Thompson, S. Townsend, J. S. Vender, J. L. Zimmerman, and J.-L. Vincent. 2008. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Intensive Care Med.* 34: 17–60.
63. Sundararajan, V., C. M. Macisaac, J. J. Presneill, J. F. Cade, and K. Visvanathan. 2005. Epidemiology of sepsis in Victoria, Australia. *Crit. Care Med.* 33: 71–80.
64. Carrigan, S. D., G. Scott, and M. Tabrizian. 2004. Toward Resolving the Challenges of Sepsis Diagnosis. *Clin. Chem.* 50: 1301–1314.
65. Beekmann, S. E., D. J. Diekema, K. C. Chapin, and G. V. Doern. 2003. Effects of Rapid Detection of Bloodstream Infections on Length of Hospitalization and Hospital Charges. *J. Clin. Microbiol.* 41: 3119–3125.

66. Procop, G. W. 2007. Molecular Diagnostics for the Detection and Characterization of Microbial Pathogens. *Clin. Infect. Dis.* 45: S99–S111.
67. Gendrel, D., and C. Bohuon. 1997. Procalcitonin, a marker of bacterial infection. *Infection* 25: 133–134.
68. Jin, M., and A. I. Khan. 2010. Procalcitonin: Uses in the Clinical Laboratory for the Diagnosis of Sepsis. *Lab. Med.* 41: 173–177.
69. Pierrakos, C., and J.-L. Vincent. 2010. Sepsis biomarkers: a review. *Crit. Care Lond. Engl.* 14: R15.
70. Dellinger, R. P., J. M. Carlet, H. Masur, H. Gerlach, T. Calandra, J. Cohen, J. Gea-Banacloche, D. Keh, J. C. Marshall, M. M. Parker, G. Ramsay, J. L. Zimmerman, J.-L. Vincent, M. M. Levy, and Surviving Sepsis Campaign Management Guidelines Committee. 2004. Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Crit. Care Med.* 32: 858–873.
71. Dellinger, R. P., M. M. Levy, A. Rhodes, D. Annane, H. Gerlach, S. M. Opal, J. E. Sevransky, C. L. Sprung, I. S. Douglas, R. Jaeschke, T. M. Osborn, M. E. Nunnally, S. R. Townsend, K. Reinhart, R. M. Kleinpell, D. C. Angus, C. S. Deutschman, F. R. Machado, G. D. Rubenfeld, S. Webb, R. J. Beale, J.-L. Vincent, R. Moreno, and Surviving Sepsis Campaign Guidelines Committee including The Pediatric Subgroup. 2013. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. *Intensive Care Med.* 39: 165–228.
72. Rhodes, A., L. E. Evans, W. Alhazzani, M. M. Levy, M. Antonelli, R. Ferrer, A. Kumar, J. E. Sevransky, C. L. Sprung, M. E. Nunnally, B. Rochwerg, G. D. Rubenfeld, D. C. Angus, D. Annane, R. J. Beale, G. J. Bellingham, G. R. Bernard, J.-D. Chiche, C. Coopersmith, D. P. D. Backer, C. J. French, S. Fujishima, H. Gerlach, J. L. Hidalgo, S. M. Hollenberg, A. E. Jones, D. R. Karnad, R. M. Kleinpell, Y. Koh, T. C. Lisboa, F. R. Machado, J. J. Marini, J. C. Marshall, J. E. Mazuski, L. A. McIntyre, A. S. McLean, S. Mehta, R. P. Moreno, J. Myburgh, P. Navalesi, O. Nishida, T. M. Osborn, A. Perner, C. M. Plunkett, M. Ranieri, C. A. Schorr, M. A. Seckel, C. W. Seymour, L. Shieh, K. A. Shukri, S. Q. Simpson, M. Singer, B. T. Thompson, S. R. Townsend, T. V. der Poll, J.-L. Vincent, W. J. Wiersinga, J. L. Zimmerman, and R. P. Dellinger. 2017. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Intensive Care Med.* 1–74.
73. Wang, Z., Y. Xiong, C. Schorr, and R. P. Dellinger. 2013. Impact of sepsis bundle strategy on outcomes of patients suffering from severe sepsis and septic shock in china. *J. Emerg. Med.* 44: 735–741.
74. Gotts, J. E., and M. A. Matthay. 2016. Sepsis: pathophysiology and clinical management. *BMJ* 353: i1585.
75. Ferrer, R., I. Martin-Loeches, G. Phillips, T. M. Osborn, S. Townsend, R. P. Dellinger, A. Artigas, C. Schorr, and M. M. Levy. 2014. Empiric Antibiotic Treatment Reduces Mortality in Severe Sepsis and

Septic Shock From the First Hour: Results From a Guideline-Based Performance Improvement Program*. *Crit. Care Med.* 42: 1749.

76. Gaijeski, D. F., M. E. Mikkelsen, R. A. Band, J. M. Pines, R. Massone, F. F. Furia, F. S. Shofer, and M. Goyal. 2010. Impact of time to antibiotics on survival in patients with severe sepsis or septic shock in whom early goal-directed therapy was initiated in the emergency department. *Crit. Care Med.* 38: 1045–1053.

77. Weiss, S. L., J. C. Fitzgerald, F. Balamuth, E. R. Alpern, J. Lavelle, M. Chilutti, R. Grundmeier, V. M. Nadkarni, and N. J. Thomas. 2014. Delayed Antimicrobial Therapy Increases Mortality and Organ Dysfunction Duration in Pediatric Sepsis. *Crit. Care Med.* 42: 2409–2417.

78. Roberts, J. A., S. K. Paul, M. Akova, M. Bassetti, D. Waele, J. J. G. Dimopoulos, K.-M. Kaukonen, D. Koulenti, C. Martin, P. Montravers, J. Rello, A. Rhodes, T. Starr, S. C. Wallis, J. Lipman, J. A. Roberts, J. Lipman, T. Starr, S. C. Wallis, S. K. Paul, A. Margarit Ribas, D. Waele, J. J. L. De Crop, H. Spapen, J. Wauters, T. Dugernier, P. Jorens, I. Dapper, D. De Backer, F. S. Taccone, J. Rello, L. Ruano, E. Afonso, F. Alvarez-Lerma, M. P. Gracia-Arnillas, F. Fernández, N. Feijoo, N. Bardolet, A. Rovira, P. Garro, D. Colon, C. Castillo, J. Fernando, M. J. Lopez, J. L. Fernandez, A. M. Arribas, J. L. Teja, E. Ots, J. Carlos Montejo, M. Catalan, I. Prieto, G. Gonzalo, B. Galvan, M. A. Blasco, E. Meyer, F. Del Nogal, L. Vidaur, R. Sebastian, P. M. Garde, M. Velasco, M. del Mar, R. Zaragoza Crespo, M. Esperatti, A. Torres, P. Montravers, O. Baldesi, H. Dupont, Y. Mahjoub, S. Lasocki, J. M. Constantin, J. F. Payen, C. Martin, J. Albanese, Y. Malledant, J. Pottecher, J.-Y. Lefrant, S. Jaber, O. Joannes-Boyau, C. Orban, M. Ostermann, C. McKenzie, W. Berry, J. Smith, K. Lei, F. Rubulotta, A. Gordon, S. Brett, M. Stotz, M. Templeton, A. Rhodes, C. Ebn, C. Moran, K.-M. Kaukonen, V. Pettilä, G. Dimopoulos, D. Koulenti, A. Xristodoulou, V. Theodorou, G. Kouliatsis, E. Sertaridou, G. Anthopoulos, G. Choutas, T. Rantis, S. Karatzas, M. Balla, M. Papanikolaou, P. Myrianthefs, A. Gavala, G. Fildisis, A. Koutsoukou, M. Kyriakopoulou, K. Petrochilou, M. Kompoti, M. Michalia, F.-M. Clouva-Molyvdas, G. Gkiokas, F. Nikolakopoulos, V. Psychogiou, P. Malliotakis, E. Akoumianaki, E. Lilitsis, V. Koulouras, G. Nakos, M. Kalogirou, A. Komnos, T. Zafeiridis, C. Chaintoutis, K. Arvaniti, D. Matamis, C. Chaintoutis, C. Kydona, N. Gritsi-Gerogianni, T. Giasnetsova, M. Giannakou, I. Soultati, I. Chytas, E. Antoniadou, E. Antipa, D. Lathyris, T. Koukoubani, T. Paraforou, K. Spiropoulou, V. Bekos, A. Spring, T. Kalatzi, H. Nikolaou, M. Laskou, I. Strouvalis, S. Aloizos, S. Kapogiannis, O. Soldatou, M. Bassetti, C. Adembri, G. Villa, A. Giarratano, S. Maurizio Raineri, A. Cortegiani, F. Montalto, M. T. Strano, V. M. Ranieri, C. Sandroni, G. De Pascale, A. Molin, P. Pelosi, L. Montagnani, R. Urbino, I. Mastromauro, D. Rosa, F. G. V. M. Ranieri, T. Cardoso, S. Afonso, J. Gonçalves-Pereira, J. P. Baptista, M. Akova, and A. Özveren. 2014. DALI: Defining Antibiotic Levels in Intensive Care Unit Patients: Are Current β -Lactam Antibiotic Doses Sufficient for Critically Ill Patients? *Clin. Infect. Dis.* 58: 1072–1083.

79. Paepe, P. D., F. M. Belpaire, and W. A. Buylaert. 2002. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Considerations When Treating Patients with Sepsis and Septic Shock. *Clin. Pharmacokinet.* 41: 1135–1151.
80. Zanotti Cavazzoni, S. L., and R. P. Dellinger. 2006. Hemodynamic optimization of sepsis-induced tissue hypoperfusion. *Crit. Care* 10: S2.
81. Angus, D. C., A. E. Barnato, D. Bell, R. Bellomo, C.-R. Chong, T. J. Coats, A. Davies, A. Delaney, D. A. Harrison, A. Holdgate, B. Howe, D. T. Huang, T. Iwashyna, J. A. Kellum, S. L. Peake, F. Pike, M. C. Reade, K. M. Rowan, M. Singer, S. a. R. Webb, L. A. Weissfeld, D. M. Yealy, and J. D. Young. 2015. A systematic review and meta-analysis of early goal-directed therapy for septic shock: the ARISE, ProCESS and ProMISE Investigators. *Intensive Care Med.* 41: 1549–1560.
82. Farid Sadaka, Mayrol Juarez, Soophia Naydenov, and Jacklyn O'Brien. 2014. Fluid Resuscitation in Septic Shock: The Effect of Increasing Fluid Balance on Mortality. *J. Intensive Care Med.* 29: 213–217.
83. Cecconi, M., C. Hofer, J.-L. Teboul, V. Pettila, E. Wilkman, Z. Molnar, G. Della Rocca, C. Aldecoa, A. Artigas, S. Jog, M. Sander, C. Spies, J.-Y. Lefrant, and D. De Backer. 2015. Fluid challenges in intensive care: the FENICE study. *Intensive Care Med.* 41: 1529–1537.
84. Yunos, N. M., R. Bellomo, C. Hegarty, D. Story, L. Ho, and M. Bailey. 2012. Association Between a Chloride-Liberal vs Chloride-Restrictive Intravenous Fluid Administration Strategy and Kidney Injury in Critically Ill Adults. *JAMA* 308: 1566–1572.
85. Choi, P. T., G. Yip, L. G. Quinonez, and D. J. Cook. 1999. Crystalloids vs. colloids in fluid resuscitation: a systematic review. *Crit. Care Med.* 27: 200–210.
86. Schierhout, G., and I. Roberts. 1998. Fluid resuscitation with colloid or crystalloid solutions in critically ill patients: a systematic review of randomised trials. *BMJ* 316: 961–964.
87. LeDoux, D., M. E. Astiz, C. M. Carpati, and E. C. Rackow. 2000. Effects of perfusion pressure on tissue perfusion in septic shock. *Crit. Care Med.* 28: 2729–2732.
88. Sato, R., and M. Nasu. 2017. Time to re-think the use of dobutamine in sepsis. *J. Intensive Care* 5: 65.
89. Rimmelé, T., and J. A. Kellum. 2012. High-volume hemofiltration in the intensive care unit: a blood purification therapy. *Anesthesiology* 116: 1377–1387.
90. Call, D. R., J. A. Nemzek, S. J. Ebong, G. L. Bolgos, D. E. Newcomb, and D. G. Remick. 2001. Ratio of Local to Systemic Chemokine Concentrations Regulates Neutrophil Recruitment. *Am. J. Pathol.* 158: 715–721.
91. Ratanarat, R., A. Brendolan, P. Piccinni, M. Dan, G. Salvatori, Z. Ricci, and C. Ronco. 2005. Pulse high-volume haemofiltration for treatment of severe sepsis: effects on hemodynamics and survival. *Crit. Care* 9: R294–R302.

92. Marik, P. E., and M. Raghavan. 2004. Stress-hyperglycemia, insulin and immunomodulation in sepsis. *Intensive Care Med.* 30: 748–756.
93. Annane, D., A. Renault, C. Brun-Buisson, B. Megarbane, J.-P. Quenot, S. Siami, A. Cariou, X. Forceville, C. Schwebel, C. Martin, J.-F. Timsit, B. Misset, M. A. Benali, G. Colin, B. Souweine, K. Asehnoune, E. Mercier, L. Chimot, C. Charpentier, B. François, T. Boulain, F. Petitpas, J.-M. Constantin, G. Dhonneur, F. Baudin, A. Combes, J. Bohé, J.-F. Loriferne, R. Amathieu, F. Cook, M. Slama, O. Leroy, G. Capellier, A. Dargent, T. Hissem, V. Maxime, and E. Bellissant. 2018. Hydrocortisone plus Fludrocortisone for Adults with Septic Shock. *N. Engl. J. Med.* 378: 809–818.
94. Venkatesh, B., S. Finfer, J. Cohen, D. Rajbhandari, Y. Arabi, R. Bellomo, L. Billot, M. Correa, P. Glass, M. Harward, C. Joyce, Q. Li, C. McArthur, A. Perner, A. Rhodes, K. Thompson, S. Webb, and J. Myburgh. 2018. Adjunctive Glucocorticoid Therapy in Patients with Septic Shock. *N. Engl. J. Med.* 378: 797–808.
95. Ward, N. S., B. Casserly, and A. Ayala. 2008. The Compensatory Anti-inflammatory Response syndrome (CARS) in Critically ill patients. *Clin. Chest Med.* 29: 617–viii.
96. van der Poll, T., F. L. van de Veerdonk, B. P. Scicluna, and M. G. Netea. 2017. The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. *Nat. Rev. Immunol.* 17: 407–420.
97. van der Poll, T., and S. M. Opal. 2008. Host-pathogen interactions in sepsis. *Lancet Infect. Dis.* 8: 32–43.
98. Bianchi, M. E. 2007. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J. Leukoc. Biol.* 81: 1–5.
99. Wiersinga, W. J., S. J. Leopold, D. R. Cranendonk, and T. van der Poll. 2014. Host innate immune responses to sepsis. *Virulence* 5: 36–44.
100. McInturff, J. E., R. L. Modlin, and J. Kim. 2005. The Role of Toll-like Receptors in the Pathogenesis and Treatment of Dermatological Disease. *J. Invest. Dermatol.* 125: 1–8.
101. Wade, W. F. 2015. Chapter 26 - Pattern Recognition Receptors and the Innate Immune Network. In *Molecular Medical Microbiology (Second Edition)* Y.-W. Tang, M. Sussman, D. Liu, I. Poxton, and J. Schwartzman, eds. Academic Press, Boston. 449–474.
102. Lee, S. M. Y., K.-H. Kok, M. Jaume, T. K. W. Cheung, T.-F. Yip, J. C. C. Lai, Y. Guan, R. G. Webster, D.-Y. Jin, and J. S. M. Peiris. 2014. Toll-like receptor 10 is involved in induction of innate immune responses to influenza virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111: 3793–3798.
103. Dobrovolskaia, M. A., and S. N. Vogel. 2002. Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. *Microbes Infect. Inst. Pasteur* 4: 903–914.
104. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124: 783–801.

105. O'Neill, L. A. J., D. Golenbock, and A. G. Bowie. 2013. The history of Toll-like receptors — redefining innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 13: 453.
106. Kawai, T., and S. Akira. 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* 11: 373–384.
107. Tidswell, M., W. Tillis, S. P. Larosa, M. Lynn, A. E. Wittek, R. Kao, J. Wheeler, J. Gogate, S. M. Opal, and Eritoran Sepsis Study Group. 2010. Phase 2 trial of eritoran tetrasodium (E5564), a toll-like receptor 4 antagonist, in patients with severe sepsis. *Crit. Care Med.* 38: 72–83.
108. Opal, S. M., P.-F. Laterre, B. Francois, S. P. LaRosa, D. C. Angus, J.-P. Mira, X. Wittebole, T. Dugernier, D. Perrotin, M. Tidswell, L. Jauregui, K. Krell, J. Pacht, T. Takahashi, C. Peckelsen, E. Cordasco, C.-S. Chang, S. Oeyen, N. Aikawa, T. Maruyama, R. Schein, A. C. Kalil, M. Van Nuffelen, M. Lynn, D. P. Rossignol, J. Gogate, M. B. Roberts, J. L. Wheeler, J.-L. Vincent, and ACCESS Study Group. 2013. Effect of eritoran, an antagonist of MD2-TLR4, on mortality in patients with severe sepsis: the ACCESS randomized trial. *JAMA* 309: 1154–1162.
109. Netea, M. G., C. Wijmenga, and L. A. J. O'Neill. 2012. Genetic variation in Toll-like receptors and disease susceptibility. *Nat. Immunol.* 13: 535–542.
110. Wurfel, M. M., A. C. Gordon, T. D. Holden, F. Radella, J. Strout, O. Kajikawa, J. T. Ruzinski, G. Rona, R. A. Black, S. Stratton, G. P. Jarvik, A. M. Hajjar, D. A. Nickerson, M. Rieder, J. Sevransky, J. P. Maloney, M. Moss, G. Martin, C. Shanholtz, J. G. N. Garcia, L. Gao, R. Brower, K. C. Barnes, K. R. Walley, J. A. Russell, and T. R. Martin. 2008. Toll-like Receptor 1 Polymorphisms Affect Innate Immune Responses and Outcomes in Sepsis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 178: 710–720.
111. Fritz, J. H., R. L. Ferrero, D. J. Philpott, and S. E. Girardin. 2006. Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nat. Immunol.* 7: 1250.
112. Stutz, A., D. T. Golenbock, and E. Latz. 2009. Inflammasomes: too big to miss. *J. Clin. Invest.* 119: 3502–3511.
113. Schroder, K., and J. Tschopp. 2010. The inflammasomes. *Cell* 140: 821–832.
114. Yamasaki, S., E. Ishikawa, M. Sakuma, H. Hara, K. Ogata, and T. Saito. 2008. Mincle is an ITAM-coupled activating receptor that senses damaged cells. *Nat. Immunol.* 9: 1179–1188.
115. de Rivero Vaccari, J. C., F. J. Brand, A. F. Berti, O. F. Alonso, M. R. Bullock, and J. P. de Rivero Vaccari. 2014. Mincle Signaling in the Innate Immune Response after Traumatic Brain Injury. *J. Neurotrauma* 32: 228–236.
116. Suzuki, Y., Y. Nakano, K. Mishihiro, T. Takagi, K. Tsuruma, M. Nakamura, S. Yoshimura, M. Shimazawa, and H. Hara. 2013. Involvement of Mincle and Syk in the changes to innate immunity after ischemic stroke. *Sci. Rep.* 3: 3017.

117. Gogos, C. A., E. Drosou, H. P. Bassaris, and A. Skoutelis. 2000. Pro- versus Anti-inflammatory Cytokine Profile in Patients with Severe Sepsis: A Marker for Prognosis and Future Therapeutic Options. *J. Infect. Dis.* 181: 176–180.
118. Hong, T.-H., C.-H. Chang, W.-J. Ko, C.-F. Lin, H.-H. Liu, L.-P. Chow, C.-T. Huang, S.-L. Yu, and Y.-S. Chen. 2014. Biomarkers of early sepsis may be correlated with outcome. *J. Transl. Med.* 12: 146.
119. Spittler, A., M. Razenberger, H. Kupper, M. Kaul, W. Hackl, G. Boltz-Nitulescu, R. Függer, and E. Roth. 2000. Relationship between interleukin-6 plasma concentration in patients with sepsis, monocyte phenotype, monocyte phagocytic properties, and cytokine production. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 31: 1338–1342.
120. Flierl, M. A., D. Rittirsch, H. Gao, L. M. Hoesel, B. A. Nadeau, D. E. Day, F. S. Zetoune, J. V. Sarma, M. S. Huber-Lang, J. L. M. Ferrara, and P. A. Ward. 2008. Adverse functions of IL-17A in experimental sepsis. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 22: 2198–2205.
121. Tang, B. M., S. J. Huang, and A. S. McLean. 2010. Genome-wide transcription profiling of human sepsis: a systematic review. *Crit. Care* 14: R237.
122. Calandra, T., B. Echtenacher, D. L. Roy, J. Pugin, C. N. Metz, L. Hültner, D. Heumann, D. Männel, R. Bucala, and M. P. Glauser. 2000. Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor. *Nat. Med.* 6: 164–170.
123. Bozza, F. A., R. N. Gomes, A. M. Japiassú, M. Soares, H. C. Castro-Faria-Neto, P. T. Bozza, and M. T. Bozza. 2004. Macrophage migration inhibitory factor levels correlate with fatal outcome in sepsis. *Shock Augusta Ga* 22: 309–313.
124. CHAUDHRY, H., J. ZHOU, Y. ZHONG, M. M. ALI, F. MCGUIRE, P. S. NAGARKATTI, and M. NAGARKATTI. 2013. Role of Cytokines as a Double-edged Sword in Sepsis. *Vivo Athens Greece* 27: 669–684.
125. Monneret, G., M.-E. Finck, F. Venet, A.-L. Debard, J. Bohé, J. Bienvenu, and A. Lepape. 2004. The anti-inflammatory response dominates after septic shock: association of low monocyte HLA-DR expression and high interleukin-10 concentration. *Immunol. Lett.* 95: 193–198.
126. Cazalis, M.-A., A. Lepape, F. Venet, F. Frager, B. Mouglin, H. Vallin, M. Paye, A. Pachot, and G. Monneret. 2014. Early and dynamic changes in gene expression in septic shock patients: a genome-wide approach. *Intensive Care Med. Exp.* 2: 20.
127. Rittirsch, D., M. A. Flierl, B. A. Nadeau, D. E. Day, M. Huber-Lang, C. R. Mackay, F. S. Zetoune, N. P. Gerard, K. Cianflone, J. Köhl, C. Gerard, J. V. Sarma, and P. A. Ward. 2008. Functional roles for C5a receptors in sepsis. *Nat. Med.* 14: 551–557.
128. Laudes, I. J., J. C. Chu, S. Sikranth, M. Huber-Lang, R.-F. Guo, N. Riedemann, J. V. Sarma, A. H. Schmaier, and P. A. Ward. 2002. Anti-c5a ameliorates coagulation/fibrinolytic protein changes in a rat model of sepsis. *Am. J. Pathol.* 160: 1867–1875.

129. Huber-Lang, M., V. J. Sarma, K. T. Lu, S. R. McGuire, V. A. Padgaonkar, R.-F. Guo, E. M. Younkin, R. G. Kunkel, J. Ding, R. Erickson, J. T. Curnutte, and P. A. Ward. 2001. Role of C5a in Multiorgan Failure During Sepsis. *J. Immunol.* 166: 1193–1199.
130. Flierl, M. A., D. Rittirsch, A. J. Chen, B. A. Nadeau, D. E. Day, J. V. Sarma, M. S. Huber-Lang, and P. A. Ward. 2008. The complement anaphylatoxin C5a induces apoptosis in adrenomedullary cells during experimental sepsis. *PLoS One* 3: e2560.
131. Riedemann, N. C., R.-F. Guo, T. A. Neff, I. J. Laudes, K. A. Keller, V. J. Sarma, M. M. Markiewski, D. Mastellos, C. W. Strey, C. L. Pierson, J. D. Lambris, F. S. Zetoune, and P. A. Ward. 2002. Increased C5a receptor expression in sepsis. *J. Clin. Invest.* 110: 101–108.
132. Ward, P. A. 2010. The Harmful Role of C5a on Innate Immunity in Sepsis. *J. Innate Immun.* 2: 439–445.
133. Levi, M., and T. van der Poll. 2010. Inflammation and coagulation. *Crit. Care Med.* 38: S26–34.
134. Aras, O., A. Shet, R. R. Bach, J. L. Hysjulien, A. Slungaard, R. P. Hebbel, G. Escolar, B. Jilma, and N. S. Key. 2004. Induction of microparticle- and cell-associated intravascular tissue factor in human endotoxemia. *Blood* 103: 4545–4553.
135. Jandrot-Perrus, M. 2002. La thrombine et ses récepteurs : implications dans l'hémostase et le développement embryonnaire. *médecine/sciences* 18: 19–22.
136. Kapur, R., A. Zufferey, E. Boilard, and J. W. Semple. 2015. Nouvelle Cuisine: Platelets Served with Inflammation. *J. Immunol.* 194: 5579–5587.
137. Hunt, B. J. 2014. Bleeding and Coagulopathies in Critical Care. *N. Engl. J. Med.* 370: 847–859.
138. Danese, S., S. Vetrano, L. Zhang, V. A. Poplis, and F. J. Castellino. 2010. The protein C pathway in tissue inflammation and injury: pathogenic role and therapeutic implications. *Blood* 115: 1121–1130.
139. Barnaby, D., K. Ferrick, D. T. Kaplan, S. Shah, P. Bijur, and E. J. Gallagher. 2002. Heart rate variability in emergency department patients with sepsis. *Acad. Emerg. Med. Off. J. Soc. Acad. Emerg. Med.* 9: 661–670.
140. Pontet, J., P. Contreras, A. Curbelo, J. Medina, S. Noveri, S. Bentancourt, and E. R. Migliaro. 2003. Heart rate variability as early marker of multiple organ dysfunction syndrome in septic patients. *J. Crit. Care* 18: 156–163.
141. Rittirsch, D., M. A. Flierl, and P. A. Ward. 2008. Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat. Rev. Immunol.* 8: 776.
142. Ritter, C., M. Andrades, M. L. C. Frota, F. Bonatto, R. A. Pinho, M. Polydoro, F. Klamt, C. T. S. Pinheiro, S. S. Menna-Barreto, J. C. F. Moreira, and F. Dal-Pizzol. 2003. Oxidative parameters and mortality in sepsis induced by cecal ligation and perforation. *Intensive Care Med.* 29: 1782–1789.

143. Steckert, A. V., A. A. de Castro, J. Quevedo, and F. Dal-Pizzol. 2014. Sepsis in the central nervous system and antioxidant strategies with N-acetylcysteine, vitamins and statins. *Curr. Neurovasc. Res.* 11: 83–90.
144. Papadopoulos, M. C., D. C. Davies, R. F. Moss, D. Tighe, and E. D. Bennett. 2000. Pathophysiology of septic encephalopathy: a review. *Crit. Care Med.* 28: 3019–3024.
145. Barichello, T., R. A. Machado, L. Constantino, S. S. Valvassori, G. Z. Réus, M. R. Martins, F. Petronilho, C. Ritter, J. Quevedo, and F. Dal-Pizzol. 2007. Antioxidant treatment prevented late memory impairment in an animal model of sepsis. *Crit. Care Med.* 35: 2186–2190.
146. Nichol, A. D., M. Egi, V. Pettila, R. Bellomo, C. French, G. Hart, A. Davies, E. Stachowski, M. C. Reade, M. Bailey, and D. J. Cooper. 2010. Relative hyperlactatemia and hospital mortality in critically ill patients: a retrospective multi-centre study. *Crit. Care Lond. Engl.* 14: R25.
147. Rishu, A. H., R. Khan, H. M. Al-Dorzi, H. M. Tamim, S. Al-Qahtani, G. Al-Ghamdi, and Y. M. Arabi. 2013. Even Mild Hyperlactatemia Is Associated with Increased Mortality in Critically Ill Patients. *Crit. Care* 17: R197.
148. Nguyen, H. B., E. P. Rivers, B. P. Knoblich, G. Jacobsen, A. Muzzin, J. A. Ressler, and M. C. Tomlanovich. 2004. Early lactate clearance is associated with improved outcome in severe sepsis and septic shock. *Crit. Care Med.* 32: 1637–1642.
149. Levi, M., E. Lowenberg, and J. C. Meijers. 2010. Recombinant anticoagulant factors for adjunctive treatment of sepsis. *Semin. Thromb. Hemost.* 36: 550–557.
150. Warren, B. L., A. Eid, P. Singer, S. S. Pillay, P. Carl, I. Novak, P. Chalupa, A. Atherstone, I. Pénczes, A. Kübler, S. Knaub, H.-O. Keinecke, H. Heinrichs, F. Schindel, M. Juers, R. C. Bone, S. M. Opal, and for the K. T. S. Group. 2001. High-Dose Antithrombin III in Severe Sepsis: A Randomized Controlled Trial. *JAMA* 286: 1869–1878.
151. Marshall, J. C. 2014. Why have clinical trials in sepsis failed? *Trends Mol. Med.* 20: 195–203.
152. Cohen, J., J.-L. Vincent, N. K. J. Adhikari, F. R. Machado, D. C. Angus, T. Calandra, K. Jaton, S. Giulieri, J. Delaloye, S. Opal, K. Tracey, T. van der Poll, and E. Pelfrene. 2015. Sepsis: a roadmap for future research. *Lancet Infect. Dis.* 15: 581–614.
153. Boomer, J. S., K. To, K. C. Chang, O. Takasu, D. F. Osborne, A. H. Walton, T. L. Bricker, S. D. Jarman 2nd, D. Kreisel, A. S. Krupnick, A. Srivastava, P. E. Swanson, J. M. Green, and R. S. Hotchkiss. 2011. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 306: 2594–2605.
154. Rimmelé, T., D. Payen, V. Cantaluppi, J. Marshall, H. Gomez, A. Gomez, P. Murray, and J. A. Kellum. 2016. Immune cell phenotype and function in sepsis. *Shock Augusta Ga* 45: 282–291.

155. Brown, K., S. Brain, J. Pearson, J. Edgeworth, S. Lewis, and D. Treacher. 2006. Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *The Lancet* 368: 157–169.
156. Tamayo, E., E. Gómez, J. Bustamante, J. I. Gómez-Herreras, R. Fonteriz, F. Bobillo, J. F. Bermejo-Martín, J. Castrodeza, M. Heredia, I. Fierro, and F. J. Álvarez. 2012. Evolution of neutrophil apoptosis in septic shock survivors and nonsurvivors. *J. Crit. Care* 27: 415.e1–11.
157. Drifte, G., I. Dunn-Siegrist, P. Tissières, and J. Pugin. 2013. Innate immune functions of immature neutrophils in patients with sepsis and severe systemic inflammatory response syndrome. *Crit. Care Med.* 41: 820–832.
158. Alves-Filho, J. C., F. Spiller, and F. Q. Cunha. 2010. Neutrophil paralysis in sepsis. *Shock Augusta Ga* 34 Suppl 1: 15–21.
159. Demaret, J., F. Venet, A. Friggeri, M.-A. Cazalis, J. Plassais, L. Jallades, C. Malcus, F. Poitevin-Later, J. Textoris, A. Lepape, and G. Monneret. 2015. Marked alterations of neutrophil functions during sepsis-induced immunosuppression. *J. Leukoc. Biol.* jlb.4A0415-168RR.
160. Ahmed, N. A., S. McGill, J. Yee, F. Hu, R. P. Michel, and N. V. Christou. 1999. Mechanisms for the diminished neutrophil exudation to secondary inflammatory sites in infected patients with a systemic inflammatory response (sepsis). *Crit. Care Med.* 27: 2459–2468.
161. Taneja, R., A. P. Sharma, M. B. Hallett, G. P. Findlay, and M. R. Morris. 2008. Immature circulating neutrophils in sepsis have impaired phagocytosis and calcium signaling. *Shock Augusta Ga* 30: 618–622.
162. Kasten, K. R., J. T. Muenzer, and C. C. Caldwell. 2010. Neutrophils are significant producers of IL-10 during sepsis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 393: 28–31.
163. Ocuin, L. M., Z. M. Bamboat, V. P. Balachandran, M. J. Cavnar, H. Obaid, G. Plitas, and R. P. DeMatteo. 2011. Neutrophil IL-10 suppresses peritoneal inflammatory monocytes during polymicrobial sepsis. *J. Leukoc. Biol.* 89: 423–432.
164. Lewkowicz, N., M. P. Mycko, P. Przygodzka, H. Ćwiklińska, M. Cichalewska, M. Matysiak, K. Selmaj, and P. Lewkowicz. 2016. Induction of human IL-10-producing neutrophils by LPS-stimulated Treg cells and IL-10. *Mucosal Immunol.* 9: 364.
165. Mantovani, A., M. A. Cassatella, C. Costantini, and S. Jaillon. 2011. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 11: 519–531.
166. Clark, S. R., A. C. Ma, S. A. Tavener, B. McDonald, Z. Goodarzi, M. M. Kelly, K. D. Patel, S. Chakrabarti, E. McAvoy, G. D. Sinclair, E. M. Keys, E. Allen-Vercoe, R. DeVinney, C. J. Doig, F. H. Y. Green, and P. Kubes. 2007. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat. Med.* 13: 463.
167. Kaplan, M. J., and M. Radic. 2012. Neutrophil Extracellular Traps: Double-Edged Swords of Innate Immunity. *J. Immunol.* 189: 2689–2695.

168. Makarenkova, V. P., V. Bansal, B. M. Matta, L. A. Perez, and J. B. Ochoa. 2006. CD11b+/Gr-1+ Myeloid Suppressor Cells Cause T Cell Dysfunction after Traumatic Stress. *J. Immunol.* 176: 2085–2094.
169. Brudecki, L., D. A. Ferguson, C. E. McCall, and M. El Gazzar. 2012. Myeloid-derived suppressor cells evolve during sepsis and can enhance or attenuate the systemic inflammatory response. *Infect. Immun.* 80: 2026–2034.
170. Guérin, E., M. Orabona, M.-A. Raquil, B. Giraudeau, R. Bellier, S. Gibot, M.-C. Béné, F. Lacombe, N. Droin, E. Solary, P. Vignon, J. Feuillard, and B. François. 2014. Circulating immature granulocytes with T-cell killing functions predict sepsis deterioration*. *Crit. Care Med.* 42: 2007–2018.
171. Uhel, F., I. Azzaoui, M. Grégoire, C. Pangault, J. Dulong, J.-M. Tadié, A. Gacouin, C. Camus, L. Cynober, T. Fest, Y. Le Tulzo, M. Roussel, and K. Tarte. 2017. Early Expansion of Circulating Granulocytic Myeloid-derived Suppressor Cells Predicts Development of Nosocomial Infections in Patients with Sepsis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 196: 315–327.
172. Uhel, F. 2016. Cellules suppressives d'origine myéloïde au cours du sepsis. .
173. Biswas, S. K., and E. Lopez-Collazo. 2009. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol.* 30: 475–487.
174. Cavaillon, J.-M., and M. Adib-Conquy. 2006. Bench-to-bedside review: Endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. *Crit. Care* 10: 233.
175. Shalova, I. N., J. Y. Lim, M. Chittechath, A. S. Zinkernagel, F. Beasley, E. Hernández-Jiménez, V. Toledano, C. Cubillos-Zapata, A. Rapisarda, J. Chen, K. Duan, H. Yang, M. Poidinger, G. Melillo, V. Nizet, F. Arnalich, E. López-Collazo, and S. K. Biswas. 2015. Human Monocytes Undergo Functional Reprogramming during Sepsis Mediated by Hypoxia-Inducible Factor-1 α . *Immunity* 42: 484–498.
176. Venet, F., A.-C. Lukaszewicz, D. Payen, R. Hotchkiss, and G. Monneret. 2013. Monitoring the immune response in sepsis: a rational approach to administration of immunoadjuvant therapies. *Curr. Opin. Immunol.* 25: 477–83.
177. Lukaszewicz, A.-C., M. Grienay, M. Resche-Rigon, R. Pirracchio, V. Faivre, B. Boval, and D. Payen. 2009. Monocytic HLA-DR expression in intensive care patients: interest for prognosis and secondary infection prediction. *Crit. Care Med.* 37: 2746–2752.
178. Drewry, A. M., E. A. Ablordeppey, E. T. Murray, E. R. Beiter, A. H. Walton, M. W. Hall, and R. S. Hotchkiss. 2016. Comparison of monocyte human leukocyte antigen-DR expression and stimulated tumor necrosis factor alpha production as outcome predictors in severe sepsis: a prospective observational study. *Crit. Care Lond. Engl.* 20: 334.
179. Monneret, G., A. Lepape, N. Voirin, J. Bohé, F. Venet, A.-L. Debard, H. Thizy, J. Bienvenu, F. Gueyffier, and P. Vanhems. 2006. Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive Care Med.* 32: 1175–1183.

180. Hotchkiss, R. S., K. W. Tinsley, P. E. Swanson, M. H. Grayson, D. F. Osborne, T. H. Wagner, J. P. Cobb, C. Coopersmith, and I. E. Karl. 2002. Depletion of Dendritic Cells, But Not Macrophages, in Patients with Sepsis. *J. Immunol.* 168: 2493–2500.
181. Guisset, O., M.-S. Dilhuydy, R. Thiébaud, J. Lefèvre, F. Camou, A. Sarrat, C. Gabinski, J.-F. Moreau, and P. Blanco. 2006. Decrease in circulating dendritic cells predicts fatal outcome in septic shock. *Intensive Care Med.* 33: 148–152.
182. Grimaldi, D., S. Louis, F. Pène, G. Sirgo, C. Rousseau, Y. E. Claessens, L. Vimeux, A. Cariou, J. P. Mira, A. Hosmalin, and J. D. Chiche. 2011. Profound and persistent decrease of circulating dendritic cells is associated with ICU-acquired infection in patients with septic shock. *Intensive Care Med.* 37: 1438–1446.
183. Faivre, V., A. C. Lukaszewicz, A. Alves, D. Charron, D. Payen, and A. Haziot. 2012. Human Monocytes Differentiate into Dendritic Cells Subsets that Induce Anergic and Regulatory T Cells in Sepsis. *PLoS ONE* 7: e47209.
184. Andaluz-Ojeda, D., V. Iglesias, F. Bobillo, R. Almansa, L. Rico, F. Gandía, A. M. Loma, C. Nieto, R. Diego, E. Ramos, M. Nocito, S. Resino, J. M. Eiros, E. Tamayo, R. O. de Lejarazu, and J. F. Bermejo-Martin. 2011. Early natural killer cell counts in blood predict mortality in severe sepsis. *Crit. Care Lond. Engl.* 15: R243.
185. Forel, J.-M., L. Chiche, G. Thomas, J. Mancini, C. Farnarier, C. Cognet, C. Guervilly, A. Daumas, F. Vély, F. Xéridat, E. Vivier, and L. Papazian. 2012. Phenotype and functions of natural killer cells in critically-ill septic patients. *PloS One* 7: e50446.
186. Souza-Fonseca-Guimaraes, F., M. Parlato, F. Philippart, B. Misset, J.-M. Cavaillon, M. Adib-Conquy, and Captain study group. 2012. Toll-like receptors expression and interferon- γ production by NK cells in human sepsis. *Crit. Care Lond. Engl.* 16: R206.
187. Souza-Fonseca-Guimaraes, F., M. Parlato, C. Fitting, J.-M. Cavaillon, and M. Adib-Conquy. 2012. NK cell tolerance to TLR agonists mediated by regulatory T cells after polymicrobial sepsis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 188: 5850–5858.
188. Vantourout, P., and A. Hayday. 2013. Six-of-the-best: unique contributions of $\gamma\delta$ T cells to immunology. *Nat. Rev. Immunol.* 13: 88–100.
189. Andreu-Ballester, J. C., C. Tormo-Calandín, C. Garcia-Ballesteros, J. Pérez-Griera, V. Amigó, A. Almela-Quilis, J. Ruiz del Castillo, C. Peñarroja-Otero, and F. Ballester. 2013. Association of $\gamma\delta$ T cells with disease severity and mortality in septic patients. *Clin. Vaccine Immunol. CVI* 20: 738–746.
190. Gustave, C.-A., M. Gossez, J. Demaret, T. Rimmelé, A. Lepape, C. Malcus, F. Poitevin-Later, L. Jallades, J. Textoris, G. Monneret, and F. Venet. 2018. Septic Shock Shapes B Cell Response toward an Exhausted-like/Immunoregulatory Profile in Patients. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 200: 2418–2425.
191. Rosenwasser, L. J., and J. Meng. 2005. Anti-CD23. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 29: 61.

192. Monserrat, J., R. de Pablo, D. Diaz-Martín, M. Rodríguez-Zapata, A. de la Hera, A. Prieto, and M. Alvarez-Mon. 2013. Early alterations of B cells in patients with septic shock. *Crit. Care* 17: R105.
193. Hotchkiss, R. S., K. W. Tinsley, P. E. Swanson, R. E. Schmiegl, J. J. Hui, K. C. Chang, D. F. Osborne, B. D. Freeman, J. P. Cobb, T. G. Buchman, and I. E. Karl. 2001. Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 166: 6952–6963.
194. Drewry, A. M., N. Samra, L. P. Skrupky, B. M. Fuller, S. M. Compton, and R. S. Hotchkiss. 2014. Persistent Lymphopenia after Diagnosis of Sepsis Predicts Mortality. *Shock Augusta Ga* 42: 383–391.
195. Vincent, J.-L. 2007. *Intensive Care Medicine: Annual Update 2007*,. Springer Science & Business Media.
196. Venet, F., F. Davin, C. Guignant, A. Larue, M.-A. Cazalis, R. Darbon, C. Allombert, B. Mougin, C. Malcus, F. Poitevin-Later, A. Lepape, and G. Monneret. 2010. Early assessment of leukocyte alterations at diagnosis of septic shock. *Shock Augusta Ga* 34: 358–363.
197. Monserrat, J., R. de Pablo, E. Reyes, D. Díaz, H. Barcenilla, M. R. Zapata, A. De la Hera, A. Prieto, and M. Alvarez-Mon. 2009. Clinical relevance of the severe abnormalities of the T cell compartment in septic shock patients. *Crit. Care Lond. Engl.* 13: R26.
198. Chung, K.-P., H.-T. Chang, S.-C. Lo, L.-Y. Chang, S.-Y. Lin, A. Cheng, Y.-T. Huang, C.-C. Chen, M.-R. Lee, Y.-J. Chen, H.-H. Hou, C.-L. Hsu, J.-S. Jerng, C.-C. Ho, M.-T. Huang, C.-J. Yu, and P.-C. Yang. 2015. Severe lymphopenia is associated with elevated plasma interleukin-15 levels and increased mortality during severe sepsis. *Shock Augusta Ga* 43: 569–575.
199. Felmet, K. A., M. W. Hall, R. S. B. Clark, R. Jaffe, and J. A. Carcillo. 2005. Prolonged lymphopenia, lymphoid depletion, and hypoprolactinemia in children with nosocomial sepsis and multiple organ failure. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 174: 3765–3772.
200. Skrupky, L. P., P. W. Kerby, and R. S. Hotchkiss. 2011. Advances in the Management of Sepsis and the Understanding of Key Immunologic Defects. *Anesthesiol. J. Am. Soc. Anesthesiol.* 115: 1349–1362.
201. Hotchkiss, R. S., P. E. Swanson, B. D. Freeman, K. W. Tinsley, J. P. Cobb, G. M. Matuschak, T. G. Buchman, and I. E. Karl. 1999. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit. Care Med.* 27: 1230–1251.
202. Atmatzidis, S., I. M. Koutelidakis, G. Chatzimavroudis, A. Kotsaki, K. Louis, A. Pistiki, A. Savva, A. Antonopoulou, K. Atmatzidis, and E. J. Giamarellos-Bourboulis. 2011. Detrimental effect of apoptosis of lymphocytes at an early time point of experimental abdominal sepsis. *BMC Infect. Dis.* 11: 321.
203. McDunn, J. E., I. R. Turnbull, A. D. Polpitiya, A. Tong, S. K. MacMillan, D. F. Osborne, R. S. Hotchkiss, M. Colonna, and J. P. Cobb. 2006. Splenic CD4+ T cells have a distinct transcriptional response six hours after the onset of sepsis. *J. Am. Coll. Surg.* 203: 365–375.

204. Weber, S. U., J.-C. Schewe, L. E. Lehmann, S. Müller, M. Book, S. Klaschik, A. Hoeft, and F. Stüber. 2008. Induction of Bim and Bid gene expression during accelerated apoptosis in severe sepsis. *Crit. Care Lond. Engl.* 12: R128.
205. Brahmamdam, P., E. Watanabe, J. Unsinger, K. C. Chang, W. Schierding, A. S. Hoekzema, T. T. Zhou, J. S. McDonough, H. Holemon, J. D. Heidel, C. M. Coopersmith, J. E. McDunn, and R. S. Hotchkiss. 2009. Targeted delivery of siRNA to cell death proteins in sepsis. *Shock Augusta Ga* 32: 131–139.
206. Hotchkiss, R. S., and D. W. Nicholson. 2006. Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nat. Rev. Immunol.* 6: 813–822.
207. Griffith, T. S., H. Kazama, R. L. VanOosten, J. K. Earle, J. M. Herndon, D. R. Green, and T. A. Ferguson. 2007. Apoptotic Cells Induce Tolerance by Generating Helpless CD8+ T Cells That Produce TRAIL. *J. Immunol.* 178: 2679–2687.
208. Alderson, M. R., T. W. Tough, T. Davis-Smith, S. Braddy, B. Falk, K. A. Schooley, R. G. Goodwin, C. A. Smith, F. Ramsdell, and D. H. Lynch. 1995. Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 181: 71–77.
209. Turrel-Davin, F., C. Guignant, A. Lepape, B. Mougin, G. Monneret, and F. Venet. 2010. Upregulation of the pro-apoptotic genes BID and FAS in septic shock patients. *Crit. Care Lond. Engl.* 14: R133.
210. Unsinger, J., J. M. Herndon, C. G. Davis, J. T. Muenzer, R. S. Hotchkiss, and T. A. Ferguson. 2006. The Role of TCR Engagement and Activation-Induced Cell Death in Sepsis-Induced T Cell Apoptosis. *J. Immunol.* 177: 7968–7973.
211. Saleh, M., J. C. Mathison, M. K. Wolinski, S. J. Bensinger, P. Fitzgerald, N. Droin, R. J. Ulevitch, D. R. Green, and D. W. Nicholson. 2006. Enhanced bacterial clearance and sepsis resistance in caspase-12-deficient mice. *Nature* 440: 1064–1068.
212. Iwata, A., V. M. Stevenson, A. Minard, M. Tasch, J. Tupper, E. Lagasse, I. Weissman, J. M. Harlan, and R. K. Winn. 2003. Over-expression of Bcl-2 provides protection in septic mice by a trans effect. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 171: 3136–3141.
213. Chung, C.-S., G. Y. Song, J. Lomas, H. H. Simms, I. H. Chaudry, and A. Ayala. 2003. Inhibition of Fas/Fas ligand signaling improves septic survival: differential effects on macrophage apoptotic and functional capacity. *J. Leukoc. Biol.* 74: 344–351.
214. Wesche-Soldato, D. E., C.-S. Chung, J. Lomas-Neira, L. A. Doughty, S. H. Gregory, and A. Ayala. 2005. In vivo delivery of caspase-8 or Fas siRNA improves the survival of septic mice. *Blood* 106: 2295–2301.
215. Ayala, A., D. E. Wesche-Soldato, M. Perl, J. L. Lomas-Neira, R. Swan, and C.-S. Chung. 2007. Blockade of Apoptosis as a Rational Therapeutic Strategy for the Treatment of Sepsis. *Novartis Found. Symp.* 280: 37–164.

216. Kasten, K. R., J. Tschöp, S. G. Adediran, D. A. Hildeman, and C. C. Caldwell. 2010. T cells are potent early mediators of the host response to sepsis. *Shock Augusta Ga* 34: 327–336.
217. Fox, A. C., E. R. Breed, Z. Liang, A. T. Clark, B. R. Zee-Cheng, K. C. Chang, J. A. Dominguez, E. Jung, W. M. Dunne, E. M. Burd, A. B. Farris, D. C. Linehan, and C. M. Coopersmith. 2011. Prevention of lymphocyte apoptosis in septic mice with cancer increases mortality. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 187: 1950–1956.
218. Zajac, A. J., J. N. Blattman, K. Murali-Krishna, D. J. Sourdive, M. Suresh, J. D. Altman, and R. Ahmed. 1998. Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J. Exp. Med.* 188: 2205–2213.
219. Shankar, P., M. Russo, B. Harnisch, M. Patterson, P. Skolnik, and J. Lieberman. 2000. Impaired function of circulating HIV-specific CD8+ T cells in chronic human immunodeficiency virus infection. *Blood* 96: 3094–3101.
220. Gruener, N. H., F. Lechner, M.-C. Jung, H. Diepolder, T. Gerlach, G. Lauer, B. Walker, J. Sullivan, R. Phillips, G. R. Pape, and P. Klenerman. 2001. Sustained Dysfunction of Antiviral CD8+ T Lymphocytes after Infection with Hepatitis C Virus. *J. Virol.* 75: 5550–5558.
221. Reignat, S., G. J. M. Webster, D. Brown, G. S. Ogg, A. King, S. L. Seneviratne, G. Dusheiko, R. Williams, M. K. Maini, and A. Bertoletti. 2002. Escaping High Viral Load Exhaustion. *J. Exp. Med.* 195: 1089–1101.
222. Wherry, E. J., S.-J. Ha, S. M. Kaech, W. N. Haining, S. Sarkar, V. Kalia, S. Subramaniam, J. N. Blattman, D. L. Barber, and R. Ahmed. 2007. Molecular signature of CD8+ T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity* 27: 670–684.
223. Crawford, A., J. M. Angelosanto, C. Kao, T. A. Doering, P. M. Odorizzi, B. E. Barnett, and E. J. Wherry. 2014. Molecular and transcriptional basis of CD4+ T cell dysfunction during chronic infection. *Immunity* 40: 289–302.
224. Boomer, J. S., J. M. Green, and R. S. Hotchkiss. 2014. The changing immune system in sepsis. *Virulence* 5: 45–56.
225. Rea, I. M., S. E. McNerlan, and H. D. Alexander. 1999. CD69, CD25, and HLA-DR activation antigen expression on CD3+ lymphocytes and relationship to serum TNF- α , IFN- γ , and sIL-2R levels in aging. *Exp. Gerontol.* 34: 79–93.
226. Guignant, C., A. Lepape, X. Huang, H. Kherouf, L. Denis, F. Poitevin, C. Malcus, A. Chéron, B. Allaouchiche, F. Gueyffier, A. Ayala, G. Monneret, and F. Venet. 2011. Programmed death-1 levels correlate with increased mortality, nosocomial infection and immune dysfunctions in septic shock patients. *Crit. Care* 15: R99.

227. Cabrera-Perez, J., S. A. Condotta, B. R. James, S. W. Kashem, E. L. Brincks, D. Rai, T. A. Kucaba, V. P. Badovinac, and T. S. Griffith. 2015. Alterations in antigen-specific naive CD4 T cell precursors after sepsis impairs their responsiveness to pathogen challenge. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 194: 1609–1620.
228. Condotta, S. A., D. Rai, B. R. James, T. S. Griffith, and V. P. Badovinac. 2013. Sustained and incomplete recovery of naive CD8⁺ T cell precursors after sepsis contributes to impaired CD8⁺ T cell responses to infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 190: 1991–2000.
229. Takeyama, N., A. Tomino, M. Hashiba, A. Hirakawa, T. Hattori, and H. Miyabe. 2014. Altered T-cell repertoire diversity in septic shock patients. *Crit. Care* 18: P223.
230. Venet, F., O. Filipe-Santos, A. Lepape, C. Malcus, F. Poitevin-Later, A. Grives, N. Plantier, N. Pasqual, and G. Monneret. 2013. Decreased T-Cell Repertoire Diversity in Sepsis. *Crit. Care Med.* 41: 111–119.
231. Tomino, A., M. Tsuda, R. Aoki, Y. Kajita, M. Hashiba, T. Terajima, H. Kano, and N. Takeyama. 2017. Increased PD-1 Expression and Altered T Cell Repertoire Diversity Predict Mortality in Patients with Septic Shock: A Preliminary Study. *PLoS One* 12: e0169653.
232. Pepper, M., and M. K. Jenkins. 2011. ORIGINS OF CD4⁺ EFFECTOR AND CENTRAL MEMORY T CELLS. *Nat. Immunol.* 12: 467–471.
233. Green, A. M., R. DiFazio, and J. L. Flynn. 2013. IFN- γ from CD4 T cells is essential for host survival and enhances CD8 T cell function during Mycobacterium tuberculosis infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 190: 270–277.
234. Janssen, E. M., N. M. Droin, E. E. Lemmens, M. J. Pinkoski, S. J. Bensinger, B. D. Ehst, T. S. Griffith, D. R. Green, and S. P. Schoenberger. 2005. CD4⁺ T-cell help controls CD8⁺ T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death. *Nature* 434: 88–93.
235. Inoue, S., K. Suzuki, Y. Komori, Y. Morishita, K. Suzuki-Utsunomiya, K. Hozumi, S. Inokuchi, and T. Sato. 2014. Persistent inflammation and T cell exhaustion in severe sepsis in the elderly. *Crit. Care* 18: R130.
236. Letessier, W., J. Demaret, M. Gossez, C. Allam, F. Venet, T. Rimmelé, and G. Monneret. 2018. Decreased intra-lymphocyte cytokines measurement in septic shock patients: A proof of concept study in whole blood. *Cytokine* 104: 78–84.
237. Choi, Y. J., S. B. Kim, J. H. Kim, S.-H. Park, M. S. Park, J. M. Kim, S. H. Han, and E.-C. Shin. 2017. Impaired polyfunctionality of CD8⁺ T cells in severe sepsis patients with human cytomegalovirus reactivation. *Exp. Mol. Med.* 49: e382.
238. Markwart, R., S. A. Condotta, R. P. Requardt, F. Borcken, K. Schubert, C. Weigel, M. Bauer, T. S. Griffith, M. Förster, F. M. Brunkhorst, V. P. Badovinac, and I. Rubio. 2014. Immunosuppression after sepsis: systemic inflammation and sepsis induce a loss of naïve T-cells but no enduring cell-autonomous defects in T-cell function. *PLoS One* 9: e115094.

239. Borken, F., R. Markwart, R. P. Requardt, K. Schubert, M. Spacek, M. Verner, S. Rückriem, A. Scherag, F. Oehmichen, F. M. Brunkhorst, and I. Rubio. 2017. Chronic Critical Illness from Sepsis Is Associated with an Enhanced TCR Response. *J. Immunol.* 198: 4781–4791.
240. Arens, C., S. A. Bajwa, C. Koch, B. H. Siegler, E. Schneck, A. Hecker, S. Weiterer, C. Lichtenstern, M. A. Weigand, and F. Uhle. 2016. Sepsis-induced long-term immune paralysis - results of a descriptive, explorative study. *Crit. Care Lond. Engl.* 20: 93.
241. Zorio, V., F. Venet, B. Delwarde, B. Floccard, G. Marcotte, J. Textoris, G. Monneret, and T. Rimmelé. 2017. Assessment of sepsis-induced immunosuppression at ICU discharge and 6 months after ICU discharge. *Ann. Intensive Care* 7: 80.
242. Monneret, G., A.-L. Debard, F. Venet, J. Bohe, O. Hequet, J. Bienvenu, and A. Lepape. 2003. Marked elevation of human circulating CD4+CD25+ regulatory T cells in sepsis-induced immunoparalysis. *Crit. Care Med.* 31: 2068–2071.
243. Venet, F., C.-S. Chung, H. Kherouf, A. Geeraert, C. Malcus, F. Poitevin, J. Bohé, A. Lepape, A. Ayala, and G. Monneret. 2009. Increased circulating regulatory T cells (CD4+CD25+CD127-) contribute to lymphocyte anergy in septic shock patients. *Intensive Care Med.* 35: 678–686.
244. Yang, D., F. Wei, P. Tewary, O. M. Z. Howard, and J. J. Oppenheim. 2013. Alarmin-induced cell migration. *Eur. J. Immunol.* 43: 1412–1418.
245. Venet, F., A. Pachot, A.-L. Debard, J. Bohe, J. Bienvenu, A. Lepape, W. S. Powell, and G. Monneret. 2006. Human CD4+CD25+ Regulatory T Lymphocytes Inhibit Lipopolysaccharide-Induced Monocyte Survival through a Fas/Fas Ligand-Dependent Mechanism. *J. Immunol.* 177: 6540–6547.
246. Frauwirth, K. A., and C. B. Thompson. 2004. Regulation of T Lymphocyte Metabolism. *J. Immunol.* 172: 4661–4665.
247. Warburg, O. 1956. On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 124: 269–270.
248. Vander Heiden, M. G., L. C. Cantley, and C. B. Thompson. 2009. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* 324: 1029–1033.
249. Venet, F., J. Demaret, B. J. Blaise, C. Rouget, T. Girardot, E. Idealisoa, T. Rimmelé, F. Mallet, A. Lepape, J. Textoris, and G. Monneret. 2017. IL-7 Restores T Lymphocyte Immunometabolic Failure in Septic Shock Patients through mTOR Activation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 199: 1606–1615.
250. Delgoffe, G. M., K. N. Pollizzi, A. T. Waickman, E. Heikamp, D. J. Meyers, M. R. Horton, B. Xiao, P. F. Worley, and J. D. Powell. 2011. The mammalian Target of Rapamycin (mTOR) regulates T helper cell differentiation through the selective activation of mTORC1 and mTORC2 signaling. *Nat. Immunol.* 12: 295–303.
251. Finlay, D., and D. Cantrell. 2011. Metabolism, migration and memory in cytotoxic T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 11: 109–117.

252. Macintyre, A. N., V. A. Gerriets, A. G. Nichols, R. D. Michalek, M. C. Rudolph, D. Deoliveira, S. M. Anderson, E. D. Abel, B. J. Chen, L. P. Hale, and J. C. Rathmell. 2014. The Glucose Transporter Glut1 is Selectively Essential for CD4 T Cell Activation and Effector Function. *Cell Metab.* 20: 61–72.
253. Bantug, G. R., L. Galluzzi, G. Kroemer, and C. Hess. 2018. The spectrum of T cell metabolism in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 18: 19.
254. Kellum, J. A., L. Kong, M. P. Fink, L. A. Weissfeld, D. M. Yealy, M. R. Pinsky, J. Fine, A. Krichevsky, R. L. Delude, and D. C. Angus. 2007. Understanding the Inflammatory Cytokine Response in Pneumonia and Sepsis. *Arch. Intern. Med.* 167: 1655–1663.
255. Meisel, C., J. C. Schefold, R. Pschowski, T. Baumann, K. Hetzger, J. Gregor, S. Weber-Carstens, D. Hasper, D. Keh, H. Zuckermann, P. Reinke, and H.-D. Volk. 2009. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to reverse sepsis-associated immunosuppression: a double-blind, randomized, placebo-controlled multicenter trial. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 180: 640–648.
256. Hall, M. W., N. L. Knatz, C. Vetterly, S. Tomarello, M. D. Wewers, H. D. Volk, and J. A. Carcillo. 2011. Immunoparalysis and nosocomial infection in children with multiple organ dysfunction syndrome. *Intensive Care Med.* 37: 525–532.
257. Döcke, W. D., F. Randow, U. Syrbe, D. Krausch, K. Asadullah, P. Reinke, H. D. Volk, and W. Kox. 1997. Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment. *Nat. Med.* 3: 678–681.
258. Boni, C., P. Fiscaro, C. Valdatta, B. Amadei, P. D. Vincenzo, T. Giuberti, D. Laccabue, A. Zerbini, A. Cavalli, G. Missale, A. Bertolotti, and C. Ferrari. 2007. Characterization of Hepatitis B Virus (HBV)-Specific T-Cell Dysfunction in Chronic HBV Infection. *J. Virol.* 81: 4215–4225.
259. Trautmann, L., L. Janbazian, N. Chomont, E. A. Said, S. Gimmig, B. Bessette, M.-R. Boulassel, E. Delwart, H. Sepulveda, R. S. Balderas, J.-P. Routy, E. K. Haddad, and R.-P. Sekaly. 2006. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat. Med.* 12: 1198–1202.
260. Kasamon, Y. L., R. A. de Claro, Y. Wang, Y. L. Shen, A. T. Farrell, and R. Pazdur. 2017. FDA Approval Summary: Nivolumab for the Treatment of Relapsed or Progressive Classical Hodgkin Lymphoma. *The Oncologist* 22: 585–591.
261. Zhang, Y., Y. Zhou, J. Lou, J. Li, L. Bo, K. Zhu, X. Wan, X. Deng, and Z. Cai. 2010. PD-L1 blockade improves survival in experimental sepsis by inhibiting lymphocyte apoptosis and reversing monocyte dysfunction. *Crit. Care* 14: R220.
262. Chang, K., C. Svabek, C. Vazquez-Guillamet, B. Sato, D. Rasche, S. Wilson, P. Robbins, N. Ulbrandt, J. Suzich, J. Green, A. C. Patera, W. Blair, S. Krishnan, and R. Hotchkiss. 2014. Targeting the programmed cell death 1: programmed cell death ligand 1 pathway reverses T cell exhaustion in patients with sepsis. *Crit. Care Lond. Engl.* 18: R3.

263. Zhao, Z., X. Jiang, C. Kang, Y. Xiao, C. Hou, J. Yu, R. Wang, H. Xiao, T. Zhou, Z. Wen, J. Feng, G. Chen, Y. Ma, B. Shen, Y. Li, and G. Han. 2014. Blockade of the T cell immunoglobulin and mucin domain protein 3 pathway exacerbates sepsis-induced immune deviation and immunosuppression. *Clin. Exp. Immunol.* 178: 279–291.
264. Unsinger, J., C.-A. D. Burnham, J. McDonough, M. Morre, P. S. Prakash, C. C. Caldwell, W. M. Dunne Jr, and R. S. Hotchkiss. 2012. Interleukin-7 ameliorates immune dysfunction and improves survival in a 2-hit model of fungal sepsis. *J. Infect. Dis.* 206: 606–616.
265. Kroemer, R. T., S. W. Doughty, A. J. Robinson, and W. G. Richards. 1996. Prediction of the three-dimensional structure of human interleukin-7 by homology modeling. *Protein Eng.* 9: 493–498.
266. Cosenza, L., E. Sweeney, and J. R. Murphy. 1997. Disulfide bond assignment in human interleukin-7 by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectroscopy and site-directed cysteine to serine mutational analysis. *J. Biol. Chem.* 272: 32995–33000.
267. Heufler, C., G. Topar, A. Grasseger, U. Stanzl, F. Koch, N. Romani, A. E. Namen, and G. Schuler. 1993. Interleukin 7 is produced by murine and human keratinocytes. *J. Exp. Med.* 178: 1109–1114.
268. Golden-Mason, L., A. M. Kelly, O. Traynor, G. McEntee, J. Kelly, J. E. Hegarty, and C. O’Farrelly. 2001. EXPRESSION OF INTERLEUKIN 7 (IL-7) mRNA AND PROTEIN IN THE NORMAL ADULT HUMAN LIVER: IMPLICATIONS FOR EXTRATHYMIC T CELL DEVELOPMENT. *Cytokine* 14: 143–151.
269. Madrigal-Estebas, L., R. McManus, B. Byrne, S. Lynch, D. G. Doherty, D. Kelleher, D. P. O’Donoghue, C. Feighery, and C. O’Farrelly. 1997. Human Small Intestinal Epithelial Cells Secrete Interleukin-7 and Differentially Express Two Different Interleukin-7 mRNA Transcripts: Implications for Extrathymic T-Cell Differentiation. *Hum. Immunol.* 58: 83–90.
270. Kröncke, R., H. Loppnow, H. D. Flad, and J. Gerdes. 1996. Human follicular dendritic cells and vascular cells produce interleukin-7: a potential role for interleukin-7 in the germinal center reaction. *Eur. J. Immunol.* 26: 2541–2544.
271. Sorg, R. V., A. D. McLellan, B. D. Hock, D. B. Fearnley, and D. N. J. Hart. 1998. Human Dendritic Cells Express Functional Interleukin-7. *Immunobiology* 198: 514–526.
272. Oshima, S., T. Nakamura, S. Namiki, E. Okada, K. Tsuchiya, R. Okamoto, M. Yamazaki, T. Yokota, M. Aida, Y. Yamaguchi, T. Kanai, H. Handa, and M. Watanabe. 2004. Interferon Regulatory Factor 1 (IRF-1) and IRF-2 Distinctively Up-Regulate Gene Expression and Production of Interleukin-7 in Human Intestinal Epithelial Cells. *Mol. Cell. Biol.* 24: 6298–6310.
273. Weitzmann, M. N., S. Cenci, L. Rifas, C. Brown, and R. Pacifici. 2000. Interleukin-7 stimulates osteoclast formation by up-regulating the T-cell production of soluble osteoclastogenic cytokines. *Blood* 96: 1873–1878.

274. Jiang, Q., W. Q. Li, F. B. Aiello, R. Mazzucchelli, B. Asefa, A. R. Khaled, and S. K. Durum. 2005. Cell biology of IL-7, a key lymphotrophin. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16: 513–533.
275. Mackall, C. L., T. J. Fry, and R. E. Gress. 2011. Harnessing the biology of IL-7 for therapeutic application. *Nat. Rev. Immunol.* 11: 330–342.
276. Vogt, T. K., A. Link, J. Perrin, D. Finke, and S. A. Luther. 2009. Novel function for interleukin-7 in dendritic cell development. *Blood* 113: 3961–3968.
277. Liu, Y.-J., V. Soumelis, N. Watanabe, T. Ito, Y.-H. Wang, R. de W. Malefyt, M. Omori, B. Zhou, and S. F. Ziegler. 2007. TSLP: an epithelial cell cytokine that regulates T cell differentiation by conditioning dendritic cell maturation. *Annu. Rev. Immunol.* 25: 193–219.
278. Guimond, M., R. G. Veenstra, D. J. Grindler, H. Zhang, Y. Cui, R. D. Murphy, S. Y. Kim, R. Na, L. Henninghausen, S. Kurtulus, B. Erman, P. Matzinger, M. S. Merchant, and C. L. Mackall. 2009. IL-7 signaling in dendritic cells regulates CD4⁺ T cell homeostatic proliferation and CD4⁺ T cell niche size. *Nat. Immunol.* 10: 149–157.
279. Artis, D., and H. Spits. 2015. The biology of innate lymphoid cells. *Nature* 517: 293–301.
280. Giliani, S., L. Mori, G. de Saint Basile, F. Le Deist, C. Rodriguez-Perez, C. Forino, E. Mazzolari, S. Dupuis, R. Elhasid, A. Kessel, C. Galambrun, J. Gil, A. Fischer, A. Etzioni, and L. D. Notarangelo. 2005. Interleukin-7 receptor alpha (IL-7R α) deficiency: cellular and molecular bases. Analysis of clinical, immunological, and molecular features in 16 novel patients. *Immunol. Rev.* 203: 110–126.
281. Nodland, S. E., M. A. Berkowska, A. A. Bajer, N. Shah, D. de Ridder, J. J. M. van Dongen, T. W. LeBien, and M. C. van Zelm. 2011. IL-7R expression and IL-7 signaling confer a distinct phenotype on developing human B-lineage cells. *Blood* 118: 2116–2127.
282. Malaspina, A., S. Moir, D. G. Chaitt, C. A. Rehm, S. Kottlilil, J. Falloon, and A. S. Fauci. 2007. Idiopathic CD4⁺ T lymphocytopenia is associated with increases in immature/transitional B cells and serum levels of IL-7. *Blood* 109: 2086–2088.
283. Malaspina, A., S. Moir, J. Ho, W. Wang, M. L. Howell, M. A. O’Shea, G. A. Roby, C. A. Rehm, J. M. Mican, T.-W. Chun, and A. S. Fauci. 2006. Appearance of immature/transitional B cells in HIV-infected individuals with advanced disease: Correlation with increased IL-7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103: 2262–2267.
284. Sportès, C., R. R. Babb, M. C. Krumlauf, F. T. Hakim, S. M. Steinberg, C. K. Chow, M. R. Brown, T. A. Fleisher, P. Noel, I. Maric, M. Stetler-Stevenson, J. Engel, R. Buffet, M. Morre, R. J. Amato, A. Pecora, C. L. Mackall, and R. E. Gress. 2010. Phase I Study of Recombinant Human Interleukin-7 Administration in Subjects with Refractory Malignancy. *Clin. Cancer Res.* 16: 727–735.
285. Puel, A., S. F. Ziegler, R. H. Buckley, and W. J. Leonard. 1998. Defective IL7R expression in T(-)B(+)NK(+) severe combined immunodeficiency. *Nat. Genet.* 20: 394–397.

286. Cunningham-Rundles, C., and P. P. Ponda. 2005. Molecular defects in T- and B-cell primary immunodeficiency diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 5: 880–892.
287. Schluns, K. S., W. C. Kieper, S. C. Jameson, and L. Lefrançois. 2000. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naïve and memory CD8 T cells *in vivo*. *Nat. Immunol.* 1: 426.
288. Gao, J., L. Zhao, Y. Y. Wan, and B. Zhu. 2015. Mechanism of Action of IL-7 and Its Potential Applications and Limitations in Cancer Immunotherapy. *Int. J. Mol. Sci.* 16: 10267–10280.
289. Barata, J. T., A. A. Cardoso, L. M. Nadler, and V. A. Boussiotis. 2001. Interleukin-7 promotes survival and cell cycle progression of T-cell acute lymphoblastic leukemia cells by down-regulating the cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1. *Blood* 98: 1524–1531.
290. Reche, P. A., V. Soumelis, D. M. Gorman, T. Clifford, M. Liu, M. Travis, S. M. Zurawski, J. Johnston, Y.-J. Liu, H. Spits, R. de W. Malefyt, R. A. Kastelein, and J. F. Bazan. 2001. Human Thymic Stromal Lymphopoietin Preferentially Stimulates Myeloid Cells. *J. Immunol.* 167: 336–343.
291. Soumelis, V., P. A. Reche, H. Kanzler, W. Yuan, G. Edward, B. Homey, M. Gilliet, S. Ho, S. Antonenko, A. Lauerma, K. Smith, D. Gorman, S. Zurawski, J. Abrams, S. Menon, T. McClanahan, R. de Waal-Malefyt, F. Bazan, R. A. Kastelein, and Y.-J. Liu. 2002. Human epithelial cells trigger dendritic cell-mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat. Immunol.* 3: 673.
292. Al-Shami, A., R. Spolski, J. Kelly, T. Fry, P. L. Schwartzberg, A. Pandey, C. L. Mackall, and W. J. Leonard. 2004. A Role for Thymic Stromal Lymphopoietin in CD4+ T Cell Development. *J. Exp. Med.* 200: 159–168.
293. Pellegrini, M., P. Bouillet, M. Robati, G. T. Belz, G. M. Davey, and A. Strasser. 2004. Loss of Bim Increases T Cell Production and Function in Interleukin 7 Receptor-deficient Mice. *J. Exp. Med.* 200: 1189–1195.
294. Akashi, K., M. Kondo, U. von Freeden-Jeffry, R. Murray, and I. L. Weissman. 1997. Bcl-2 Rescues T Lymphopoiesis in Interleukin-7 Receptor-Deficient Mice. *Cell* 89: 1033–1041.
295. Khaled, A. R., W. Q. Li, J. Huang, T. J. Fry, A. S. Khaled, C. L. Mackall, K. Muegge, H. A. Young, and S. K. Durum. 2002. Bax deficiency partially corrects interleukin-7 receptor alpha deficiency. *Immunity* 17: 561–573.
296. Fatrai, S., A. T. J. Wierenga, S. M. G. J. Daenen, E. Vellenga, and J. J. Schuringa. 2011. Identification of HIF2 α as an important STAT5 target gene in human hematopoietic stem cells. *Blood* 117: 3320–3330.
297. Jacobs, S. R., C. E. Herman, N. J. MacIver, J. A. Wofford, H. L. Wieman, J. J. Hammen, and J. C. Rathmell. 2008. Glucose Uptake Is Limiting in T Cell Activation and Requires CD28-Mediated Akt-Dependent and Independent Pathways. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 180: 4476–4486.
298. Swainson, L., S. Kinet, C. Mongellaz, M. Sourisseau, T. Henriques, and N. Taylor. 2007. IL-7-induced proliferation of recent thymic emigrants requires activation of the PI3K pathway. *Blood* 109: 1034–1042.

299. Barata, J. T., A. Silva, J. G. Brandao, L. M. Nadler, A. A. Cardoso, and V. A. Boussiotis. 2004. Activation of PI3K Is Indispensable for Interleukin 7–mediated Viability, Proliferation, Glucose Use, and Growth of T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Cells. *J. Exp. Med.* 200: 659–669.
300. Wofford, J. A., H. L. Wieman, S. R. Jacobs, Y. Zhao, and J. C. Rathmell. 2008. IL-7 promotes Glut1 trafficking and glucose uptake via STAT5-mediated activation of Akt to support T-cell survival. *Blood* 111: 2101–2111.
301. Lynch, M., E. Baker, L. S. Park, G. R. Sutherland, and R. G. Goodwin. 1992. The interleukin-7 receptor gene is at 5p13. *Hum. Genet.* 89: 566–568.
302. Goodwin, R. G., D. Friend, S. F. Ziegler, R. Jerzy, B. A. Falk, S. Gimpel, D. Cosman, S. K. Dower, C. J. March, A. E. Namen, and L. S. Park. 1990. Cloning of the human and murine interleukin-7 receptors: Demonstration of a soluble form and homology to a new receptor superfamily. *Cell* 60: 941–951.
303. Vranjkovic, A., A. M. Crawley, K. Gee, A. Kumar, and J. B. Angel. 2007. IL-7 decreases IL-7 receptor α (CD127) expression and induces the shedding of CD127 by human CD8+ T cells. *Int. Immunol.* 19: 1329–1339.
304. Badot, V., P. Durez, B. j. Van den Eynde, A. Nzeusseu-Toukap, F. a. Houssiau, and B. r. Lauwerys. 2011. Rheumatoid arthritis synovial fibroblasts produce a soluble form of the interleukin-7 receptor in response to pro-inflammatory cytokines. *J. Cell. Mol. Med.* 15: 2335–2342.
305. Monti, P., C. Brigatti, M. Krasmann, A. G. Ziegler, and E. Bonifacio. 2013. Concentration and Activity of the Soluble Form of the Interleukin-7 Receptor α in Type 1 Diabetes Identifies an Interplay Between Hyperglycemia and Immune Function. *Diabetes* 62: 2500–2508.
306. Lundström, W., S. Highfill, S. T. R. Walsh, S. Beq, E. Morse, I. Kockum, L. Alfredsson, T. Olsson, J. Hillert, and C. L. Mackall. 2013. Soluble IL7R α potentiates IL-7 bioactivity and promotes autoimmunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110: E1761–E1770.
307. Fernandez-Botran, R., F. A. Crespo, and X. Sun. 2002. Soluble cytokine receptors in biological therapy. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2: 585–605.
308. Maier, L. M., C. E. Lowe, J. Cooper, K. Downes, D. E. Anderson, C. Severson, P. M. Clark, B. Healy, N. Walker, C. Aubin, J. R. Oksenberg, S. L. Hauser, A. Compston, S. Sawcer, T. I. M. S. G. Consortium, P. L. D. Jager, L. S. Wicker, J. A. Todd, and D. A. Hafler. 2009. IL2RA Genetic Heterogeneity in Multiple Sclerosis and Type 1 Diabetes Susceptibility and Soluble Interleukin-2 Receptor Production. *PLOS Genet.* 5: e1000322.
309. Stoklasek, T. A., K. S. Schluns, and L. Lefrançois. 2006. Combined IL-15/IL-15R α Immunotherapy Maximizes IL-15 Activity In Vivo. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 177: 6072–6080.
310. Crawley, A. M., S. Faucher, and J. B. Angel. 2010. Soluble IL-7R α (sCD127) Inhibits IL-7 Activity and Is Increased in HIV Infection. *J. Immunol.* 184: 4679–4687.

311. Côté, S., J. Matte, S. Sad, J. B. Angel, and A. M. Crawley. 2015. Complexed soluble IL-7 receptor α and IL-7 increase IL-7-mediated proliferation and viability of CD8⁺ T-cells in vitro. *Cell. Immunol.* 293: 122–125.
312. Kaech, S. M., J. T. Tan, E. J. Wherry, B. T. Konieczny, C. D. Surh, and R. Ahmed. 2003. Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nat. Immunol.* 4: 1191–1198.
313. Schluns, K. S., and L. Lefrançois. 2003. Cytokine control of memory T-cell development and survival. *Nat. Rev. Immunol.* 3: 269–279.
314. Ghazawi, F. M., E. M. Faller, S. M. Sugden, J. A. Kakal, and P. A. MacPherson. 2013. IL-7 downregulates IL-7R α expression in human CD8 T cells by two independent mechanisms. *Immunol. Cell Biol.* 91: 149–158.
315. Faller, E. M., F. M. Ghazawi, M. Cavar, and P. A. MacPherson. 2016. IL-7 induces clathrin-mediated endocytosis of CD127 and subsequent degradation by the proteasome in primary human CD8 T cells. *Immunol. Cell Biol.* 94: 196–207.
316. Park, J.-H., Q. Yu, B. Erman, J. S. Appelbaum, D. Montoya-Durango, H. L. Grimes, and A. Singer. 2004. Suppression of IL7R α Transcription by IL-7 and Other Prosurvival Cytokines: A Novel Mechanism for Maximizing IL-7-Dependent T Cell Survival. *Immunity* 21: 289–302.
317. Henriques, C. M., J. Rino, R. J. Nibbs, G. J. Graham, and J. T. Barata. 2010. IL-7 induces rapid clathrin-mediated internalization and JAK3-dependent degradation of IL-7R α in T cells. *Blood* 115: 3269–3277.
318. Bazdar, D. A., M. Kalinowska, S. Panigrahi, and S. F. Sieg. 2015. Recycled IL-7 Can Be Delivered to Neighboring T Cells. *J. Immunol.* 194: 4698–4704.
319. Sasson, S. C., J. J. Zaunders, G. Zanett, E. M. King, K. M. Merlin, D. E. Smith, K. K. Stanley, D. A. Cooper, and A. D. Kelleher. 2006. Increased Plasma Interleukin-7 Level Correlates with Decreased CD127 and Increased CD132 Extracellular Expression on T Cell Subsets in Patients with HN-1 Infection. *J. Infect. Dis.* 193: 505–514.
320. Allard, E.-L., M.-P. Hardy, J. Leignadier, M. Marquis, J. Rooney, D. Lehoux, and N. Labrecque. 2007. Overexpression of IL-21 promotes massive CD8⁺ memory T cell accumulation. *Eur. J. Immunol.* 37: 3069–3077.
321. Liu, S., G. Lizée, Y. Lou, C. Liu, W. W. Overwijk, G. Wang, and P. Hwu. 2007. IL-21 synergizes with IL-7 to augment expansion and anti-tumor function of cytotoxic T cells. *Int. Immunol.* 19: 1213–1221.
322. Xue, H.-H., P. E. Kovanen, C. A. Pise-Masison, M. Berg, M. F. Radovich, J. N. Brady, and W. J. Leonard. 2002. IL-2 negatively regulates IL-7 receptor alpha chain expression in activated T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99: 13759–13764.

323. Tian, B., D. E. Nowak, M. Jamaluddin, S. Wang, and A. R. Brasier. 2005. Identification of direct genomic targets downstream of the nuclear factor-kappaB transcription factor mediating tumor necrosis factor signaling. *J. Biol. Chem.* 280: 17435–17448.
324. Pleiman, C. M., S. D. Gimpel, L. S. Park, H. Harada, T. Taniguchi, and S. F. Ziegler. 1991. Organization of the murine and human interleukin-7 receptor genes: two mRNAs generated by differential splicing and presence of a type I-interferon-inducible promoter. *Mol. Cell. Biol.* 11: 3052–3059.
325. Ligons, D. L., C. Tuncer, B. A. Linowes, I. M. Akcay, S. Kurtulus, E. Deniz, B. A. Arslan, S. I. Cevik, H. R. Keller, M. A. Luckey, L. Feigenbaum, T. Möröy, T. Ersahin, R. Atalay, B. Erman, and J.-H. Park. 2012. CD8 Lineage-specific Regulation of Interleukin-7 Receptor Expression by the Transcriptional Repressor Gfi1. *J. Biol. Chem.* 287: 34386–34399.
326. Franchimont, D., J. Galon, M. S. Vacchio, S. Fan, R. Visconti, D. M. Frucht, V. Geenen, G. P. Chrousos, J. D. Ashwell, and J. J. O’Shea. 2002. Positive effects of glucocorticoids on T cell function by up-regulation of IL-7 receptor alpha. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 168: 2212–2218.
327. Galon, J., D. Franchimont, N. Hiroi, G. Frey, A. Boettner, M. Ehrhart-Bornstein, J. J. O’Shea, G. P. Chrousos, and S. R. Bornstein. 2002. Gene profiling reveals unknown enhancing and suppressive actions of glucocorticoids on immune cells. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 16: 61–71.
328. Lee, H.-C., H. Shibata, S. Ogawa, K. Maki, and K. Ikuta. 2005. Transcriptional Regulation of the Mouse IL-7 Receptor α Promoter by Glucocorticoid Receptor. *J. Immunol.* 174: 7800–7806.
329. Cain, D. W., and J. A. Cidlowski. 2017. Immune regulation by glucocorticoids. *Nat. Rev. Immunol.* 17: 233–247.
330. Kakal, J. A., F. M. Ghazawi, E. M. Faller, S. M. Sugden, P. Parmar, and P. A. MacPherson. 2017. Transcriptional regulation of the IL-7R α gene by dexamethasone and IL-7 in primary human CD8 T cells. *Immunogenetics* 69: 13–27.
331. Elenkov, I. J. 2004. Glucocorticoids and the Th1/Th2 balance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1024: 138–146.
332. Liberman, A. C., D. Refojo, J. Druker, M. Toscano, T. Rein, F. Holsboer, and E. Arzt. 2007. The activated glucocorticoid receptor inhibits the transcription factor T-bet by direct protein-protein interaction. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 21: 1177–1188.
333. Kim, H.-R., M. S. Hong, J. M. Dan, and I. Kang. 2006. Altered IL-7R α expression with aging and the potential implications of IL-7 therapy on CD8+ T-cell immune responses. *Blood* 107: 2855–2862.
334. Passtoors, W. M., E. B. van den Akker, J. Deelen, A. B. Maier, R. van der Breggen, R. Jansen, S. Trompet, D. van Heemst, E. Derhovanessian, G. Pawelec, G.-J. B. van Ommen, P. E. Slagboom, and M. Beekman. 2015. IL7R gene expression network associates with human healthy ageing. *Immun. Ageing A* 12: 21.

335. Moniuszko, M., B. Glowinska-Olszewska, M. Rusak, M. Jeznach, K. Grubczak, D. Lipinska, R. Milewski, A. J. Milewska, M. Dabrowska, E. Jablonska, A. Kretowski, M. Gorska, A. Bodzenta-Lukaszyk, and A. Bossowski. 2013. Decreased CD127 expression on CD4+ T-cells and elevated frequencies of CD4+CD25+CD127- T-cells in children with long-lasting type 1 diabetes. *Clin. Dev. Immunol.* 2013: 459210.
336. Pickens, S. R., N. D. Chamberlain, M. V. Volin, R. M. Pope, N. E. Talarico, A. M. Mandelin, and S. Shahrara. 2011. Characterization of IL-7 and IL-7R in the pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum.* 63: 2884–2893.
337. Hartgring, S. A. Y., J. A. G. van Roon, M. Wenting-van Wijk, K. M. G. Jacobs, Z. N. Jahangier, C. R. Willis, J. W. J. Bijlsma, and F. P. J. G. Lafeber. 2009. Elevated expression of interleukin-7 receptor in inflamed joints mediates interleukin-7-induced immune activation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 60: 2595–2605.
338. Chen, Z., S. Kim, N. D. Chamberlain, S. R. Pickens, M. V. Volin, S. Volkov, S. Arami, J. W. Christman, B. S. Prabhakar, W. Swedler, A. Mehta, N. Sweiss, and S. Shahrara. 2013. The novel role of IL-7 ligation to IL-7R in myeloid cells of rheumatoid arthritis and collagen induced arthritis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 190: 5256–5266.
339. Burmester, G. R., X. Mariette, C. Montecucco, I. Monteagudo-Sáez, M. Malaise, A. G. Tzioufas, J. W. J. Bijlsma, K. Unnebrink, S. Kary, and H. Kupper. 2007. Adalimumab alone and in combination with disease-modifying antirheumatic drugs for the treatment of rheumatoid arthritis in clinical practice: the Research in Active Rheumatoid Arthritis (ReAct) trial. *Ann. Rheum. Dis.* 66: 732–739.
340. Elliott, M. J., R. N. Maini, M. Feldmann, J. R. Kalden, C. Antoni, J. S. Smolen, B. Leeb, F. C. Breedveld, J. D. Macfarlane, J. A. Bijl, and J. N. Woody. 1994. Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor α (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis. *The Lancet* 344: 1105–1110.
341. Weinblatt, M. E., J. M. Kremer, A. D. Bankhurst, K. J. Bulpitt, R. M. Fleischmann, R. I. Fox, C. G. Jackson, M. Lange, and D. J. Burge. 1999. A trial of etanercept, a recombinant tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein, in patients with rheumatoid arthritis receiving methotrexate. *N. Engl. J. Med.* 340: 253–259.
342. Badot, V., C. Galant, A. Nzeusseu Toukap, I. Theate, A.-L. Maudoux, B. J. Van den Eynde, P. Durez, F. A. Houssiau, and B. R. Lauwerys. 2009. Gene expression profiling in the synovium identifies a predictive signature of absence of response to adalimumab therapy in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 11: R57.
343. Gregory, S. G., S. Schmidt, P. Seth, J. R. Oksenberg, J. Hart, A. Prokop, S. J. Caillier, M. Ban, A. Goris, L. F. Barcellos, R. Lincoln, J. L. McCauley, S. J. Sawcer, D. a. S. Compston, B. Dubois, S. L. Hauser, M. A.

- Garcia-Blanco, M. A. Pericak-Vance, and J. L. Haines. 2007. Interleukin 7 receptor α chain (IL7R) shows allelic and functional association with multiple sclerosis. *Nat. Genet.* 39: 1083–1091.
344. Hoe, E., F. C. McKay, S. D. Schibeci, K. Gandhi, R. N. Heard, G. J. Stewart, and D. R. Booth. 2010. Functionally Significant Differences in Expression of Disease-Associated IL-7 Receptor α Haplotypes in CD4 T Cells and Dendritic Cells. *J. Immunol.* 184: 2512–2517.
345. Lundmark, F., K. Duvefelt, E. Iacobaeus, I. Kockum, E. Wallström, M. Khademi, A. Oturai, L. P. Ryder, J. Saarela, H. F. Harbo, E. G. Celius, H. Salter, T. Olsson, and J. Hillert. 2007. Variation in interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) influences risk of multiple sclerosis. *Nat. Genet.* 39: 1108–1113.
346. Booth, D. R., A. T. Arthur, S. M. Teutsch, C. Bye, J. Rubio, P. J. Armati, J. D. Pollard, R. N. S. Heard, G. J. Stewart, and Southern MS Genetics Consortium. 2005. Gene expression and genotyping studies implicate the interleukin 7 receptor in the pathogenesis of primary progressive multiple sclerosis. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 83: 822–830.
347. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, D. A. Hafler, A. Compston, S. Sawcer, E. S. Lander, M. J. Daly, P. L. De Jager, P. I. W. de Bakker, S. B. Gabriel, D. B. Mirel, A. J. Iverson, M. A. Pericak-Vance, S. G. Gregory, J. D. Rioux, J. L. McCauley, J. L. Haines, L. F. Barcellos, B. Cree, J. R. Oksenberg, and S. L. Hauser. 2007. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N. Engl. J. Med.* 357: 851–862.
348. Evsyukova, I., J. A. Somarelli, S. G. Gregory, and M. A. Garcia-Blanco. 2010. Alternative splicing in multiple sclerosis and other autoimmune diseases. *RNA Biol.* 7: 462–473.
349. Galarza-Muñoz, G., F. B. S. Briggs, I. Evsyukova, G. Schott-Lerner, E. M. Kennedy, T. Nyanhete, L. Wang, L. Bergamaschi, S. G. Widen, G. D. Tomaras, D. C. Ko, S. S. Bradrick, L. F. Barcellos, S. G. Gregory, and M. A. Garcia-Blanco. 2017. Human Epistatic Interaction Controls IL7R Splicing and Increases Multiple Sclerosis Risk. *Cell* 169: 72-84.e13.
350. Shochat, C., N. Tal, V. Gryshkova, Y. Birger, O. R. Bandapalli, G. Cazzaniga, N. Gershman, A. E. Kulozik, A. Biondi, M. R. Mansour, J.-C. Twizere, M. U. Muckenthaler, N. Ben-Tal, S. N. Constantinescu, D. Bercovich, and S. Izraeli. 2014. Novel activating mutations lacking cysteine in type I cytokine receptors in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 124: 106–110.
351. Zenatti, P. P., D. Ribeiro, W. Li, L. Zuurbier, M. C. Silva, M. Paganin, J. Tritapoe, J. A. Hixon, A. B. Silveira, B. A. Cardoso, L. M. Sarmiento, N. Correia, M. L. Toribio, J. Kobarg, M. Horstmann, R. Pieters, S. R. Brandalise, A. A. Ferrando, J. P. Meijerink, S. K. Durum, J. A. Yunes, and J. T. Barata. 2011. Oncogenic IL7R gain-of-function mutations in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat. Genet.* 43: 932–939.

352. Vudattu, N. K., I. Magalhaes, M. Schmidt, V. Seyfert-Margolis, and M. J. Maeurer. 2007. Reduced numbers of IL-7 receptor (CD127) expressing immune cells and IL-7-signaling defects in peripheral blood from patients with breast cancer. *Int. J. Cancer* 121: 1512–1519.
353. Qu, H., Z. Zou, Z. Pan, T. Zhang, N. Deng, G. Chen, and Z. Wang. 2016. IL-7/IL-7 receptor axis stimulates prostate cancer cell invasion and migration via AKT/NF- κ B pathway. *Int. Immunopharmacol.* 40: 203–210.
354. Al-Rawi, M. a. A., K. Rmali, G. Watkins, R. E. Mansel, and W. G. Jiang. 2004. Aberrant expression of interleukin-7 (IL-7) and its signalling complex in human breast cancer. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 40: 494–502.
355. Colle, J.-H., J.-L. Moreau, A. Fontanet, O. Lambotte, M. Joussemet, J.-F. Delfraissy, and J. Thèze. 2006. CD127 expression and regulation are altered in the memory CD8 T cells of HIV-infected patients – reversal by highly active anti-retroviral therapy (HAART). *Clin. Exp. Immunol.* 143: 398–403.
356. Xu, W., J. Li, Y. Wu, J. Zhou, J. Zhong, Q. Lv, H. Shao, and H. Rao. 2017. CD127 Expression in Naive and Memory T Cells in HIV Patients Who Have Undergone Long-Term HAART. *Lab. Med.* 48: 57–64.
357. Zhang, S.-Y., Z. Zhang, J.-L. Fu, F.-B. Kang, X.-S. Xu, W.-M. Nie, C.-B. Zhou, M. Zhao, and F.-S. Wang. 2009. Progressive CD127 down-regulation correlates with increased apoptosis of CD8 T cells during chronic HIV-1 infection. *Eur. J. Immunol.* 39: 1425–1434.
358. Paiardini, M., B. Cervasi, H. Albrecht, A. Muthukumar, R. Dunham, S. Gordon, H. Radziewicz, G. Piedimonte, M. Magnani, M. Montroni, S. M. Kaech, A. Weintrob, J. D. Altman, D. L. Sodora, M. B. Feinberg, and G. Silvestri. 2005. Loss of CD127 Expression Defines an Expansion of Effector CD8+ T Cells in HIV-Infected Individuals. *J. Immunol.* 174: 2900–2909.
359. Mussini, C., M. Pinti, V. Borghi, M. Nasi, G. Amorico, E. Monterastelli, L. Moretti, L. Troiano, R. Esposito, and A. Cossarizza. 2002. Features of “CD4-exploders”, HIV-positive patients with an optimal immune reconstitution after potent antiretroviral therapy. *AIDS Lond. Engl.* 16: 1609–1616.
360. Day, C. L., D. E. Kaufmann, P. Kiepiela, J. A. Brown, E. S. Moodley, S. Reddy, E. W. Mackey, J. D. Miller, A. J. Leslie, C. DePierres, Z. Mncube, J. Duraiswamy, B. Zhu, Q. Eichbaum, M. Altfeld, E. J. Wherry, H. M. Coovadia, P. J. R. Goulder, P. Klenerman, R. Ahmed, G. J. Freeman, and B. D. Walker. 2006. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* 443: 350–354.
361. Shive, C. L., B. Clagett, M. R. McCausland, J. C. Mudd, N. T. Funderburg, M. L. Freeman, S.-A. Younes, B. M. Ferrari, B. Rodriguez, G. A. McComsey, L. H. Calabrese, S. F. Sieg, and M. M. Lederman. 2016. Inflammation Perturbs the IL-7 Axis, Promoting Senescence and Exhaustion that Broadly Characterize Immune Failure in Treated HIV Infection. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 1999 71: 483–492.

362. Ensoli, B., L. Buonaguro, G. Barillari, V. Fiorelli, R. Gendelman, R. A. Morgan, P. Wingfield, and R. C. Gallo. 1993. Release, uptake, and effects of extracellular human immunodeficiency virus type 1 Tat protein on cell growth and viral transactivation. *J. Virol.* 67: 277–287.
363. Poggi, A., R. Carosio, D. Fenoglio, S. Brenci, G. Murdaca, M. Setti, F. Indiveri, S. Scabini, E. Ferrero, and M. R. Zocchi. 2004. Migration of V delta 1 and V delta 2 T cells in response to CXCR3 and CXCR4 ligands in healthy donors and HIV-1-infected patients: competition by HIV-1 Tat. *Blood* 103: 2205–2213.
364. Faller, E. M., M. J. McVey, J. A. Kakal, and P. A. MacPherson. 2006. Interleukin-7 receptor expression on CD8 T-cells is downregulated by the HIV Tat protein. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 1999 43: 257–269.
365. McLaughlin, D., E. Faller, S. Sugden, and P. MacPherson. 2014. Expression of the IL-7 receptor alpha-chain is down regulated on the surface of CD4 T-cells by the HIV-1 Tat protein. *PloS One* 9: e111193.
366. Faller, E. M., S. M. Sugden, M. J. McVey, J. A. Kakal, and P. A. MacPherson. 2010. Soluble HIV Tat Protein Removes the IL-7 Receptor α -Chain from the Surface of Resting CD8 T Cells and Targets It for Degradation. *J. Immunol.* 185: 2854–2866.
367. Blom-Potar, M.-C., F. Bugault, O. Lambotte, J.-F. Delfraissy, and J. Thèze. 2009. Soluble IL-7R α (sCD127) and measurement of IL-7 in the plasma of HIV patients. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 1999 51: 104–105.
368. Hartling, H. J., S. Jespersen, J. C. Gaardbo, C. Sambleben, K. Thorsteinsson, J. Gerstoft, H. Ullum, and S. D. Nielsen. 2017. Reduced IL-7R T Cell Expression and Increased Plasma sCD127 in Late Presenting HIV-Infected Individuals. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 1999 74: 81–90.
369. Hartling, H. J., L. P. Ryder, H. Ullum, N. Ødum, and S. D. Nielsen. 2017. Gene variation in IL-7 receptor (IL-7R) α affects IL-7R response in CD4+ T cells in HIV-infected individuals. *Sci. Rep.* 7: 42036.
370. Guzmán-Fulgencio, M., J. Berenguer, M. A. Jiménez-Sousa, D. Micheloud, M. García-Álvarez, J. M. Bellón, T. Aldámiz-Echevarría, P. García-Broncano, P. Catalán, C. Diez, D. Pineda-Tenor, and S. Resino. 2015. IL7RA polymorphisms predict the CD4+ recovery in HIV patients on cART. *Eur. J. Clin. Invest.* 45: 1192–1199.
371. Hartling, H. J., L. W. Thørner, C. Erikstrup, R. Zinyama, P. Kallestrup, E. Gomo, S. D. Nielsen, and H. Ullum. 2013. Polymorphisms in the interleukin-7 receptor α gene and mortality in untreated HIV-infected individuals. *AIDS Lond. Engl.* 27: 1615–1620.
372. Golden-Mason, L., J. R. Burton, N. Castelblanco, J. Klarquist, S. Benlloch, C. Wang, and H. R. Rosen. 2006. Loss of IL-7 receptor alpha-chain (CD127) expression in acute HCV infection associated with viral persistence. *Hepatol. Baltim. Md* 44: 1098–1109.

373. Lv, G., L. Ying, W.-J. Ma, X. Jin, L. Zheng, L. Li, and Y. Yang. 2010. Dynamic analysis of CD127 expression on memory CD8 T cells from patients with chronic hepatitis B during telbivudine treatment. *Virology* 7: 207.
374. Brooks, D. G., L. Teyton, M. B. A. Oldstone, and D. B. McGavern. 2005. Intrinsic Functional Dysregulation of CD4 T Cells Occurs Rapidly following Persistent Viral Infection. *J. Virol.* 79: 10514–10527.
375. Cellerai, C., M. Perreau, V. Rozot, F. B. Enders, G. Pantaleo, and A. Harari. 2010. Proliferation Capacity and Cytotoxic Activity Are Mediated by Functionally and Phenotypically Distinct Virus-Specific CD8 T Cells Defined by Interleukin-7R α (CD127) and Perforin Expression. *J. Virol.* 84: 3868–3878.
376. Bengsch, B., B. Seigel, M. Ruhl, J. Timm, M. Kuntz, H. E. Blum, H. Pircher, and R. Thimme. 2010. Coexpression of PD-1, 2B4, CD160 and KLRG1 on exhausted HCV-specific CD8+ T cells is linked to antigen recognition and T cell differentiation. *PLoS Pathog.* 6: e1000947.
377. Radziewicz, H., C. C. Ibegbu, M. L. Fernandez, K. A. Workowski, K. Obideen, M. Wehbi, H. L. Hanson, J. P. Steinberg, D. Masopust, E. J. Wherry, J. D. Altman, B. T. Rouse, G. J. Freeman, R. Ahmed, and A. Grakoui. 2007. Liver-Infiltrating Lymphocytes in Chronic Human Hepatitis C Virus Infection Display an Exhausted Phenotype with High Levels of PD-1 and Low Levels of CD127 Expression. *J. Virol.* 81: 2545–2553.
378. Urbani, S., B. Amadei, D. Tola, M. Massari, S. Schivazappa, G. Missale, and C. Ferrari. 2006. PD-1 expression in acute hepatitis C virus (HCV) infection is associated with HCV-specific CD8 exhaustion. *J. Virol.* 80: 11398–11403.
379. Stephanie C. Burke, Lorna Carrasco-Medina, Curtis L. Cooper, Angela M. Crawley. 2014. Impaired CD8+ T Cell IL-7 Activity in HCV Infection: Implications for HIV-HCV Co-infection | CROI Conference. .
380. Bauer, M., E. J. Giamarellos-Bourboulis, A. Kortgen, E. Möller, K. Felsmann, J. M. Cavillon, O. Guntinas-Lichius, O. Rutschmann, A. Ruryk, M. Kohl, B. Wlotzka, S. Rußwurm, J. C. Marshall, and K. Reinhart. 2016. A Transcriptomic Biomarker to Quantify Systemic Inflammation in Sepsis — A Prospective Multicenter Phase II Diagnostic Study. *EBioMedicine* 6: 114–125.
381. Calzascia, T., M. Pellegrini, A. Lin, K. M. Garza, A. R. Elford, A. Shahinian, P. S. Ohashi, and T. W. Mak. 2008. CD4 T cells, lymphopenia, and IL-7 in a multistep pathway to autoimmunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105: 2999–3004.
382. King, C., A. Ilic, K. Koelsch, and N. Sarvetnick. 2004. Homeostatic Expansion of T Cells during Immune Insufficiency Generates Autoimmunity. *Cell* 117: 265–277.
383. Merayo-Chalico, J., S. Rajme-López, A. Barrera-Vargas, J. Alcocer-Varela, M. Díaz-Zamudio, and D. Gómez-Martín. 2016. Lymphopenia and autoimmunity: A double-edged sword. *Hum. Immunol.* 77: 921–929.
384. Schulze-Koops, H. 2004. Lymphopenia and autoimmune diseases. *Arthritis Res. Ther.* 6: 178–180.

385. Penaranda, C., W. Kuswanto, J. Hofmann, R. Kenefeck, P. Narendran, L. S. K. Walker, J. A. Bluestone, A. K. Abbas, and H. Doms. 2012. IL-7 receptor blockade reverses autoimmune diabetes by promoting inhibition of effector/memory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109: 12668–12673.
386. Lee, L.-F., K. Logronio, G. H. Tu, W. Zhai, I. Ni, L. Mei, J. Dilley, J. Yu, A. Rajpal, C. Brown, C. Appah, S. M. Chin, B. Han, T. Affolter, and J. C. Lin. 2012. Anti-IL-7 receptor- α reverses established type 1 diabetes in nonobese diabetic mice by modulating effector T-cell function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109: 12674–12679.
387. Hartgring, S. A. Y., C. R. Willis, D. Alcorn, L. J. Nelson, J. W. J. Bijlsma, F. P. J. G. Lafeber, and J. A. G. van Roon. 2010. Blockade of the interleukin-7 receptor inhibits collagen-induced arthritis and is associated with reduction of T cell activity and proinflammatory mediators. *Arthritis Rheum.* 62: 2716–2725.
388. Chung, B., E. Dudl, A. Toyama, L. Barsky, and K. I. Weinberg. 2008. Importance of interleukin-7 in the development of experimental graft-versus-host disease. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* 14: 16–27.
389. Chung, B., E. P. Dudl, D. Min, L. Barsky, N. Smiley, and K. I. Weinberg. 2007. Prevention of graft-versus-host disease by anti-IL-7R α antibody. *Blood* 110: 2803–2810.
390. Bolotin, E., M. Smogorzewska, S. Smith, M. Widmer, and K. Weinberg. 1996. Enhancement of thymopoiesis after bone marrow transplant by in vivo interleukin-7. *Blood* 88: 1887–1894.
391. Andrew, D., and R. Aspinall. 2001. IL-7 and Not Stem Cell Factor Reverses Both the Increase in Apoptosis and the Decline in Thymopoiesis Seen in Aged Mice. *J. Immunol.* 166: 1524–1530.
392. Pellegrini, M., T. Calzascia, A. R. Elford, A. Shahinian, A. E. Lin, D. Dissanayake, S. Dhanji, L. T. Nguyen, M. A. Gronski, M. Morre, B. Assouline, K. Lahl, T. Sparwasser, P. S. Ohashi, and T. W. Mak. 2009. Adjuvant IL-7 antagonizes multiple cellular and molecular inhibitory networks to enhance immunotherapies. *Nat. Med.* 15: 528.
393. Wittig, B., A. Märten, T. Dorbic, S. Weineck, H. Min, S. Niemitz, B. Trojaneck, D. Flieger, S. Kruopis, A. Albers, J. Löffel, A. Neubauer, P. Albers, S. Müller, T. Sauerbruch, T. Bieber, D. Huhn, and I. G. Schmidt-Wolf. 2001. Therapeutic vaccination against metastatic carcinoma by expression-modulated and immunomodified autologous tumor cells: a first clinical phase I/II trial. *Hum. Gene Ther.* 12: 267–278.
394. Colombetti, S., F. Lévy, and L. Chapatte. 2009. IL-7 adjuvant treatment enhances long-term tumor antigen-specific CD8⁺ T-cell responses after immunization with recombinant lentivector. *Blood* 113: 6629–6637.
395. Roger, P. M., C. Pradier, and P. Dellamonica. 1994. [Mechanisms of lymphopenia in HIV infection]. *Presse Medicale Paris Fr.* 1983 23: 89–94.

396. Ray-Coquard, I., C. Cropet, M. Van Glabbeke, C. Sebban, A. Le Cesne, I. Judson, O. Tredan, J. Verweij, P. Biron, I. Labidi, J.-P. Guastalla, T. Bachelot, D. Perol, S. Chabaud, P. C. W. Hogendoorn, P. Cassier, A. Dufresne, and J.-Y. Blay. 2009. LYMPHOPENIA AS A PROGNOSTIC FACTOR FOR OVERALL SURVIVAL IN ADVANCED CARCINOMAS, SARCOMAS AND LYMPHOMAS. *Cancer Res.* 69: 5383–5391.
397. Girardot, T., T. Rimmelé, F. Venet, and G. Monneret. 2017. Apoptosis-induced lymphopenia in sepsis and other severe injuries. *Apoptosis* 22: 295–305.
398. Ponchel, F., R. J. Cuthbert, and V. Goëb. 2011. IL-7 and lymphopenia. *Clin. Chim. Acta* 412: 7–16.
399. Llano, A., J. Barretina, A. Gutiérrez, J. Blanco, C. Cabrera, B. Clotet, and J. A. Esté. 2001. Interleukin-7 in Plasma Correlates with CD4 T-Cell Depletion and May Be Associated with Emergence of Syncytium-Inducing Variants in Human Immunodeficiency Virus Type 1-Positive Individuals. *J. Virol.* 75: 10319–10325.
400. Lin, J., Z. Zhu, H. Xiao, M. R. Wakefield, V. A. Ding, Q. Bai, and Y. Fang. 2017. The role of IL-7 in Immunity and Cancer. *Anticancer Res.* 37: 963–967.
401. Rosenberg, S. A., C. Sportès, M. Ahmadzadeh, T. J. Fry, L. T. Ngo, S. L. Schwarz, M. Stetler-Stevenson, K. E. Morton, S. A. Mavroukakis, M. Morre, R. Buffet, C. L. Mackall, and R. E. Gress. 2006. IL-7 Administration to Humans Leads to Expansion of CD8+ and CD4+ Cells but a Relative Decrease of CD4+ T-Regulatory Cells. *J. Immunother. Hagerstown Md 1997* 29: 313–319.
402. Isabelle, R.-C., O. Tredan, G. Garin, C. Ménétrier-Caux, S. Chabaud, T. Bachelot, C. Cropet, P.-E. Heudel, P. Rebattu, P. Dupont, E. Verronese, A. Cadore, V. Fouillat, O. Derbel, N. Bonnin, T. Croughs, M. Morre, N. Pasqual, M. Manuel, G. Clapisson, C. Caux, D. Pérol, and J.-Y. Blay. 2014. Abstract CT333: Elypse-7: A randomized, placebo-controlled, Phase 2a evaluating the impact of IL-7 immunotherapy on CD4 count, risks of severe haematological toxicity and tumor progression in metastatic breast cancer patients. *Cancer Res.* 74: CT333–CT333.
403. Merchant, M. S., D. Bernstein, M. Amoako, K. Baird, T. A. Fleisher, M. Morre, S. M. Steinberg, M. Sabatino, D. F. Stroncek, A. M. Venkatesan, B. J. Wood, M. Wright, H. Zhang, and C. L. Mackall. 2016. Adjuvant Immunotherapy to Improve Outcome in High-Risk Pediatric Sarcomas. *Clin. Cancer Res.* 22: 3182–3191.
404. Sereti, I., R. M. Dunham, J. Spritzler, E. Aga, M. A. Proshan, K. Medvik, C. A. Battaglia, A. L. Landay, S. Pahwa, M. A. Fischl, D. M. Asmuth, A. R. Tenorio, J. D. Altman, L. Fox, S. Moir, A. Malaspina, M. Morre, R. Buffet, G. Silvestri, and M. M. Lederman. 2009. IL-7 administration drives T cell–cycle entry and expansion in HIV-1 infection. *Blood* 113: 6304–6314.
405. Levy, Y., C. Lacabaratz, L. Weiss, J.-P. Viard, C. Goujard, J.-D. Lelièvre, F. Boué, J.-M. Molina, C. Rouzioux, V. Avettand-Fénoël, T. Croughs, S. Beq, R. Thiébaud, G. Chêne, M. Morre, and J.-F. Delfraissy.

2009. Enhanced T cell recovery in HIV-1-infected adults through IL-7 treatment. *J. Clin. Invest.* 119: 997–1007.
406. Logerot, S., M. Rancez, B. Charmeteau-de Muylde, S. Figueiredo-Morgado, S. Rozlan, G. Tambussi, S. Beq, A. Couëdel-Courteille, and R. Cheynier. 2018. HIV reservoir dynamics in HAART-treated poor immunological responder patients under IL-7 therapy. *AIDS Lond. Engl.* 32: 715–720.
407. Vandergeeten, C., R. Fromentin, S. DaFonseca, M. B. Lawani, I. Sereti, M. M. Lederman, M. Ramgopal, J.-P. Routy, R.-P. Sékaly, and N. Chomont. 2013. Interleukin-7 promotes HIV persistence during antiretroviral therapy. *Blood* 121: 4321–4329.
408. Chung, B., L. Barbara-Burnham, L. Barsky, and K. Weinberg. 2001. Radiosensitivity of thymic interleukin-7 production and thymopoiesis after bone marrow transplantation. *Blood* 98: 1601–1606.
409. Seemayer, T. A., W. S. Lapp, and R. P. Bolande. 1977. Thymic involution in murine graft-versus-host reaction. Epithelial injury mimicking human thymic dysplasia. *Am. J. Pathol.* 88: 119–133.
410. Mackall, C. L., and R. E. Gress. 1997. Pathways of T-cell regeneration in mice and humans: implications for bone marrow transplantation and immunotherapy. *Immunol. Rev.* 157: 61–72.
411. Mackall, C. L., T. J. Fry, C. Bare, P. Morgan, A. Galbraith, and R. E. Gress. 2001. IL-7 increases both thymic-dependent and thymic-independent T-cell regeneration after bone marrow transplantation. *Blood* 97: 1491–1497.
412. Broers, A. E. C., S. J. Posthumus-van Sluijs, H. Spits, B. van der Holt, B. Löwenberg, E. Braakman, and J. J. Cornelissen. 2003. Interleukin-7 improves T-cell recovery after experimental T-cell-depleted bone marrow transplantation in T-cell-deficient mice by strong expansion of recent thymic emigrants. *Blood* 102: 1534–1540.
413. Alpdogan, O., C. Schmaltz, S. J. Muriglan, B. J. Kappel, M. A. Perales, J. A. Rotolo, J. A. Halm, B. E. Rich, and M. R. van den Brink. 2001. Administration of interleukin-7 after allogeneic bone marrow transplantation improves immune reconstitution without aggravating graft-versus-host disease. *Blood* 98: 2256–2265.
414. Sinha, M. L., T. J. Fry, D. H. Fowler, G. Miller, and C. L. Mackall. 2002. Interleukin 7 worsens graft-versus-host disease. *Blood* 100: 2642–2649.
415. Perales, M.-A., J. D. Goldberg, J. Yuan, G. Koehne, L. Lechner, E. B. Papadopoulos, J. W. Young, A. A. Jakubowski, B. Zaidi, H. Gallardo, C. Liu, T. Rasalan, J. D. Wolchok, T. Croughs, M. Morre, S. M. Devlin, and M. R. M. van den Brink. 2012. Recombinant human interleukin-7 (CYT107) promotes T-cell recovery after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 120: 4882–4891.
416. Chaudhry, M. S., E. Velardi, F. Malard, and M. R. M. van den Brink. 2017. Immune Reconstitution after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Time To T Up the Thymus. *J. Immunol.* 198: 40–46.

417. Demaret, J., G. Dupont, F. Venet, A. Friggeri, A. Lepape, T. Rimmelé, J. Morel, and G. Monneret. 2015. STAT5 phosphorylation in T cell subsets from septic patients in response to recombinant human interleukin-7: a pilot study. *J. Leukoc. Biol.* 97: 791–796.
418. Fleischmann, C., A. Scherag, N. Adhikari, C. Hartog, T. Tsaganos, P. Schlattmann, D. Angus, and K. Reinhart. 2015. Global burden of sepsis: a systematic review. *Crit. Care* 19: P21.
419. Hotchkiss, R. S., C. M. Coopersmith, J. E. McDunn, and T. A. Ferguson. 2009. Tilting toward immunosuppression. *Nat. Med.* 15: 496–497.
420. Rubin, L. A., and D. L. Nelson. 1990. The soluble interleukin-2 receptor: biology, function, and clinical application. *Ann. Intern. Med.* 113: 619–627.
421. Jäger, J., C. Schulze, S. Rösner, and R. Martin. 2013. IL7RA haplotype-associated alterations in cellular immune function and gene expression patterns in multiple sclerosis. *Genes Immun.* 14: 453–461.
422. Rane, L., N. Vudattu, K. Bourcier, E. Granier, J. Hillert, V. Seyfert, and M. J. Maeurer. 2010. Alternative splicing of interleukin-7 (IL-7) and interleukin-7 receptor alpha (IL-7Ralpha) in peripheral blood from patients with multiple sclerosis (MS). *J. Neuroimmunol.* 222: 82–86.
423. Endo, S., K. Inada, Y. Inoue, Y. Kuwata, M. Suzuki, H. Yamashita, S. Hoshi, and M. Yoshida. 1992. Two types of septic shock classified by the plasma levels of cytokines and endotoxin. *Circ. Shock* 38: 264–274.
424. Alves, N. L., E. M. M. van Leeuwen, I. A. M. Derks, and R. A. W. van Lier. 2008. Differential Regulation of Human IL-7 Receptor α Expression by IL-7 and TCR Signaling. *J. Immunol.* 180: 5201–5210.
425. Matsuzaki, J., S. Gnjatic, P. Mhawech-Fauceglia, A. Beck, A. Miller, T. Tsuji, C. Eppolito, F. Qian, S. Lele, P. Shrikant, L. J. Old, and K. Odunsi. 2010. Tumor-infiltrating NY-ESO-1-specific CD8+ T cells are negatively regulated by LAG-3 and PD-1 in human ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107: 7875–7880.
426. Agata, Y., A. Kawasaki, H. Nishimura, Y. Ishida, T. Tsubata, H. Yagita, and T. Honjo. 1996. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int. Immunol.* 8: 765–772.
427. Sauce, D., J. R. Almeida, M. Larsen, L. Haro, B. Autran, G. J. Freeman, and V. Appay. 2007. PD-1 expression on human CD8 T cells depends on both state of differentiation and activation status. *AIDS Lond. Engl.* 21: 2005–2013.
428. Ahmadzadeh, M., L. A. Johnson, B. Heemskerk, J. R. Wunderlich, M. E. Dudley, D. E. White, and S. A. Rosenberg. 2009. Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood* 114: 1537–1544.
429. Roger, P.-M., H. Hyvernat, M. Ticchioni, G. Kumar, J. Dellamonica, and G. Bernardin. 2012. The early phase of human sepsis is characterized by a combination of apoptosis and proliferation of T cells. *J. Crit. Care* 27: 384–393.

430. Sharpe, A. H., and K. E. Pauken. 2018. The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. *Nat. Rev. Immunol.* 18: 153–167.
431. Allantaz-Frager, F., F. Turrel-Davin, F. Venet, C. Monnin, A. De Saint Jean, V. Barbalat, E. Cerrato, A. Pachot, A. Lepape, and G. Monneret. 2013. Identification of Biomarkers of Response to IFN γ during Endotoxin Tolerance: Application to Septic Shock. *PLoS ONE* 8: e68218.
432. Liu, T. F., B. K. Yoza, M. E. Gazzar, V. T. Vachharajani, and C. E. McCall. 2011. NAD $^{+}$ -dependent SIRT1 Deacetylase Participates in Epigenetic Reprogramming during Endotoxin Tolerance. *J. Biol. Chem.* 286: 9856–9864.
433. Schwartz, R. H. 1990. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* 248: 1349–1356.
434. Schwartz, R. H. 2003. T cell anergy. *Annu. Rev. Immunol.* 21: 305–334.
435. Poujol, F., G. Monneret, E. Gallet-Gorius, A. Pachot, J. Textoris, and F. Venet. 2017. Ex vivo Stimulation of Lymphocytes with IL-10 Mimics Sepsis-Induced Intrinsic T-Cell Alterations. *Immunol. Invest.* 1–15.
436. Bozza, F. A., J. I. Salluh, A. M. Japiassu, M. Soares, E. F. Assis, R. N. Gomes, M. T. Bozza, H. C. Castro-Faria-Neto, and P. T. Bozza. 2007. Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. *Crit. Care Lond. Engl.* 11: R49.
437. Fontaine, M., S. Planel, E. Peronnet, F. Turrel-Davin, V. Piriou, A. Pachot, G. Monneret, A. Lepape, and F. Venet. 2014. S100A8/A9 mRNA induction in an ex vivo model of endotoxin tolerance: roles of IL-10 and IFN γ . *PLoS One* 9: e100909.
438. Bengsch, B., A. L. Johnson, M. Kurachi, P. M. Odorizzi, K. E. Pauken, J. Attanasio, E. Stelekati, L. M. McLane, M. A. Paley, G. M. Delgoffe, and E. J. Wherry. 2016. Bioenergetic insufficiencies due to metabolic alterations regulated by PD-1 are an early driver of CD8 $^{+}$ T cell exhaustion. *Immunity* 45: 358–373.
439. MacIver, N. J., R. D. Michalek, and J. C. Rathmell. 2013. Metabolic Regulation of T Lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 31: 259–283.
440. Patsoukis, N., K. Bardhan, P. Chatterjee, D. Sari, B. Liu, L. N. Bell, E. D. Karoly, G. J. Freeman, V. Petkova, P. Seth, L. Li, and V. A. Boussiotis. 2015. PD-1 alters T-cell metabolic reprogramming by inhibiting glycolysis and promoting lipolysis and fatty acid oxidation. *Nat. Commun.* 6: 6692.

Expression du récepteur de l'interleukine 7 et altérations lymphocytaires T au cours du sepsis : approche expérimentale et clinique

Résumé : Le sepsis, cause majeure de décès en réanimation, entraîne des altérations immunitaires associées à un risque augmenté de décès et d'infections secondaires. En particulier, les lymphocytes T (LT) de patients présentent des altérations phénotypiques et fonctionnelles caractéristiques d'un état d'épuisement. Pour améliorer leur réponse, l'IL-7 est actuellement proposée comme immunostimulant. Son récepteur existe sous différentes formes: protéines membranaire (CD127) et soluble (sCD127) et différents transcrits. Leur expression n'a été que peu étudiée dans le sepsis. De plus, dans d'autres contextes cliniques, le phénotype CD127^{low}PD1^{high} est proposé comme marqueur d'épuisement des LT mais n'a jamais été évalué dans le sepsis. L'objectif de ce projet était d'évaluer l'expression du récepteur de l'IL-7 comme biomarqueur dans le sepsis, d'étudier sa régulation chez les patients et la présence du phénotype CD127^{low}PD-1^{high} en lien avec les altérations des LT. L'objectif était également de mettre au point un modèle *ex vivo* reproduisant les altérations intrinsèques aux LT de patients. Nous avons confirmé l'intérêt de la concentration plasmatique de sCD127 comme marqueur de mortalité chez les patients de réanimation. Nous avons mis en évidence l'association de l'expression des transcrits IL7R correspondant à des formes solubles avec la mortalité, ainsi que leur régulation intrinsèque dans les LT. Enfin, la proportion augmentée de LT CD127^{low}PD-1^{high} chez les patients en choc septique en fait également un candidat potentiel comme marqueur spécifique des altérations des LT. Dans un deuxième temps, nous avons développé un modèle d'altérations induites par l'activation à partir de LT purifiés de volontaires sains reproduisant les altérations des LT de patients en choc septique. Ce modèle suggère un rôle de l'activation des LT dans le développement de leurs altérations et pourrait permettre d'étudier de nouveaux aspects de la physiopathologie des LT dans le sepsis.

Mots clés : sepsis, lymphocytes T, immunosuppression, récepteur de l'IL-7, biomarqueurs, modélisation *ex vivo*

Interleukin 7 receptor expression and T cell alterations during sepsis: clinical and experimental approaches

Abstract: Sepsis is the leading cause of death in intensive care units (ICU). Septic patients develop immune dysfunctions that are associated with an increased risk of death and secondary infections. In particular, patients' T lymphocytes present phenotypic and functional alterations characteristic of exhaustion. To restore these alterations, IL-7 is currently proposed as an immunostimulant. Its receptor exists in different forms: a membrane (CD127) and a soluble (sCD127) proteins and different transcripts. The IL-7 receptor expression has not been studied in sepsis. Moreover, the CD127^{low}PD-1^{high} phenotype is proposed as a T cell exhaustion marker in other clinical contexts but has never been explored in sepsis. In this context, the aim of this project was first to evaluate the expression of the IL-7 receptor as a biomarker in sepsis, to study its regulation in patients and the CD127^{low}PD-1^{high} phenotype in parallel with T cell alterations in septic shock patients. Secondly, the objective was to develop an *ex vivo* model reproducing phenotypic and functional T cell alterations observed in patients. We confirmed the role of sCD127 plasmatic concentration as a marker of mortality in septic shock and more generally in ICU patients. In addition, we demonstrated the association of the expression of the IL7R transcripts, corresponding to soluble forms with mortality as well as the intrinsic regulation of their expressions in T lymphocytes. Finally, we found an increased proportion of CD127^{low}PD-1^{high} T cells in septic shock patients. This population could also be evaluate as a potential specific marker of T lymphocyte alterations. Secondly, we developed an *ex vivo* model of alterations induced by activation of purified T cell from healthy volunteers reproducing alterations observed in patients' T cells. This model suggests a role of T cell activation in the development of their alterations and could be used to explore new aspects of T cell alterations pathophysiology in sepsis.

Key words: sepsis, T cell, immunosuppression, IL-7 receptor, biomarkers, *ex vivo* model

Thèse préparée au sein de l'unité EA7426 Physiopathologie de l'immunosuppression associée aux réponses inflammatoires systémiques (PI3), 5^{ème} étage Pavillon P, Hôpital Edouard Herriot